UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

Efectores positivos y negativos de la embriogénesis somática y de microsporas de especies cultivadas y forestales: regulación hormonal, pared celular y muerte celular

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Yolanda Pérez Pérez

Directora

Pilar Sánchez Testillano

Madrid

© Yolanda Pérez Pérez, 2021

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

EFECTORES POSITIVOS Y NEGATIVOS DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y DE MICROSPORAS DE ESPECIES CULTIVADAS Y FORESTALES: REGULACIÓN HORMONAL, PARED CELULAR Y MUERTE CELULAR

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

YOLANDA PÉREZ PÉREZ

DIRECTORA

PILAR SÁNCHEZ TESTILLANO

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

EFECTORES POSITIVOS Y NEGATIVOS DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y DE MICROSPORAS DE ESPECIES CULTIVADAS Y FORESTALES: REGULACIÓN HORMONAL, PARED CELULAR Y MUERTE CELULAR



MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

YOLANDA PÉREZ PÉREZ

DIRECTORA

PILAR SÁNCHEZ TESTILLANO

MADRID, 2021

La Dra. **PILAR SÁNCHEZ TESTILLANO**, investigadora del Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CIB) de Madrid adscrito al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Certifica:

Que la presente Tesis Doctoral titulada: "**EFECTORES POSITIVOS Y NEGATIVOS DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y DE MICROSPORAS DE ESPECIES CULTIVADAS Y FORESTALES: REGULACIÓN HORMONAL, PARED CELULAR Y MUERTE CELULAR**", realizada por la graduada en biología **YOLANDA PÉREZ PÉREZ** bajo su dirección y supervisión, reúne los requisitos exigidos para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

En Madrid, 2021.

Fdo. Dra. Pilar Sánchez Testillano

La realización de la presente memoria de Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en el grupo de investigación de Biotecnología del Polen de Plantas Cultivadas en el departamento de Biotecnología Microbiana y de Plantas del Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CIB Margarita Salas) de la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el marco de los siguientes proyectos:

- Título del proyecto: "Factores determinantes de la reprogramación a embriogénesis de la microspora inducida por estrés para la mejora de plantas cultivadas". AGL2014-52028-R, financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad, MINECO. Duración: enero 2015- septiembre 2018.

- Título del Proyecto: "Nuevas estrategias con pequeñas moléculas moduladoras de procesos clave de la reprogramación a embriogénesis de la microspora inducida por estrés para la mejora de plantas cultivadas". AGL2017-82447-R, financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad, MINECO. Duración: enero 2018- septiembre 2021.

- Título del Proyecto: "European Network of Multidisciplinary Research and Translation of Autophagy Knowledge". TRANSAUTOPHAGY, COST Action CA15138, financiado por la Comisión Europea. Duración: noviembre 2015- noviembre 2020.

- Título del Proyecto: "Red de Excelencia para el Estudio de la Autofagia (NEAR)". BFU2015-71869-REDT, financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad, MINECO. Duración: enero 2016- diciembre 2017.

La ciencia por sí sola no basta.
También tenemos que poner el corazón.

Modificado de Jane Goodall

AGRADECIMIENTOS

Una tesis doctoral es una carrera de fondo que involucra a muchas personas a lo largo del recorrido, por ello me gustaría agradecer de corazón la dedicación, el apoyo y los buenos deseos de todos aquellos que me habéis acompañado en mi trayectoria y habéis contribuido a que hoy pueda presentar mi tesis doctoral para optar al grado de doctora en Biología.

En primer lugar quiero dedicarle unas palabras a mi directora de tesis, la Dra. Pilar S. Testillano. Gracias por abrirme las puertas tu grupo de investigación y darme la oportunidad de llevar a cabo esta tesis en una línea que desde el primer día me entusiasmó. Las tesis nunca son fáciles, hay altibajos, mucha presión, y debo decir que en todo momento me he sentido apoyada y respaldada por tu buen hacer, tu fortaleza, tu coraje y tu tesón, creo que hemos sabido entendernos y formar equipo, y eso sin duda ha quedado reflejado en esta tesis.

También quiero agradecer a la Dra. María del Carmen Risueño su asesoramiento y su positivismo contagioso, tantas charlas de ciencia y no ciencia con una persona con tal bagaje es siempre un regalo.

Gracias a todos los grupos de investigación que han colaborado en la obtención de estos resultados y, en especial, a la Dra. Céline Masclaux Daubresse del *Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR1318 INRA-AgroParisTech* por acogerme en su grupo y ampliar mi visión del *networking*. Gracias también a Marién por tantas horas de dedicación durante mi estancia, aunque siempre íbamos a contrarreloj no faltaron las risas, hiciste que fuera fácil aprender técnicas complejas.

Por supuesto gracias a todo el personal del CIB Margarita Salas que de una u otra manera ha contribuido a la realización de esta tesis. En especial querría agradecer la dedicación y ayuda de Pablo y Yolanda, del servicio de fotografía; Gemma y Mayte, del servicio de microscopía; Tamar, Vivi y Paco, del servicio de proteómica; Ligia, del servicio de informática, y a todo el servicio de esterilización y limpieza de material. Un especial y cariñoso agradecimiento se lo tengo que dedicar a Isi, quien siempre ha estado cerca para sacarme una sonrisa.

A mis compis del 208, tanto a los que siguen como a los que ya se han marchado, he aprendido de todos vosotros. Gracias Mayte por tu infinita paciencia en mis inicios, enseñándome todas las técnicas y cambiando siempre con una sonrisa los momentos de mayor frustración por curiosidad científica, gracias por contagiarme tu entusiasmo. Edu, mi gemelo de tesis, ha sido una suerte coincidir contigo y apoyarnos el uno al otro en todos estos años. Y Elena, mi loca y periquita compañera del equipo de la janolia, gracias por tus buenos consejos. A los tres muchas gracias por tantos buenos momentos dentro y fuera del laboratorio, sois los mejores compañeros que uno podría desear y sé que podré contar con vosotros de por vida, sin vosotros ni yo ni esta tesis seríamos los mismos. Gracias a todas las personas que han pasado por el laboratorio: Matilde (el 208 ha sido el punto de encuentro para una bonita amistad), Ivett, Cristina,Vanesa, Ahmed, Jacobo, Sara, Carlos, Natalia, Nacho, Esteban y Jorge; a las personas de los laboratorios vecinos: Irene, Miguel, Gossia, Arancha, Alicia, Laura, Fran y Virginia; y a Iria, mi compañera zombie de Secugen con la que cerraba el CIB muchas tardes-noches.

A mis compañeros de carrera y más allá, al grupo de los espantaos: Carmen, Rocío Diego, Lidia y Natalia, gracias por vuestros consejos y por tantas vivencias compartidas, y las que nos quedan! Gracias también a Gema, quien ya estaba ahí antes de que apareciera mi vocación por la ciencia, apoyándome en mis decisiones, idas y venidas, sé que siempre puedo contar contigo.

Siempre he tenido clara mi vocación por investigar, pero también he sabido desde el principio que no se trata de un camino fácil. Por ello no quiero dejar de agradecer la confianza que pusieron en mí todos aquellos investigadores que me dejaron colaborar en sus grupos mientras aún estudiaba la carrera, lo cual, además de permitirme ganar experiencia, incrementó exponencialmente mis ganas y entusiasmo por dedicarme a la investigación. Jesús, Beatriz, Arancha, Luisa, Elena, Adolfo, Santos Cirujano y Ana Rincón, gracias.

A mi familia, especialmente a mis padres, gracias por apoyarme en esto y en todo. De vosotros he sacado la fortaleza y la confianza con la que me enfrento a cada día. A lo largo de mi vida habéis sido consejeros, risas, lucha, paciencia, amor, calma, euforia, sensatez… gracias por estar siempre conmigo, aplaudiendo mis logros y sujetándome en las caídas. A mi abuela, quien siempre se crece ante las adversidades y llena el corazón

de cualquiera con esa energía, alegría y pasión por la vida, eres sin duda un ejemplo a seguir para mí y para muchos. A mi hermano, con quien he aprendido tantas cosas y que tanto vale, sé que siempre podremos contar el uno con el otro en cualquier momento y circunstancia. Y a Linda, gracias por tantos buenos momentos, por ser tan especial, por estar en mi vida, espero haberte hecho la mitad de feliz de lo que tú me has hecho a mí.

Y, por último, el mayor de los agradecimientos es para Claudio, mi científico favorito, mi aliento y descanso cada día. Gracias por tanto apoyo y ayuda incondicional, por estar siempre a mi lado. Eres una continua fuente de risas y alegrías y el mejor compañero de vida. Gracias por quererme y cuidarme tanto. ¿Nos imaginabas así hace 9 años?

A todos, por vuestro gran papel en esta tesis, GRACIAS.

ÍNDICE

RESUMEN **1**

INTRODUCCIÓN **7**

1.1 REPRODUCCIÓN SEXUAL EN ANGIOSPERMAS **9**
1.1.1 Desarrollo del grano de polen 12
1.1.2 Morfogénesis de la antera 13
1.1.3 Formación del gametofito masculino 14
1.1.4 Desarrollo del tapetum 17
1.1.5 Embriogénesis cigótica 20

1.2 REPRODUCCIÓN ASEXUAL EN ANGIOSPERMAS **23**
1.2.1 Embriogénesis asexual *in vivo* 24
1.2.2 Embriogénesis asexual *in vitro* 24
1.2.3 Embriogénesis somática 25
1.2.4 Embriogénesis de la microspora 28
1.2.5 Factores determinantes de la inducción embriogénica 32
1.3.3 Limitaciones en la aplicación de la embriogénesis somática y de microsporas 38

1.4 SISTEMAS EXPERIMENTALES **39**
1.4.1 *Brassica napus* L. 39
1.4.2 *Hordeum vulgare* L. 44
1.4.3 *Quercus suber* L. 49

1.5 HORMONAS VEGETALES DE DESARROLLO Y EMBRIOGÉNESIS **54**
1.5.1 Auxinas 56
1.5.2 Citoquininas 66

1.6 PARED CELULAR **80**
1.6.1 Pectinas 82
1.6.2 Proteínas de arabinogalactano (AGPs) 86

1.7 MUERTE CELULAR, AUTOFAGIA Y PROTEASAS **90**
1.7.1 Muerte celular 90
1.7.2 Autofagia 92
1.7.3 Cisteín proteasas implicadas en la muerte celular 96

OBJETIVOS **101**

MATERIAL Y MÉTODOS **105**

3.1 MATERIAL VEGETAL **107**
3.1.1 *Brassica napus* L. cv. Topas 107
3.1.2 *Hordeum vulgare* L. cv. Igri 108

3.1.3. *Quercus suber* L. 110

3.2 CULTIVO *IN VITRO* DE MICROSPORAS AISLADAS DE *BRASSICA NAPUS* L. 111
3.2.1 Selección de yemas florales 111
3.2.2 Preparación del medio de cultivo NLN-13 112
3.2.3 Esterilización de las yemas florales, aislamiento de microsporas y puesta en cultivo 114
3.2.4 Seguimiento del cultivo 117
3.2.5 Tratamientos farmacológicos en el cultivo *in vitro* 118
3.2.6 Germinación y regeneración de plántulas 119

3.3 CULTIVO *IN VITRO* DE MICROSPORAS AISLADAS DE *HORDEUM VULGARE* L. 120
3.3.1 Selección de espigas 120
3.3.2 Esterilización de las espigas y tratamiento en frío 122
3.3.3 Preparación del medio de cultivo KBP soluciones de maltosa y manitol 123
3.3.4 Aislamiento de microsporas y puesta en cultivo 125
3.3.5 Seguimiento del cultivo 127
3.3.6 Tratamientos farmacológicos en el cultivo *in vitro* 128

3.4 CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *QUERCUS SUBER* L. 129
3.4.1 Recogida de material en campo 129
3.4.2 Preparación de medios de cultivo de inducción y proliferación 130
3.4.3 Selección de bellotas en estadio inmaduro y esterilización 131
3.4.4 Puesta en cultivo e inducción embriogénica 132
3.4.5 Traspaso del material inducido a condiciones de proliferación 133
3.4.6 Seguimiento del cultivo, multiplicación y embriogénesis somática recurrente 133
3.4.7 Tratamientos farmacológicos en el cultivo *in vitro* 133

3.5 COMPUESTOS INHIBIDORES ENSAYADOS EN LOS CULTIVOS *IN VITRO* 135
3.5.1 Inhibidores de auxinas 135
3.5.2 Inhibidores de citoquininas 136
3.5.3 Inhibidores de proteínas de arabinogalactano 137
3.5.4 Inhibidores de pectinmetilesterasas 138
3.5.5 Inhibidores de autofagia, proteasas y ROS 138

3.6 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS CON INHIBIDORES 141
3.6.1 Cuantificación de proembriones en el cultivo *in vitro* de microsporas aisladas 141
3.6.2 Cuantificación de embriones maduros en el cultivo *in vitro* de microsporas aisladas 142
3.6.3 Cuantificación de muerte celular en el cultivo *in vitro* de microsporas aisladas 143
3.6.4 Cuantificación de embriones somáticos en cultivo *in vitro* de *Q. suber* 144

3.7 RECOGIDA DE MUESTRAS PARA ESTUDIOS CELULARES Y MOLECULARES 144
3.7.1 Recogida de muestras de cultivos de microsporas aisladas en medio líquido .. 144

3.7.2 Recogida de muestras de anteras en distintos estadios del desarrollo 145
3.7.3 Recogida de muestras de cultivos de embriogénesis somática en medio sólido 145

3.8 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA MICROSCOPÍA ÓPTICA 146
3.8.1 Fijación 146
3.8.2 Pre-inclusión en gelatina de las células y estructuras en suspensión 147
3.8.3 Inclusión en resina 147
3.8.4 Obtención de cortes semifinos en ultramicrotomo 149

3.9 TINCIONES CITOQUÍMICAS 150
3.9.1 Citoquímica con azul de toluidina 150
3.9.2 Citoquímica con yodo/yoduro potásico 151
3.9.3 Citoquímica con DAPI 152
3.9.4 Montaje de las preparaciones 152

3.10 INMUNOFLUORESCENCIA Y ANÁLISIS EN MICROSCOPÍA CONFOCAL 154
3.10.1 Recubrimiento de portaobjetos con APTES 154
3.10.2 Inmunofluorescencia 155
3.10.3 Controles de inmunofluorescencia 158
3.10.4 Análisis de microscopía confocal 159
3.10.5 Cuantificación de la intensidad de señal de inmunofluorescencia con Image-J 160

3.11 DETECCIÓN DE PECTINAS Y PROTEÍNAS ESPECÍFICAS MEDIANTE TÉCNICAS DE *INMUNOBLOT* 160
3.11.1 Técnica de *inmuno dot blot* para la detección de pectinas y AGPs 161
3.11.2 Ensayo de *dot blot* con reactivo Yariv para la detección de AGPs 163
3.11.3 Técnica de *western blot* para la detección de proteínas específicas 165

3.12 DETECCIÓN DEL PERFIL DE CISTEÍN PROTEASAS ACTIVAS MEDIANTE LA TÉCNICA ABPP (*ACTIVITY BASED PROTEIN PROFILING*) 173
3.12.1 Extracción y cuantificación de proteínas solubles 174
3.12.2 Tratamiento de las muestras con DCG-04 174
3.12.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS) 177
3.12.4 Ensayo de *westen blot* (transferencia de proteínas e inmunodetección) 177

3.13 INMUNOPRECIPITACIÓN DE PLCPs ACTIVAS Y ANÁLISIS PROTEÓMICO 178
3.13.1 Extracción de proteínas solubles 178
3.13.2 Biotinilación de PLCPs activas 179
3.13.3 Ensayos de *pull-down* de proteínas biotiniladas 179
3.13.4 Análisis proteómico: identificación de PLCPs activas mediante HPLC-MS/MS 182

3.14 ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PECTINMETILESTERASA 183
3.14.1 Preparación del tampón de extracción 183
3.14.2 Extracción y cuantificación de proteínas totales 183
3.14.3 Preparación de los reactivos 183
3.14.4 Ensayo de actividad pectinmetilesterasa 184

3.15 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FITOHORMONAS 185
3.15.1 Cuantificación de auxinas mediante LC-ESI-MS/MS 187
3.15.2 Cuantificación de citoquininas mediante HPLC-ESI-MS 187

3.16 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA POR PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL 188
3.16.1 Extracción de RNA 188
3.16.2 Síntesis de cDNA 190
3.16.3 Diseño de oligonucleótidos 190
3.16.4 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR) 193
3.16.5 Análisis de expresión génica 194

3.17 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS 194

RESULTADOS 197

4.1. DINÁMICA DE LA AUXINA DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS Y EL DESARROLLO DEL POLEN Y EL TAPETUM DE *BRASSICA NAPUS* 199
4.1.1 Caracterización de las etapas principales de la embriogénesis de microsporas de *B. napus* 199
4.1.2 Patrón temporal de concentración y localización de auxina durante la embriogénesis de microsporas de *B. napus* 201
4.1.3 Patrones de expresión de los genes *BnTAA1* y *BnPIN1-like* durante la embriogénesis de microsporas de *B. napus* 206
4.1.4 Efectos de la inhibición de la biosíntesis de auxina sobre la inducción y progresión de la embriogénesis de microsporas de *B. napus* 208
4.1.5 Dinámica de la auxina durante el desarrollo *in vivo* del polen y del tapetum de *B. napus* 210

4.2 DINÁMICA DE LA AUXINA DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS Y EL DESARROLLO DEL POLEN DE *HORDEUM VULGARE* 221
4.2.1 Caracterización de las etapas principales de la embriogénesis de microsporas de *H. vulgare* 221
4.2.2 Patrón temporal de localización y acumulación de auxina durante la embriogénesis de microsporas de *H. vulgare* 223
4.2.3 Patrones de expresión de los genes *HvTAR2-like* y *HvPIN1-like* durante la embriogénesis de microsporas de *H. vulgare* 228
4.2.4 Efecto de inhibidores de la biosíntesis y el transporte polar de auxina sobre la inducción y progresión de la embriogénesis de microsporas de *H. vulgare* 231

4.2.5 Dinámica de la auxina durante el desarrollo del polen de *H. vulgare* 234

4.3 DINÁMICA DE LA CITOQUININA DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS DE *BRASSICA NAPUS* y *HORDEUM VULGARE* 240

4.3.1 Patrón temporal de concentración y localización de citoquinina durante la embriogénesis de microsporas de *B. napus* 240

4.3.2 Patrones de expresión de genes de biosíntesis, señalización y degradación de citoquininas durante la embriogénesis de microsporas de *B. napus* 245

4.3.3 Patrón temporal de concentración del precursor del etileno ACC durante la embriogénesis de microsporas de *B. napus* 249

4.3.4 Efecto de inhibidores de la ruta de señalización de la citoquinina sobre la inducción y progresión de la embriogénesis de microsporas *de B. napus* 250

4.3.5 Patrón temporal de concentración y localización de citoquinina durante la embriogénesis de microsporas de *H. vulgare* 253

4.4 DINÁMICA DE DESESTERIFICACIÓN DE PECTINAS DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *Q. SUBER* Y LA EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS DE *H. VULGARE* Y *B. NAPUS* 257

4.4.1 Caracterización de las principales etapas de la embriogénesis somática de *Q. suber* 257

4.4.2 Patrones temporales y de localización subcelular de pectinas esterificadas y no esterificadas durante la embriogénesis somática de *Q. suber* 261

4.4.3 Expresión de la pectinmetilesterasa *QsPME* y el inhibidor de pectinmetilesterasa *QsPMEI* durante la embriogénesis somática de *Q. suber* 268

4.4.4 Actividad enzimática PME durante la embriogénesis somática de *Q. suber* 270

4.4.5 Efectos de la inhibición de la actividad PME durante la embriogénesis somática de *Q. suber* 271

4.4.6 Desesterificación de pectinas en etapas avanzadas de la embriogénesis de microsporas de *B. napus* y *H. vulgare* 274

4.5 CAMBIOS EN LAS AGPs DE LA PARED CELULAR DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *Q. SUBER* Y LA EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS DE *H. VULGARE* .. 285

4.5.1 Patrones temporales y de localización subcelular de las AGPs durante la embriogénesis somática de *Q. suber* 285

4.5.2 Expresión génica de las AGPs *QsLys-rich-AGP17*, *QsLys-rich-AGP18* y *QsAGP16L1* durante la embriogénesis somática de *Q. suber* 290

4.5.3 Efectos del bloqueo de AGPs por precipitación con Yariv en la embriogénesis somática de *Q. suber* 292

4.5.4 Cambios en las AGPs de la pared celular durante la embriogénesis de microsporas de *H. vulgare* 295

4.6 AUTOFAGIA Y PROTEASAS DURANTE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR ESTRÉS EN LA EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS DE *HORDEUM VULGARE* 298

4.6.1 Muerte celular inducida por estrés en la embriogénesis de microsporas de *H. vulgare* 298
4.6.2 Efectos del tratamiento con inhibidores de ROS, autofagia y proteasas sobre la muerte celular inducida por estrés durante la embriogénesis de microsporas de *H. vulgare* 300
4.6.3 Efectos del tratamiento con inhibidores de ROS, autofagia y proteasas sobre el inicio de la embriogénesis de microsporas de *H. vulgare* 302

4.7 AUTOFAGIA Y PROTEASAS DURANTE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA (MCP) DEL TAPETUM DE *H. VULGARE* 304
4.7.1 Caracterización celular de la MCP del tapetum durante el desarrollo del polen de *H. vulgare* 304
4.7.2 Localización subcelular y expresión de genes de autofagia durante la MCP del tapetum de *H. vulgare* 307
4.7.3 Dinámica e identificación de PLCPs activas durante la MCP del tapetum de *H. vulgare* 310

DISCUSIÓN 323

5.1 PAPEL DE LA AUXINA ENDÓGENA EN LA EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS 325
5.1.1 La dinámica de la auxina durante el desarrollo del polen 326
5.1.2 El inicio y progresión de la embriogénesis de microsporas requiere la activación de biosíntesis y transporte de auxina 329
5.1.3 La dinámica de la auxina cambia con la reprogramación a embriogénesis de la microspora 335

5.2 PAPEL DE LA CITOQUININA ENDÓGENA EN LA EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS 337

5.3 PAPEL DE REMODELACIÓN DE LA PARED CELULAR EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA 344
5.3.1 La desesterificación de pectinas mediada por PME y PMEI es esencial para la progresión de la embriogénesis somática 345
5.3.2 El aumento progresivo de AGPs en la pared celular es necesario durante la embriogénesis somática 349

5.4 PAPEL DE LA AUTOFAGIA Y DE PROTEASAS ESPECÍFICAS EN LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR ESTRÉS AL INICIO DE LA EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS DE CEBADA 354

5.5 PAPEL DE LAS PLCPs Y LA AUTOFAGIA EN LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA DEL TAPETUM DE CEBADA 360

5.6 EFECTORES CLAVE EN LA REGULACIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA SON COMUNES A DISTINTOS SISTEMAS Y DIVERSAS ESPECIES CULTIVADAS Y FORESTALES 370

CONCLUSIONES 375

BIBLIOGRAFÍA..... 381

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS..... 421

Figura 1. Ciclo de vida de las plantas angiospermas. 12
Figura 2. Aparato reproductor masculino en plantas angiospermas. 13
Figura 3. Morfogénesis de la antera 14
Figura 4. Desarrollo del gametofito masculino. 16
Figura 5. Modificaciones de los tejidos de la antera durante el desarrollo del polen. Muerte celular programada (MCP) del tapetum. 19
Figura 6. Embriogénesis cigótica en plantas angiospermas: dicotiledóneas y monocotiledóneas 22
Figura 7. Reproducción asexual en angiospermas. 23
Figura 8. Descripción esquemática del proceso de embriogénesis somática 27
Figura 9. Embriogénesis de la microspora, reprogramación *in vitro*. 31
Figura 10. Ilustración de *Brassica napus* 42
Figura 11. Triángulo de U del género *Brassica*. 43
Figura 12. Ilustración de *Hordeum vulgare* 47
Figura 13. Ilustración de *Quercus suber* 52
Figura 14. Principales auxinas naturales y sintéticas. 58
Figura 15. Biosíntesis de auxina. 61
Figura 16. Transporte de auxina. 62
Figura 17. Ruta de señalización de auxina. 64
Figura 18. Principales citoquininas naturales y sintéticas. 68
Figura 19. Ruta de biosíntesis de citoquininas. 73
Figura 20. Transporte de citoquininas. 76
Figura 21. Ruta de señalización de citoquininas. 78
Figura 22. Estructura de la pared celular 81
Figura 23. Estructura básica de la pectina. 83
Figura 24. Demetilesterificación de pectinas por la acción de pectinmetilesterasas PME 84
Figura 25. Demetiesterificación del HG de las pectinas y los efectos en su estructura 85
Figura 26. Representación esquemática de la estructura de las AGPs clásicas. 87
Figura 27. Proceso autofágico en plantas. 94
Figura 28. Clasificación de PLCPs en *Arabidopsis thaliana*. 98
Figura 29. Modelo ilustrativo de la estructura de las PLCP antes y después de su activación proteolítica. 99
Figura 30. Ciclo de crecimiento de las plantas de *Brassica napus* L. cv. Topas. 108
Figura 31. Ciclo de crecimiento de las plantas de *Hordeum vulgare* L. cv. Igri. 110
Figura 32. Yemas florales de *B. napus* en distintos estadios del desarrollo 111
Figura 33. Selección de yemas florales de *Brassica napus* en estadio de microspora vacuolada… 114
Figura 34. Cultivo *in vitro* de microsporas aisladas de *Brassica napus*. 116
Figura 35. Germinación y regeneración de plántulas derivadas de microsporas de *Brassica napus* a partir de embriones cotiledonares maduros. 120
Figura 36. Espigas de *H. vulgare* en distintos estadios del desarrollo 121
Figura 37. Selección de espigas de *Hordeum vulgare* en estadio de microspora vacuolada y tratamiento a 4^{o}C. 123
Figura 38. Cultivo *in vitro* de microsporas aisladas de *Hordeum vulgare*. 127

Figura 39. Bellotas de *Q. suber* en distintos estadios del desarrollo 130
Figura 40. Estructura molecular del compuesto L-Kinurenina. 135
Figura 41. Estructura molecular del compuesto NPA 136
Figura 42. Estructura molecular del compuesto PI-55. 137
Figura 43. Estructura molecular de los reactivos Yariv 137
Figura 44. Estructura molecular del compuesto catequina PP60 138
Figura 45. Estructura molecular del compuesto $MnCl_2{\cdot}4H_2O$. 138
Figura 46. Estructura molecular del compuesto Ac-DEVD-CHO. 139
Figura 47. Estructura molecular del compuesto concanamicina A. 140
Figura 48. Estructura molecular del compuesto leupeptina 140
Figura 49. Estructura molecular del compuesto E-64d 141
Figura 50. Recubrimiento de portaobjetos multipocillo con APTES. 154
Figura 51. Esquema de la reacción de inmunofluorescencia. 156
Figura 52. Esquema de la reacción de inmunofluorescencia en un control negativo por inmunodeplección. 159
Figura 53. Montaje de la estructura para la preparación de un gel de poliacrilamida. 168
Figura 54. PAGE-SDS. 169
Figura 55. Transferencia húmeda de las proteínas desde el gel a la membrana (*electroblotting*) 171
Figura 56. Inmunodetección y revelado de *western blot*. 172
Figura 57. (A) Estructura molecular del DCG-04. **(B)** Estructura molecular del E-64d. 174
Figura 58. Inmunodetección de la actividad ABPP de PLCPs 176
Figura 59. Esquema de las sucesivas reacciones químicas llevadas a cabo en el ensayo espectrofotométrico acoplado para la detección de actividad PME. 184
Figura 60. Espectro de absorbancia de los ácidos nucleicos. 189
Figura 61. Principales etapas de la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Brassica napus* 201
Figura 62. Cuantificación de la concentración de AIA endógeno durante el desarrollo embriogénico de *Brassica napus*, utilizando cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray (LC-ESI-MS/MS). 202
Figura 63. Inmunolocalización de AIA durante la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Brassica napus* 204
Figura 64. Inmunolocalización de AIA durante la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Brassica napus*, imagen de un embrión globular que conserva la estructura del suspensor 204
Figura 65. Inmunolocalización de AIA durante la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Brassica napus*, imagen de un embrión cotiledonar. 205
Figura 66. Cuantificación de la concentración de AIA endógeno durante la embriogénesis de microsporas de *Brassica napus* 206
Figura 67. Patrones de expresión génica por qRT-PCR de *BnTAA1* (gen de biosíntesis de auxina) y *BnPIN1-like* (gen de transporte polar de auxina) durante el desarrollo embriogénico de *Brassica napus* 207
Figura 68. Efecto del tratamiento con kinurenina, inhibidor de la biosíntesis de auxina, en cultivos de embriogénesis de microsporas de *Brassica napus*. 209
Figura 69. Principales etapas del desarrollo del polen *in vivo* de *Brassica napus*. 212

Figura 70. Principales etapas del desarrollo del polen y muerte celular programada (MCP) del tapetum de *Brassica napus* 214
Figura 71. Cuantificación de la concentración de AIA endógeno durante el desarrollo del polen de *Brassica napus*, utilizando cromatografía de líquidos con ionización por electrospray acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-ESI-MS/MS). 215
Figura 72. Inmunolocalización de AIA durante el desarrollo del polen de *Brassica napus*. 217
Figura 73. Cuantificación de la intensidad de la señal de inmunofluorescencia del AIA a nivel celular, tanto de microsporas y polen como del tapetum, durante el desarrollo del polen de *Hordeum vulgare*. 218
Figura 74. Patrones de expresión génica por qRT-PCR de *BnTAA1* (gen de biosíntesis de auxina) y *BnPIN1-like* (gen de transporte polar de auxina) durante el desarrollo del polen de *Brassica napus*. 219
Figura 75. Principales etapas de la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Hordeum vulgare*. 222
Figura 76. Inmunolocalización de AIA durante la embriogénesis de microsporas de *Hordeum vulgare* inducida por estrés 225
Figura 77. Controles negativos de la inmunofluorescencia de AIA durante la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Hordeum vulgare*, utilizando la técnica de inmunodeplección. 226
Figura 78. Controles positivos y negativos de la inmunofluorescencia de AIA en ápices de raíz en crecimiento de *Hordeum vulgare*, utilizando la técnica de inmunodeplección 227
Figura 79. Cuantificación de la intensidad de la señal de inmunofluorescencia de AIA durante la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Hordeum vulgare* 228
Figura 80. Patrones de expresión génica por qRT-PCR de *HvTAR2-like* (gen de biosíntesis de auxina) y *HvPIN1-like* (gen de transporte polar de auxina) durante la embriogénesis de microsporas de *Hordeum vulgare* inducida por estrés 230
Figura 81. Efecto del tratamiento con kinurenina (inhibidor de la biosíntesis de auxina) y NPA (inhibidor del transporte polar de auxina) en cultivos de embriogénesis de microsporas de *Hordeum vulgare* 232
Figura 82. Inmunolocalización de AIA en cultivos de embriogénesis de microsporas de *Hordeum vulgare* tratados con kinurenina (inhibidor de la biosíntesis de auxina) y NPA (inhibidor del transporte polar de auxina). 234
Figura 83. Principales etapas del desarrollo gametofítico del polen de *Hordeum vulgare*. 236
Figura 84. Inmunolocalización de AIA durante el desarrollo del polen de *Hordeum vulgare*. . 237
Figura 85. Cuantificación de la intensidad de la señal de inmunofluorescencia durante el desarrollo del polen de *Hordeum vulgare* 237
Figura 86. Patrones de expresión génica por qRT-PCR de *HvTAR2-like* (gen de biosíntesis de auxina) y *HvPIN1-like* (gen de transporte polar de auxina) durante el desarrollo del polen de *Hordeum vulgare*. 239
Figura 87. Cuantificación de la concentración de citoquinina endógena de tipo zeatina en su forma *trans* (*trans*-zeatina; *t*-Z) durante el desarrollo embriogénico de *Brassica napus,* utilizando cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray (LC-ESI-MS/MS). 241

Figura 88. Inmunolocalización de citoquinina de tipo zeatina en su forma trans (*trans*-zeatina; *t*Z) durante las primeras etapas de la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Brassica napus*. 243
Figura 89. Inmunolocalización de citoquinina de tipo zeatina en su forma trans (*trans*-zeatina; *t*Z) en etapas avanzadas de la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Brassica napus* 244
Figura 90. Patrones de expresión génica por qRT-PCR de genes relacionados con la citoquinina, durante la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Brassica napus*. 248
Figura 91. Cuantificación de la concentración del precursor del etileno ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) durante el desarrollo embriogénico de *Brassica napus,* utilizando cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray (LC-ESI-MS/MS) 250
Figura 92. Efecto del tratamiento con PI-55 (6-(2-hidroxi-3-metillbencilamino) purina), inhibidor de la ruta de señalización de citoquininas, en cultivos de embriogénesis de microsporas de *Brassica napus*. 252
Figura 93. Cuantificación de la concentración de citoquinina endógena de tipo zeatina en su forma trans (*trans*-zeatina; *t*-Z) durante el desarrollo embriogénico de *Brassica napus*, utilizando cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray (LC-ESI-MS/MS). 254
Figura 94. Inmunolocalización de citoquinina de tipo zeatina en su forma *trans* (*trans*-zeatina; *t*-Z) durante las primeras etapas de la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Hordeum vulgare* 255
Figura 95. Inmunolocalización de citoquinina de tipo zeatina en su forma trans (*trans*-zeatina; *t*-Z) en la fase avanzada de embrión coleoptilar de la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Hordeum vulgare*. 256
Figura 96. Principales etapas de la embriogénesis somática de *Quercus suber* 258
Figura 97. Organización celular de las principales etapas de embriogénesis somática de *Quercus suber* 260
Figura 98. Patrón temporal de pectinas esterificadas y desesterificadas durante la embriogénesis somática de *Quercus suber* 262
Figura 99. Inmunolocalización de pectinas esterificadas y desesterificadas en masas proembriogénicas, etapa temprana de la embriogénesis somática de *Quercus suber* 264
Figura 100. Controles negativos de los experimentos de inmunofluorescencia con los anticuerpos JIM5, JIM7, LM19 y LM20 en etapas avanzadas de la embriogénesis somática de *Quercus suber* 265
Figura 101. Inmunolocalización de pectinas esterificadas y desesterificadas en etapas avanzadas de la embriogénesis somática de *Quercus suber*. 267
Figura 102. Patrón de expresión génica por qRT-PCR de *QsPME* (gen de pectinmetilesterasa) y *QsPMEI* (gen inhibidor de pectinmetilesterasa) durante la embriogénesis somática de *Quercus suber*. 269
Figura 103. Actividad enzimática PME durante la embriogénesis somática de *Quercus suber* 270
Figura 104. Efecto de la inhibición de la actividad PME en la embriogénesis somática de *Quercus suber* por el tratamiento con catequina 272

Figura 105. Efecto de la inhibición de la actividad PME en la embriogénesis somática de *Quercus suber* por el tratamiento con catequina y posterior recuperación del desarrollo tras la eliminación del tratamiento..... 273
Figura 106. Inmunolocalización de pectinas esterificadas y desesterificadas en etapas avanzadas de la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Hordeum vulgare*..... 275
Figura 107. Inmunolocalización de pectinas esterificadas y desesterificadas en etapas avanzadas de la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Hordeum vulgare*..... 276
Figura 108. Inmunolocalización de pectinas esterificadas y desesterificadas en etapas avanzadas de la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Hordeum vulgare*..... 277
Figura 109. Patrón de expresión génica por qRT-PCR de *BnPME* (gen de pectinmetilesterasa) y *BnPMEI* (gen inhibidor de pectinmetilesterasa) durante la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Brassica napus*..... 278
Figura 110. Efecto de la inhibición de la actividad PME en la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Brassica napus*, por el tratamiento con catequina. 281
Figura 111. Inmunolocalización de pectinas esterificadas y desesterificadas en etapas avanzadas de la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Hordeum vulgare*..... 283
Figura 112. Patrón de expresión génica por qRT-PCR de *HvPME* (gen de pectinmetilesterasa) durante la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Hordeum vulgare*..... 284
Figura 113. Patrón temporal de AGPs durante la embriogénesis somática de *Quercus suber* 287
Figura 114. Inmunolocalización de AGPs durante la embriogénesis somáticade *Quercus suber* 289
Figura 115. Patrones de expresión génica por qRT-PCR de tres genes de AGPs durante la embriogénesis somática de *Quercus suber*..... 291
Figura 116. Efecto del bloqueo de AGPs en la embriogénesis somática de *Quercus suber* por el tratamiento con reactivos Yariv..... 293
Figura 117. Efecto del bloqueo de AGPs en la embriogénesis somática de *Quercus suber* por el tratamiento con reactivos Yariv y posterior recuperación del desarrollo tras la eliminación del tratamiento..... 294
Figura 118. Patrón de expresión génica por qRT-PCR de *HvAGP* durante la embriogénesis de microsporas de *Hordeum vulgare* inducida por estrés..... 296
Figura 119. Detección y cuantificación de muerte celular en cultivos de microsporas de *H. vulgare*, utilizando una tinción de azul de Evans..... 299
Figura 120. Efecto del tratamiento con $MnCl_2$ (inhibidor de ROS), concanamicina A (inhibidor de autofagia), E-64d (inhibidor de cisteín proteasas), leupeptina (inhibidor de serín y cisteín proteasas) y Ac-DEVD-CHO (N-Acetyl-Asp-Glu- Val-Asp-al) (inhibidor de caspasa-3) sobre la muerte celular inducida por estrés durante la embriogénesis de microsporas de *H. vulgare*. 301
Figura 121. Efecto del tratamiento con $MnCl_2$ (inhibidor de ROS), concanamicina A (inhbidor de autofagia), E-64d (inhbidor de cisteín proteasas), leupeptina (inhbidor de serín y cisteín proteasas) y Ac-DEVD-CHO (N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-al) (inhibidor de caspasa-3) sobre el inicio de la embriogénesis de microsporas de *H. vulgare*..... 303
Figura 122. Proceso de muerte celular programada (MCP) del tapetum de *Hordeum vulgare* 305

Figura 123. Inmunolocalización de las proteínas ATG5 y ATG8 durante el proceso de muerte celular programada (MCP) del tapetum de *Hordeum vulgare* 306
Figura 124. Controles negativos de la inmunofluorescencia eliminando el anticuerpo primario en las distintas fases del proceso de muerte celular programada (MCP) del tapetum de *Hordeum vulgare*..... 307
Figura 125. Inmunolocalización de las proteínas ATG5 y ATG8 durante el proceso de muerte celular programada (MCP) del tapetum de *Hordeum vulgare* 308
Figura 126. Patrones de expresión génica por qRT-PCR de los genes de autofagia *HvATG5* y *HvATG8_1* durante el proceso de muerte celular programada (MCP) del tapetum de *Hordeum vulgare*..... 309
Figura 127. Detección de PLCPs activas durante el proceso de muerte celular programada (MCP) del tapetum de *Hordeum vulgare* 312
Figura 128. Identificación de PLCPs activas durante el proceso de muerte celular programada (MCP) del tapetum de *Hordeum vulgare*. 314
Figura 129. Patrones de expresión génica por qRT-PCR de los genes *HvPap-1*, *HvPap-6* y *HvPap-19* durante el proceso de muerte celular programada (MCP) del tapetum de *Hordeum vulgare*... 316
Figura 130. Detección de formas maduras e inmaduras de PLCPs durante el proceso de muerte celular programada (MCP) del tapetum de *Hordeum vulgare*, mediante ensayos de western-blot con anticuerpos específicos de CATB3, RD21A y SAG12..... 318
Figura 131. Inmunolocalización de las proteínas Pap19-CATB3, Pap1, Pap6 y SAG12 durante el proceso de muerte celular programada (MCP) del tapetum de *Hordeum vulgare*. 320
Figura 132. Esquema de la auxina durante el desarrollo del polen *in vivo* y el desarrollo embriogénico *in vitro* de *B. napus* y *H. vulgare* 336
Figura 133. Figura resumen de los resultados obtenidos en la identificación de determinantes positivos: regulación hormonal por auxinas y citoquininas y remodelación de la pared celular operada por pectinas y AGPs (elementos en verde); y determinantes negativos: muerte celular inducida por estrés y muerte celular programada (MCP) del tapetum con activación de autofagia y proteasas PLCPs (elementos en rojo), durante el desarrollo embriogénico *in vitro* (**A**) y el desarrollo del polen *in vivo* (**B**)..... 373

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Brassica napus*. 40
Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Hordeum vulgare*. 44
Tabla 3. Clasificación taxonómica de *Quercus suber*. 49
Tabla 4. Correlación entre el tamaño de la yema floral y el estadio del desarrollo de la microspora y el polen de *B. napus*. 112
Tabla 5. Composición del medio de cultivo NLN-13. 113
Tabla 6. Estadios del desarrollo en función del tiempo transcurrido del cultivo *in vitro* de microsporas aisladas de *Brassica napus*. 118
Tabla 7. Tratamientos farmacológicos añadidos al cultivo *in vitro* de microsporas de *Brassica napus* 119
Tabla 8. Correlación entre la longitud de las aristas de la espiga y el estadio del desarrollo de las microsporas y el polen de *H. vulgare*. 122
Tabla 9. Composición del medio de cultivo KBP. 124
Tabla 10. Estadios del desarrollo en función del tiempo transcurrido del cultivo *in vitro* de microsporas aisladas de *Hordeum vulgare*. 128
Tabla 11. Tratamientos farmacológicos añadidos al cultivo *in vitro* de microsporas aisladas de *Hordeum vulgare*. 129
Tabla 12. Composición de los stocks de macronutrientes, micronutrientes y vitaminas utilizados en los medios de cultivo inducción y proliferación de embriones cigóticos inmaduros de *Quercus suber*. 130
Tabla 13. Composición de los medios de cultivo para la inducción y proliferación de embriones cigóticos inmaduros de *Quercus suber*. 131
Tabla 14. Tratamientos farmacológicos añadidos al cultivo *in vitro* de embriones cigóticos inmaduros de *Quercus suber*. 135
Tabla 15. Deshidrataciones en acetona. 148
Tabla 16. Anticuerpos primarios empleados en inmunofluorescencia (IF), *dot blot* (DB) y *western blot* (WB). 157
Tabla 17. Anticuerpos secundarios empleados en inmunofluorescencia. 157
Tabla 18. Composición de geles de poliacrilamida. 167
Tabla 19. Anticuerpos secundarios empleados en *western blot*. 172
Tabla 20. Lista de oligonucleótidos utilizados en qRT-PCR. 191
Tabla 21. Inhibidores de ROS, autofagia y proteasas utilizados como tratamientos en cultivo *in vitro* de microsporas aisladas de *Hordeum vulgare*. 300
Tabla 22. Tabla resumen del efecto de los distintos tratamientos con inhibidores en la embriogénesis de microsporas de *H. vulgare* y *B. napus*. 359

RESUMEN

EFECTORES POSITIVOS Y NEGATIVOS DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y DE MICROSPORAS DE ESPECIES CULTIVADAS Y FORESTALES: REGULACIÓN HORMONAL, PARED CELULAR Y MUERTE CELULAR

Introducción

El proceso de embriogénesis somática *in vitro* es un ejemplo fascinante de totipotencia celular y una potente herramienta biotecnológica que permite la regeneración de plantas completas a partir de la reprogramación de distintas células somáticas. Cuando la célula reprogramada es la microspora (célula precursora del polen), el proceso se denomina embriogénesis de microsporas. *In vivo*, las microsporas siguen una ruta de desarrollo estrictamente regulada que conduce a la producción del grano de polen maduro. Sin embargo, mediante tratamientos de estrés, la microspora puede reprogramarse *in vitro* hacia una ruta embriogénica, produciendo embriones y plantas haploides y doble-haploides de gran utilidad en mejora vegetal. A pesar del enorme interés de la embriogénesis somática, aún se desconocen muchos de los mecanismos que regulan este proceso, lo cual resulta clave para poder mejorar su eficiencia en especies de interés agronómico y forestal.

Objetivos y resultados

En esta tesis se han estudiado distintos efectores que actúan promoviendo o inhibiendo el proceso de embriogénesis somática, comparando su dinámica y posible implicación en tres especies modelo de interés agrario y forestal: la colza (*Brassica napus*), dicotiledónea oleaginosa; la cebada (*Hordeum vulgare*), monocotiledónea, cereal; y el alcornoque (*Quercus suber*), especie dicotiledónea, leñosa y forestal. El objetivo principal de esta tesis ha sido analizar nuevos elementos reguladores con la finalidad de conocer su papel en el inicio y la progresión de la embriogénesis somática, centrando el estudio en las hormonas auxina y citoquinina, la remodelación de la pared celular, la autofagia y las proteasas de la familia PLCP, empleándose para el estudio dos sistemas distintos de embriogénesis somática: por un lado la embriogénesis de microsporas inducida por estrés en dos especies cultivadas que requieren de distintos tratamientos de estrés térmico para la inducción de embriogénesis, calor (32^{o}C) en

B. napus y frío (4^{o}C) en *H. vulgare*, y por otro la embriogénesis somática inducida a partir de embriones cigóticos inmaduros en la especie forestal *Q. suber*. Además, en determinados análisis también se ha llevado a cabo un estudio comparativo con la ruta de desarrollo *in vivo* del polen.

Los resultados de esta tesis han permitido identificar determinantes positivos del proceso de embriogénesis como la regulación hormonal por auxinas y citoquininas y la remodelación de la pared celular operada por la metilesterificación de pectinas y las AGPs. La auxina se induce y es necesaria para la reprogramación, el inicio y la progresión de la embriogénesis, mientras que la citoquinina es necesaria mayoritariamente en etapas avanzadas del desarrollo. Las pectinas desesterificadas y las AGPs también juegan un papel crucial en las fases avanzadas, regulando la remodelación de la pared celular, necesaria para la diferenciación del embrión. Asimismo, se han identificado determinantes negativos que reducen la eficiencia de la inducción embriogénica, como es el caso de la muerte celular inducida por el estrés inductor de embriogénesis en la cual intervienen la autofagia y proteasas PLCPs, las cuales también intervienen el proceso de muerte celular programada (MCP) del tapetum que tiene lugar durante el desarrollo *in vivo* de la microspora y el polen.

Conclusiones

Todos estos datos han permitido identificar nuevos determinantes del proceso de embriogénesis somática con un papel promotor o inhibidor de la inducción, inicio y/o progresión de la embriogénesis, los cuales actúan en distintos sistemas *in vitro* y diversas especies, sugiriendo mecanismos comunes que podrían estar actuando también en otras especies de interés, abriendo así la puerta a identificar nuevas dianas que permitan mejorar la eficiencia de la embriogénesis en especies de interés y su aplicación biotecnológica en programas de mejora agroforestal.

Esta tesis ha dado lugar a 3 publicaciones en revistas científicas incluidas en el *Journal Citation Report* (JCR) y a 2 manuscritos actualmente en preparación. Estas publicaciones son las siguientes:

1. **Pérez-Pérez Y**, El-Tantawy A-A, Solís MT, Risueño MC, Testillano PS. (2019). Stress-induced microspore embryogenesis requires endogenous auxin synthesis and polar transport in barley. *Frontiers in Plant Sci*ence, 10:1200. DOI: 10.3389/fpls.2019.01200

2. **Pérez-Pérez Y**, Carneros E, Berenguer E, Solís M-T, Bárány I, Pintos B, Gómez-Garay A, Risueño MC, Testillano PS (2019). Pectin de-methylesterification and AGP increase promote cell wall remodeling and are required during somatic embryogenesis of *Quercus suber*. *Frontiers in Plant Science*, 9:1915. DOI: 10.3389/fpls.2018.01915

3. **Pérez-Pérez Y**, Bárány I, Berenguer E, Carneros E, Risueño MC, Testillano PS (2019). Modulation of autophagy and protease activities by small bioactive compounds to reduce cell death and improve stress-induced microspore embryogenesis initiation in rapeseed and barley. *Plant Signaling & Behavior*, 14:2, 1559577, DOI: 10.1080/15592324.2018.1559577

POSITIVE AND NEGATIVE EFFECTORS OF SOMATIC AND MICROSPORE EMBRYOGENESIS IN CROP AND FOREST SPECIES: HORMONE REGULATION, CELL WALL AND CELL DEATH

Introduction

The *in vitro* somatic embryogenesis process is a fascinating example of cell totipotency and constitutes an important biotechnological tool for whole plant regeneration by reprogramming of different somatic cells. When microspore (pollen precursor cell) is the reprogrammed cell, the process is known as microspore embryogenesis. *In vivo*, the microspores follow a strictly regulated gametophytic developmental pathway to produce mature pollen grains. However, in response to stress treatments, the microspore can be reprogrammed *in vitro* towards an embryogenesis pathway, producing haploid and double-haploid embryos and plants, widely used in plant breeding. However, despite the great interest of somatic embryogenesis, the regulatory mechanisms that underlie this process are still unknown. Understanding the regulation of the process will permit to improve its efficiency in species of agronomic and forestry interest.

Objectives and results

In this PhD thesis different effectors that promote or inhibit the somatic embryogenesis process have been studied, comparing their dynamics and possible involvement in three model species of interest in agriculture and forestry: rapeseed (*Brassica napus*), an oleaginous dicot plant; barley (*Hordeum vulgare*), a monocot, cereal; and cork oak (*Quercus suber*), a dicot, woody forest specie. The main objective of this thesis was to analyse new regulatory elements in order to know their role in somatic embryogenesis initiation and progression, focusing the study on the hormones auxin and cytokinin, cell wall *remodeling*, autophagy and PLCP proteases, by using two different systems of somatic embryogenesis. On the one hand, microspore embryogenesis, induced by different stress treatment in two crop plant species, heat (32°C) in *B. napus* and cold (4°C) in *H. vulgare*; and on the other hand, somatic embryogenesis induced from immature zygotic embryos in the forest specie *Q. suber*. In

addition, a comparative study has been carried out in some analyses with the gametophytic developmental pathway (*in vivo*) of the pollen grain.

The results obtained in this thesis led us to identify positive determinants of somatic embryogenesis such as hormonal regulation by auxins and cytokinins and cell wall *remodeling* controlled by methylesterification of pectins and arabinogalactan proteins (AGPs). Auxin is induced and necessary for cell reprograming, embryogenesis initiation and progression, whereas cytokinin is required mainly at advanced developmental stages. De-esterified pectins and AGPs also play a crucial role at late developmental stages in cell wall remodeling, a necessary process for embryo differentiation. Furthermore, negative factors that limit embryogenesis induction have been also identified, like cell death caused by the stress treatment required for embryogenesis induction in which autophagy and papain-like cysteine proteases (PLCPs) are involved, which are also implicated in the programmed cell death (PCD) process of the tapetum that takes place during *in vivo* development of the microspore and pollen.

Conclusions

All these data allowed to identify new determinants of somatic embryogenesis process with a promoting or inhibiting role in cell reprograming and embryogenesis initiation and/or progression that participate in different *in vitro* systems and different species, suggesting common mechanisms that could also operate in other species of interest. These findings open new possibilities to identify new targets to improve embryogenesis efficiency in species of interest and its biotechnological application in agro-forestry breeding programs.

The work performed in this thesis has given rise to three publications in scientific journals included in the Journal Citation Report (JCR) and two more manuscripts in preparation. These publications are the following:

1. **Pérez-Pérez Y**, El-Tantawy A-A, Solís MT, Risueño MC, Testillano PS. (2019). Stress-induced microspore embryogenesis requires endogenous auxin synthesis and polar transport in barley. *Frontiers in Plant Sci*ence, 10:1200. DOI: 10.3389/fpls.2019.01200

2. **Pérez-Pérez Y**, Carneros E, Berenguer E, Solís M-T, Bárány I, Pintos B, Gómez-Garay A, Risueño MC, Testillano PS (2019). Pectin de-methylesterification and AGP increase promote cell wall remodeling and are required during somatic embryogenesis of *Quercus suber*. *Frontiers in Plant Science*, 9:1915. DOI: 10.3389/fpls.2018.01915

3. **Pérez-Pérez Y**, Bárány I, Berenguer E, Carneros E, Risueño MC, Testillano PS (2019). Modulation of autophagy and protease activities by small bioactive compounds to reduce cell death and improve stress-induced microspore embryogenesis initiation in rapeseed and barley. *Plant Signaling & Behavior*, 14:2, 1559577, DOI: 10.1080/15592324.2018.1559577

INTRODUCCIÓN

1.1 REPRODUCCIÓN SEXUAL EN ANGIOSPERMAS

El registro fósil recoge datos de la aparición de las plantas angiospermas ya en el periodo Cretácico, hace 132 millones de años (Friis *et al*., 2010). Desde entonces las angiospermas, conocidas también como plantas con flor, han evolucionado exitosamente dominando la mayoría de los ecosistemas terrestres y acuáticos. Actualmente este grupo cuenta con aproximadamente 300.000 especies y supone cerca del 90% del total de especies vegetales del planeta, tratándose del grupo más abundante y diverso del reino *Plantae* y del segundo más diverso superado únicamente por los insectos. El evidente gran éxito de las angiospermas es el resultado de haber desarrollado dos importantes estructuras que aseguran su éxito evolutivo: las flores y los frutos. Evolutivamente, las flores derivaron de hojas modificadas estructural y funcionalmente que dieron lugar a los sépalos y los pétalos (que protegen las partes reproductivas), los estambres (productores de gametos masculinos) y el carpelo (que contiene los gametos femeninos). Desde este momento, las flores se convierten en un medio que le permite a la planta mantener relaciones evolutivas de cooperación con animales, principalmente insectos, que dispersan su polen a los gametofitos femeninos de forma muy específica, permitiéndole a la planta ahorrar recursos al poder disminuir la producción de gametos. En cuanto al desarrollo de los frutos, se trata de estructuras de gran utilidad para proteger el desarrollo del embrión y sirven además como un agente dispersor que ayuda a la diseminación de las semillas. Los frutos presentan estructuras muy diferentes, altamente especializadas en relación con el agente dispersante. Todo ello hace que la reproducción de las angiospermas sea más eficaz y específica que la de otras plantas.

Además, las plantas angiospermas tienen una reproducción sexual característica que implica una doble fertilización en un momento preciso durante su ciclo de vida. El ciclo de vida de las plantas angiospermas (Fig.1) se caracteriza por tener una alternancia de dos generaciones, esporofítica y gametofítica. La fase esporofítica es la dominante del ciclo y presenta una dotación cromosómica diploide (2n), mientras que la fase gametofítica surge por división meiótica de las células del esporofito y por tanto es haploide (n).

En las plantas angiospermas diferenciamos la parte masculina de la flor o estambres, que contienen los gametofitos masculinos o granos de polen; y la parte femenina de la flor o carpelo, que contiene el óvulo donde se desarrolla el gametofito femenino o saco embrionario que contiene la ovocélula. Dependiendo de la especie, ambas partes pueden estar presentes en la misma flor (planta monoclino-monoica) o en flores distintas, en cuyo caso las flores femeninas y masculinas pueden estar en el mismo pie de planta (monoica) o en distinto (dioica).

La parte masculina de la flor (o androceo) está compuesta por los estambres, formados por el filamento y la antera, la cual contiene en su interior las células madre del polen o microsporocitos (2n). Cada microsporocito se divide por meiosis dando lugar a un conjunto de cuatro microsporas haploides (n) que individualmente se desarrollarán para formar un grano de polen. La primera división mitótica de la microspora origina un grano de polen formado por dos células: la célula vegetativa y la célula generativa. A continuación, el grano de polen experimenta una segunda mitosis en la que la célula generativa se divide en dos células espermáticas que constituyen los gametos masculinos. Dependiendo de la especie, esta última división mitótica puede ocurrir en el interior de la antera en el tubo polínico tras la germinación del polen.

Por otro lado, tenemos el aparato reproductor femenino de la flor (o gineceo) formado por el pistilo, que se compone de estigma, estilo y un ovario que contiene los óvulos. En el interior del óvulo tiene lugar la meiosis del megasporocito (2n), que produce cuatro megasporas haploides (n). Tres de estas megasporas degeneran, mientras que la célula que sobrevive experimenta tres divisiones mitóticas sucesivas, formándose así el gametofito femenino o saco embrionario. El saco embrionario está formado por siete células dispuestas de la siguiente forma: la ovocélula o gameto femenino y dos células que la flanquean llamadas sinérgidas migran al extremo inferior del saco embrionario, tres células llamadas antípodas migran al extremo opuesto, y la célula restante migra al centro del saco embrionario. Esta última célula está compuesta por dos núcleos haploides que se fusionan para formar un núcleo diploide.

Una vez que se han formado los gametos masculino y femenino, tiene lugar la polinización. La polinización consiste en la llegada del polen desde los estambres hasta el estigma de la flor a través del viento, insectos u otros animales que sirven de vector. Una vez en contacto, el grano de polen desarrolla un tubo polínico que atraviesa el estilo y entra en contacto con el saco embrionario a través de una apertura en los tegumentos del mismo. En este momento, las dos células espermáticas se depositan en el saco embrionario y tiene lugar lo que se conoce como doble fertilización, un acontecimiento único propio de las plantas angiospermas. Uno de los núcleos espermáticos se fusiona con la ovocélula para formar un cigoto diploide (2n) que originará el futuro embrión. El otro núcleo espermático se fusiona con la célula diploide que permanecía en el centro del saco embrionario, formándose así una célula triploide (3n) que dará lugar al endospermo que nutrirá al embrión durante el desarrollo. La fertilización también provoca un engrosamiento en los tegumentos del óvulo que hace que éstos formen una cubierta de consistencia dura y resistente que constituye la cubierta de la semilla. Al mismo tiempo, el ovario maduro se diferencia en un fruto protector alrededor de la semilla, que más tarde facilitará su dispersión.

Según avanza el desarrollo en el interior del saco embrionario, el cigoto dará lugar a un embrión con radícula y uno o dos órganos con forma de hoja llamados cotiledones, que continuará desarrollándose hasta formar una planta completa (esporofito) tras la germinación de la semilla, cerrándose así el ciclo de vida de las plantas angiospermas (Maheshwari, 1950; Raghavan, 2000; Johri y Srivastava, 2001).

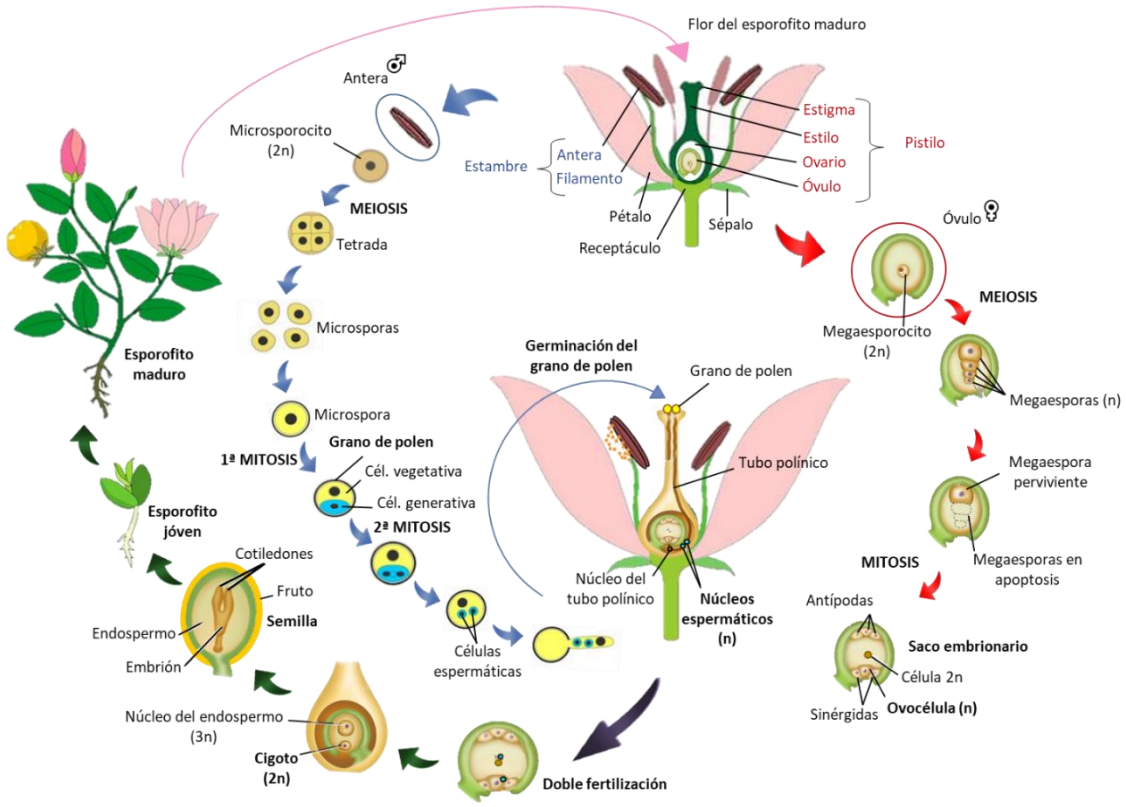


Figura 1. Ciclo de vida de las plantas angiospermas. Fuente: modificado a partir de https://www.shutterstock.com/.

1.1.1 Desarrollo del grano de polen

El grano de polen se desarrolla en el interior del aparato reproductor masculino de la flor o androceo, que está formado por los estambres, compuestos por la antera y el filamento (Fig. 2). El filamento es una estructura generalmente larga y cilíndrica que sostiene la antera. También tiene la función de transportar los nutrientes y agua hasta la antera y facilitar su exposición a los agentes polinizadores, favoreciendo así el proceso de polinización. La antera está compuesta generalmente por una, dos o tres tecas unidas por tejido conectivo. En el interior de cada teca hay dos sacos polínicos o microsporangios, en cuyo interior se desarrolla el grano de polen. En la mayoría de las angiospermas cada antera consta de dos tecas y cuatro sacos polínicos.

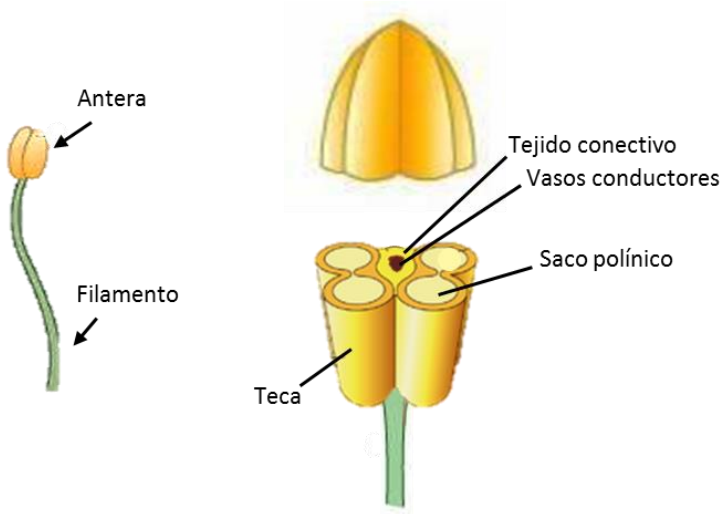


Figura 2. Aparato reproductor masculino en plantas angiospermas. Fuente: modificado a partir de https://www.esciencezone.com/2019/02/stemanmicrosporogenesis-and-development.html.

1.1.2 Morfogénesis de la antera

Antes de que tenga lugar la formación del grano de polen debe desarrollarse el aparato reproductor masculino, este proceso se denomina como morfogénesis de la antera y puede dividirse en cinco fases principales (Fig. 3). Al inicio del desarrollo, las células del meristemo floral experimentan una serie de divisiones que dan lugar al primordio de la antera (Fase I), compuesto por tres capas celulares: capa 1, capa 2 y capa 3. La capa 1 es la más externa y se diferenciará para dar lugar la epidermis de la antera. La capa 3 es la capa más interna y dará lugar en última instancia tanto al tejido conectivo como vascular. En la Fase II del desarrollo de la antera, las células de la capa subepidérmica o capa 2, aumentan su tamaño y pasan a llamarse células arqueosporiales. Estas células experimentan una serie de divisiones periclinales en la Fase III y dan lugar a una capa de células parietales primarias hacia el exterior que continúan dividiéndose y una capa de células esporógenas hacia el interior que formarán los microsporocitos o células madre del polen. Las células parietales primarias se dividen en la Fase IV dando lugar a dos capas de células parietales secundarias: la capa de células parietales localizada en la zona más externa dará lugar en la Fase V a la capa de células del endotecio y de la lámina media, mientras que las células parietales localizadas en la zona más interna darán lugar al tapetum. En esta última fase del desarrollo se puede apreciar claramente una antera tetralobulada perfectamente formada que contiene las células madre del polen en el interior del saco polínico, estando éstas rodeadas de

mayor a menor proximidad por el tapetum, la lámina media, el endotecio y la epidermis (Chang *et al*., 2011).

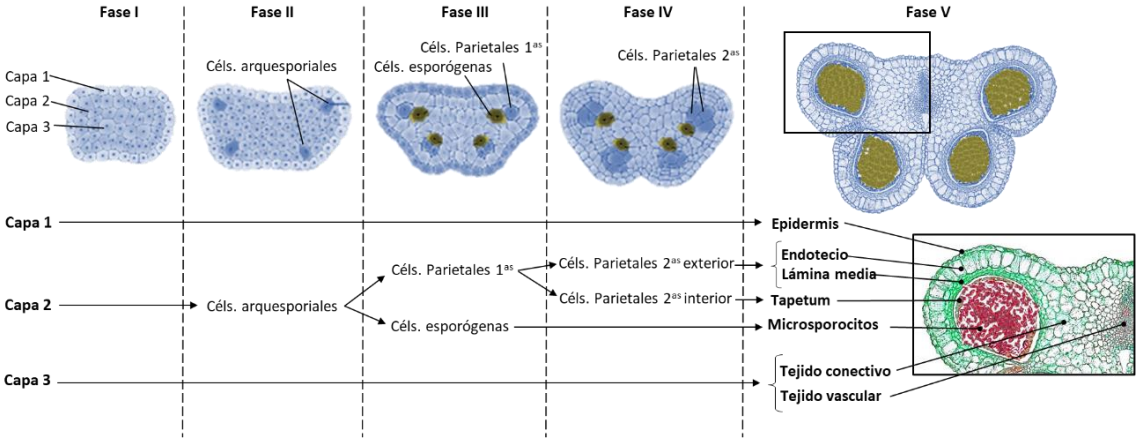


Figura 3. Morfogénesis de la antera. Fuente: modificado a partir de http://vision.cse.psu.edu/vlpr2012/papers/ma2.pdf.

1.1.3 Formación del gametofito masculino

El desarrollo de los gametofitos masculinos o granos de polen consta de dos procesos principales que acontecen secuencialmente en el interior del saco polínico de la antera a partir del tejido esporógeno. Primero tiene lugar la formación de las microsporas (o microsporogénesis) y seguidamente la formación de los gametos (o migrogametogénesis) (Stanley y Linskens, 1974; Shivanna y Johri, 1985) (Fig. 4).

Si hacemos un corte transversal a una antera joven, podemos distinguir su tejido esporógeno en la zona más interna de los cuatro sacos polínicos. Este tejido es el que dará lugar a las células madre del polen (2n), las cuales están rodeadas de una pared celular compuesta principalmente por celulosa. Cada una de estas células entra en el proceso de microsporogénesis, experimentando una división meiótica que origina una tetrada. La tetrada está formada por cuatro microsporas haploides rodeadas en conjunto por una capa de calosa que las mantiene unidas. Más tarde, las células del tapetum segregan una mezcla de calasa y otras enzimas que degradan la pared de calosa, liberándose así las microsporas individualmente en el lóculo de la antera (Scott *et al*., 2004). A continuación, las microsporas aumentan de tamaño y experimentan grandes cambios metabólicos y estructurales. Asistimos a un proceso de vacuolización citoplásmica de la microspora, que finaliza con la formación de una gran vacuola

(recibiendo la microspora en este momento el nombre de microspora vacuolada por esta característica) que ocupa la mayor parte del volumen del citoplasma y empuja al núcleo hacia la periferia, lo que otorga polaridad a la microspora. En esta etapa el núcleo contiene abundante cromatina descondensada y pequeños acúmulos de cromatina condensada, al igual que un gran nucléolo con alto componente granular debido a su alta actividad transcripcional. Seguidamente, la microspora vacuolada se divide asimétricamente por mitosis dando lugar a un grano de polen bicelular con células de muy diferente tamaño y estructura. Esta primera mitosis marca el final de la microsporogénesis y el inicio de la microgametogénesis. El grano de polen originado tras la mitosis está formado por una pequeña célula generativa y una gran célula vegetativa que contiene la mayoría de los orgánulos citoplásmicos. El núcleo de la célula generativa posee cromatina altamente condensada en comparación con el núcleo vegetativo. Inicialmente, la célula generativa está unida a la pared celular del grano de polen, formándose a continuación una capa de calosa entre las membranas plasmáticas que separan la célula generativa y vegetativa. Finalmente, la célula generativa se desprende de la pared celular del polen y se aloja dentro del citoplasma de la célula vegetativa. En esta etapa del desarrollo se inicia la reabsorción de la gran vacuola, que va desapareciendo en forma de vacuolas más pequeñas y, al mismo tiempo, van apareciendo en el citoplasma un gran número de plastidios que acumulan almidón, lípidos y otras moléculas de reserva en su interior.

En aquellas especies con polen tricelular (como es el caso de *Brassica napus* y *Hordeum vulgare*), al mismo tiempo que el grano de polen va aumentando su tamaño, la célula generativa pierde su forma esférica y va adoptando una forma de media luna alargada, abandonando su posición periférica y migrando hacia el centro de la célula. Es entonces cuando tiene lugar la segunda división mitótica del proceso de microgametogénesis. En este momento, se produce la división mitótica de la célula generativa, dando lugar a dos células espermáticas que pierden la calosa y quedan embebidas en el citoplasma de la célula generativa. De este modo, se forma un grano de polen maduro con una célula vegetativa y dos células espermáticas, preparado para la polinización. Una vez se ha completado la maduración del grano de polen, la antera

entra en un proceso de deshidratación que finaliza con la dehiscencia de la antera o antesis.

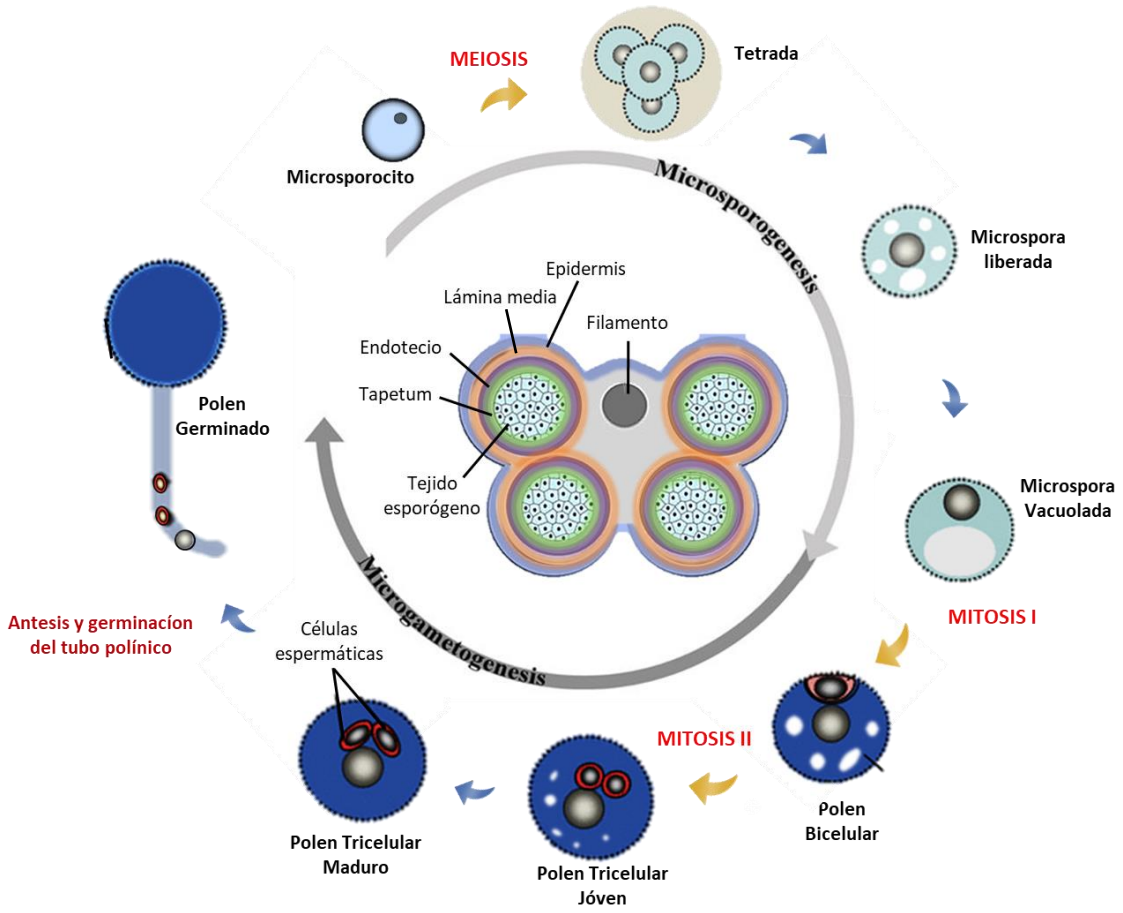


Figura 4. Desarrollo del gametofito masculino. Fuente: modificado a partir de Biancucci *et al.*, 2015.

La forma del grano de polen varía de una especie a otra. Puede ser globoso, elipsoide, fusiforme, lobulado, angular o en forma de media luna, y su tamaño varía desde los 10 µm en el especies del género *Myosotis* hasta los 200 µm en miembros de la familia *Cucurbitaceae* y *Nyctaginaceae*.

El grano de polen maduro es transportado hasta el estigma de la flor donde tiene lugar el reconocimiento. Posteriormente, la célula vegetativa del polen maduro desarrolla el tubo polínico por el que se transportan los núcleos espermáticos hasta el interior del saco embrionario donde tendrá lugar la doble fertilización. En este momento, uno de los núcleos espermáticos se fusiona con la ovocélula para dar lugar a un cigoto diploide y el otro se fusiona con la célula diploide localizada en el centro del

saco embrionario para originar el tejido triploide del endospermo (Shakya y Bhatla, 2018).

En la mayoría de las especies, entre las que se encuentran las especies de este estudio *Brassica napus* y *Hordeum vulgare*, la segunda división mitótica del polen ocurre en el interior del saco polínico de la antera tal y como se ha descrito. Sin embargo, el momento en el que la célula generativa experimenta mitosis, varía dependiendo de la especie vegetal que estudiemos. Esta segunda mitosis puede tener lugar una vez que el grano de polen se haya posado en la superficie del estigma (como ocurre por ejemplo en la especie *Holoptelea integrifolia*), después de la germinación del grano de polen antes de que éste llegue al saco embrionario (*Zea mays* y *Nicotiana tabacum*) o, raramente, cuando éste ya ha penetrado el saco embrionario (*Euphorbia terracina*).

1.1.4 Desarrollo del tapetum

A lo largo del desarrollo del grano de polen, asistimos también a modificaciones en las distintas capas y tejidos que forman la antera (Fig. 5).

La pared de la antera está formada por cuatro tejidos diferentes: epidermis, endotecio, lámina media y tapetum. La capa de células más externa es la epidermis o exotecio, la cual consiste en una única capa de células con función protectora. Según avanzamos hacia el interior de la antera, la siguiente capa que nos encontramos es el endotecio. Este tejido está formado generalmente por una monocapa de células alargadas implicadas en la dehiscencia de la antera. La dehiscencia de la antera se produce por la desecación del tejido y consecuente engrosamiento de las paredes del endotecio y ruptura de las paredes del estomio (zona de endotecio con células de membrana delgada, que constituyen una zona de menor resistencia), que fuerzan la curvatura de la epidermis de esa zona provocando su ruptura y la consecuente liberación del polen. La siguiente capa que nos encontramos por debajo del endotecio es la lámina media. Este tejido está formado por 1-5 capas de células parenquimáticas muy efímeras que se aplastan o degeneran rápidamente tras la meiosis de las células madre del polen. Por último, nos encontramos la capa de células más interna, una capa que se encuentra rodeando el tejido esporógeno y recibe el nombre de tapetum. El tapetum se compone de una única capa de células y es el tejido más cercano a los granos de polen en

desarrollo, característica que lo convierte en un importante tejido nutricional. El tapetum desempeña un papel clave como tejido secretor, proporcionando nutrientes y diversas moléculas necesarias para la formación de las microsporas y el correcto desarrollo del polen. Las células del tapetum se caracterizan por ser de gran tamaño y forma poligonal. En el momento en que se forma el tapetum sus células son uninucleadas, sin embargo, debido a divisiones mitóticas asimétricas sin citocinesis, pronto sus células se vuelven polinucleadas. Además, en ocasiones, estas células pueden llegar a fundir sus núcleos, originándose núcleos poliploides. Las células del tapetum presentan un denso citoplasma con numerosos orgánulos y un retículo endoplásmico con un gran número de ribosomas y un alto contenido en RNA que muestran su alta actividad transcripcional en esta etapa, en la que las células tapetales y los meiocitos permanecen aún conectados por plasmodesmos. Desde este momento, el papel que juega el tapetum en el desarrollo del polen es crucial, entrando repetidamente en periodos de actividad hiper-secretora hasta que prácticamente el grano de polen alcanza la madurez. En la fase final de la tetrada, el tapetum secreta una mezcla de calasa y otras enzimas que degradan la calosa que engloba a las cuatro microsporas de la tetrada, dejándolas así libres (Stieglitz, 1977). Desde este momento, el tapetum continúa secretando macromoléculas al lóculo de la antera, los cuales son incorporados por las microsporas para avanzar en el desarrollo (Pacini y Franchi, 1983). El tapetum también secreta precursores de la exina, cubierta que formará parte de la pared celular de estas microsporas libres una vez degradada la calosa. Posteriormente, una vez se ha formado el grano de polen tras la primera división mitótica, las células del tapetum sintetizan y segregan lo que se denomina como *pollenkitt*. El *pollenkitt* consiste en una mezcla de lípidos y carotenoides principalmente, que forman una capa hidrofóbica en la superficie de la exina permitiendo que los granos de polen permanezcan unidos y favoreciendo así la polinización por insectos (Pacini y Casadoro, 1981 ; Rowley y El-Ghazaly, 1992). Además, el *pollenkitt* media en el reconocimiento de los granos de polen con el estigma de la flor a fecundar, actúa como filtro contra la radiación ultravioleta y tiene función de regulador osmótico debido a su naturaleza hidrofóbica (Johri *et al*., 2001).

Sin embargo, debemos tener en cuenta que el tapetum no permanece intacto a lo largo del desarrollo, se trata de un tejido que degenera al mismo tiempo que el grano de polen termina de formarse, y lo hace mediante un proceso de muerte celular programada (MCP). Es muy importante que la MCP del tapetum se desarrolle de manera correcta, ya que cualquier defecto durante el proceso provocaría un desarrollo anormal de los granos de polen y los consiguientes defectos en la fertilidad de la planta. Este proceso de MCP comienza a hacerse visible durante la etapa de microspora vacuolada avanzada, donde las células del tapetum comienzan a disminuir la actividad metabólica y acontece una leve vacuolización de su citoplasma. Estos cambios resultan ya más evidentes en la siguiente etapa de polen bicelular, donde las células del tapetum van perdiendo su forma poligonal, la vacuolización citoplásmica es mucho mayor y experimentan una condensación y contracción de su citoplasma. Además, se condensa la cromatina de los núcleos, se fragmenta el DNA y se desintegran la mayoría de los orgánulos. Finalmente, las células del tapetum experimentan una ruptura de sus membranas, liberando su contenido al lóculo de la antera. Entre estos últimos componentes liberados se encuentra la trifina, una mezcla de sustancias hidrofóbicas e hidrofílicas derivadas de los restos celulares del tapetum, que se deposita en la superficie del grano de polen maduro y tiene función de protección (Dickinson y Lewis, 2014).

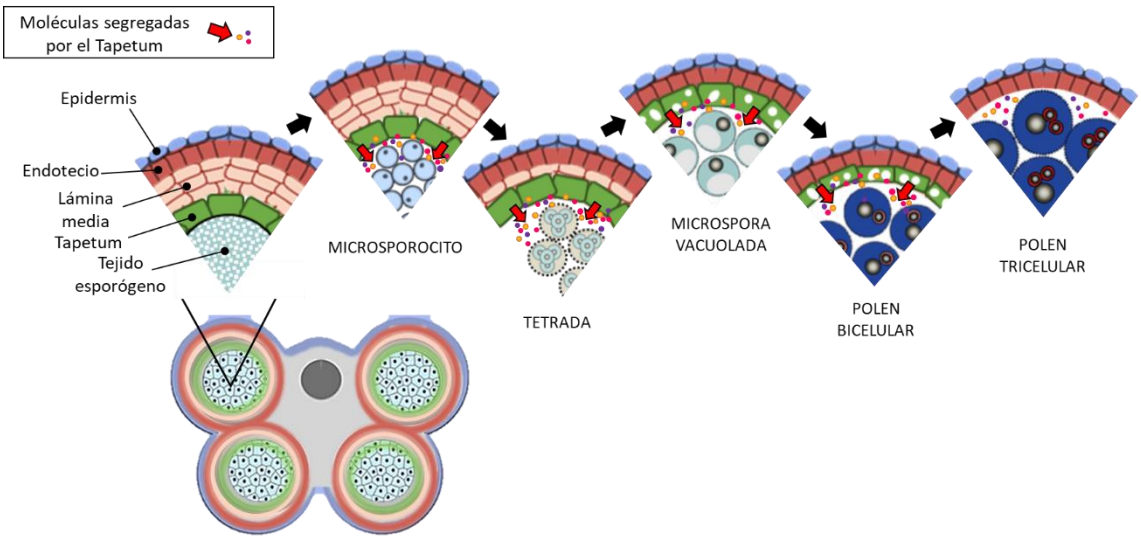


Figura 5. Modificaciones de los tejidos de la antera durante el desarrollo del polen. Muerte celular programada (MCP) del tapetum.

1.1.5 Embriogénesis cigótica

La embriogénesis es un conjunto de procesos fisiológicos que culminan con la formación de un individuo multicelular al que llamamos embrión. *In vivo*, este fenómeno recibe el nombre de embriogénesis cigótica y se inicia a partir de una única célula de dotación diploide, el cigoto, originada tras la fusión de la célula espermática con la ovocélula del saco embrionario en la doble fertilización de las plantas angiospermas. Durante este proceso tienen lugar eventos de morfogénesis, organogénesis y diferenciación celular que permiten la formación de un organismo vegetal capaz de desarrollar raíz, tallo y hojas (Goldberg *et al*., 1994)

En las **plantas dicotiledóneas** la embriogénesis cigótica comienza con una primera división asimétrica y transversal del cigoto que da lugar a una célula basal de gran tamaño y una célula apical más pequeña (Fig. 6). Con esta división queda ya marcado el futuro eje basal-apical del embrión y de la futura planta (Pritchard, 1964; Schulz y Jensen, 1968 Jürgens, 1995). La célula basal continúa dividiéndose transversalmente para formar el suspensor, órgano que permite el anclaje y posicionamiento del embrión y le aporta también los nutrientes necesarios para su correcto desarrollo a lo largo del proceso (Goldberg *et al*., 1994). Al mismo tiempo, la célula apical también continúa dividiéndose para dar lugar a un embrión temprano, denominado proembrión. Tras un número fijo de divisiones transversales y periclinales de las células del proembrión, se forma un embrión globular. Es en este estadio de embrión globular cuando tiene lugar la diferenciación de la protodermis a partir de las células superficiales (West y Harada, 1993). Al mismo tiempo, las células del embrión inician un programa de divisiones continuadas y morfogénesis que darán lugar a la formación de la hipófisis en la interfase entre el suspensor y el embrión; al procámbium, que evolucionará a formar el xilema y floema de la planta; y al meristemo basal, que formará el tejido parenquimático del embrión. De este modo, tras una serie de divisiones laterales localizadas, se forma un embrión de simetría bilateral con forma de corazón, que cuenta con dos prominencias en el dominio apical que darán lugar a los futuros cotiledones. Al mismo tiempo, la región del hipocótilo del eje se empieza a elongar y el meristemo radicular comienza a diferenciarse.

Las divisiones celulares continúan y, en consecuencia, los cotiledones y el hipocótilo siguen aumentando de tamaño y alargándose, dando lugar a un embrión con forma de torpedo donde ya se puede distinguir la diferenciación de células que forman el eje del tallo. Según avanza el crecimiento del embrión, los cotiledones alcanzan el polo apical del saco embrionario con la consiguiente curvatura del embrión, y el procámbium forma el centro del eje hipocótilo-raíz, extendiéndose a los cotiledones.

En **plantas monocotiledóneas** los estadios iniciales de la embriogénesis cigótica, hasta la formación del embrión globular, son idénticos a los de las plantas dicotiledóneas (Fig. 6). Más adelante, ambos tipos de plantas se diferencian en que las monocotiledóneas, como su nombre indica, desarrollan un único cotiledón y su desarrollo tiene lugar de forma apical. Otra diferencia con dicotiledóneas es que el tejido que da lugar al meristemo del tallo está posicionado en una hendidura lateral. En estas plantas, primero se diferencia el cotiledón y luego las otras partes del embrión, como son el meristemo del tallo o el meristemo radicular.

En ambos casos, ya se trate de una planta dicotiledónea o monocotiledónea, el proceso de embriogénesis termina con la formación del embrión maduro diploide contenido en el interior de la semilla y rodeado más externamente por el pericarpio del fruto que se formó a partir de la pared del ovario tras la fecundación. Inicialmente, el embrión está rodeado por el tejido del endospermo, originado por la fusión de uno de los núcleos espermáticos con las dos células polares del saco embriogénico. Paralelamente al desarrollo del embrión, el endospermo se va dividiendo y diferenciando en una masa de células que tienen la función de acumular gran cantidad de proteínas y lípidos de reserva, con la finalidad de emplearse como fuente de alimento del embrión después de la germinación (Mansfield *et al*., 1991). Al final del proceso de embriogénesis, el embrión madura alcanzando su máximo tamaño y es entonces cuando las capas celulares que lo rodean se deshidratan, las actividades metabólicas se detienen, y se produce un periodo de latencia que finalizará en el momento en el que se den las condiciones apropiadas para que, tras la germinación del embrión, se asegure la supervivencia de la nueva planta (Goldberg *et al*., 1989; Mansfield *et al*., 1991; West y Harada, 1993).

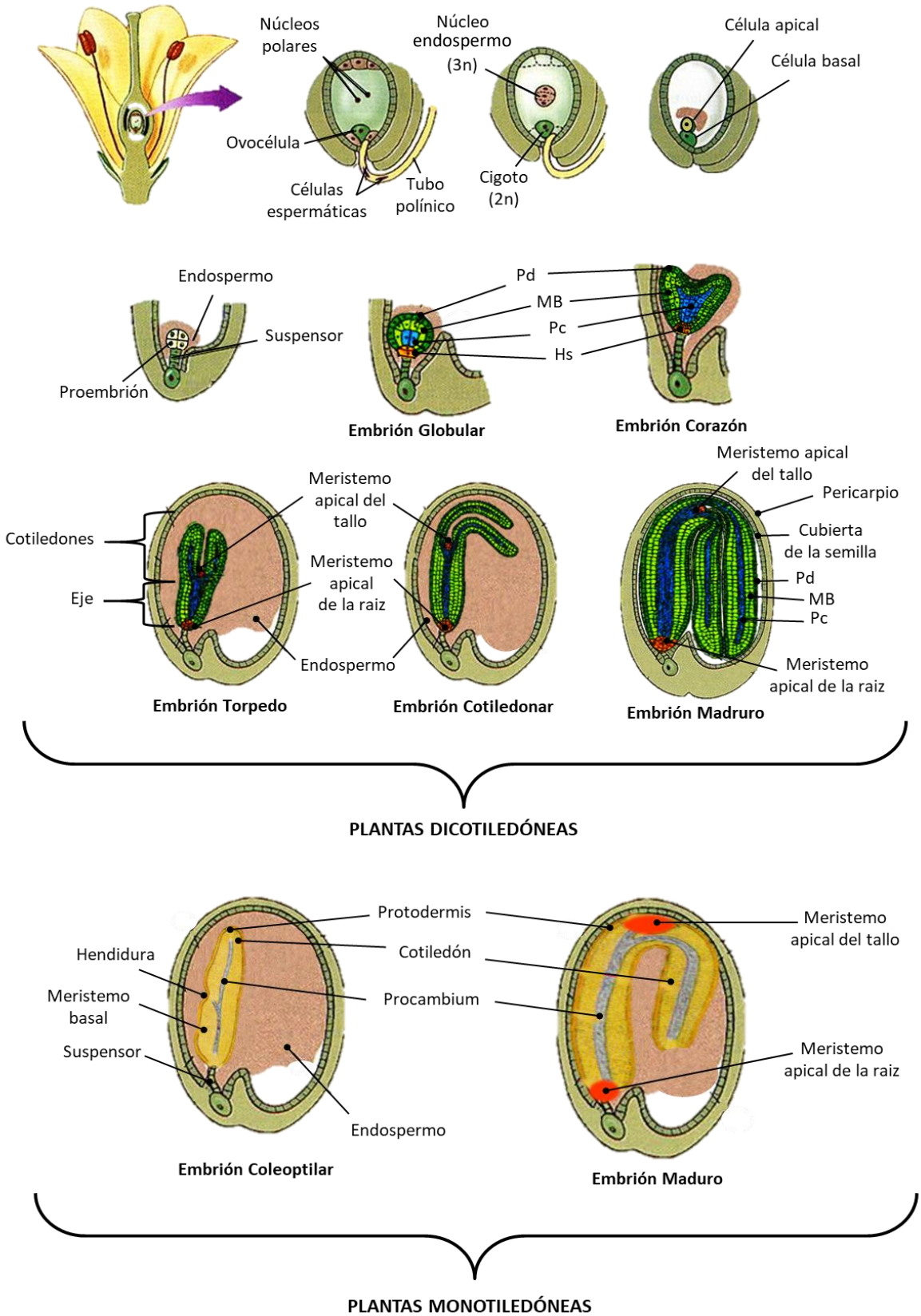


Figura 6. Embriogénesis cigótica en plantas angiospermas: dicotiledóneas y monocotiledóneas. Pd (protodermis), MB (mesistemo basal), Pc (procámbium), Hs (hipófisis). Fuente: modificado a partir de Goldberg 1994 y https://schoolbag.info/.

1.2 REPRODUCCIÓN ASEXUAL EN ANGIOSPERMAS

Las plantas angiospermas también pueden reproducirse de forma asexual mediante propágulos, estolones, rizomas o tubérculos, e incluso pueden llevar a cabo un proceso de embriogénesis asexual.

Como hemos visto, el proceso de embriogénesis tiene lugar generalmente a través de la reproducción sexual mediante la doble fertilización, que implica la fusión de dos células haploides para dar lugar al embrión diploide. Sin embargo, debido a la gran plasticidad que presentan las células vegetales, la embriogénesis también puede tener lugar de forma asexual, en ausencia de fertilización, tanto *in vivo* como *in vitro* (Fig. 7). De este modo, diferentes tipos de células totipotentes pueden ser capaces de originar un organismo completo partiendo de la formación de un embrión (Germanà y Lambardi, 2016).

En cualquier caso, ya sea *in vivo* o *in vitro*, al no haber fertilización, el embrión resultante de la embriogénesis asexual tiene la dotación cromosómica de la célula precursora a partir de la cual se formó y es genéticamente idéntico a ésta.

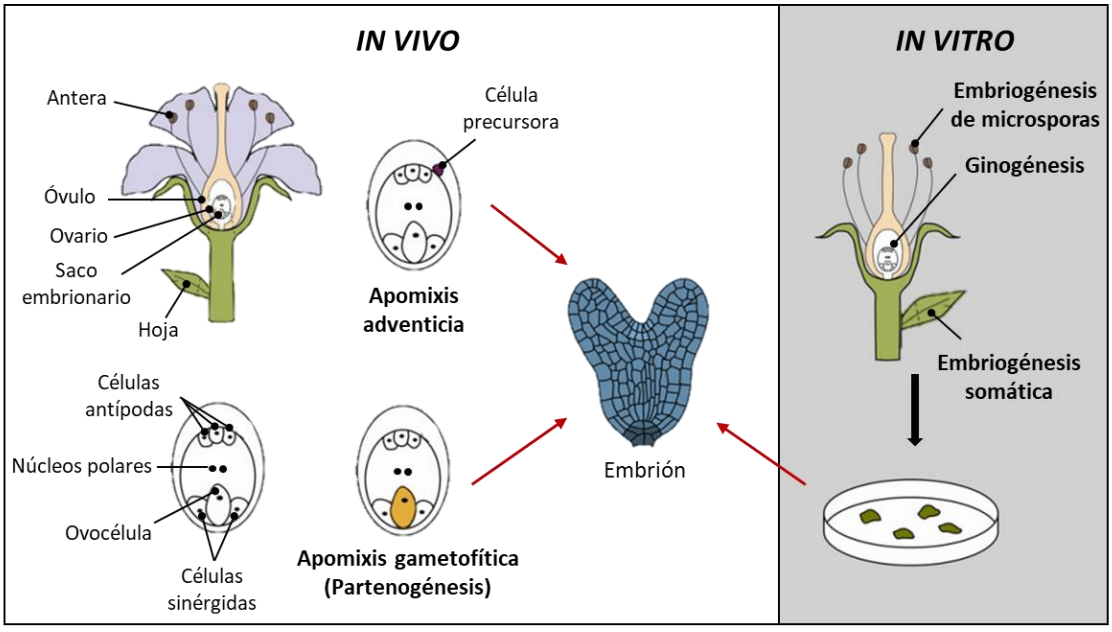


Figura 7. Reproducción asexual en angiospermas. Fuente: modificado a partir de Germaná y Lambardi, 2016 .

1.2.1 Embriogénesis asexual *in vivo*

In vivo, el proceso de embriogénesis asexual puede originarse de diversas formas (Fig. 7). Una de estas formas es la apomixis, la cual consiste en un tipo de embriogénesis donde el óvulo desarrolla un embrión dentro de la semilla sin que haya fecundación de la ovocélula. El proceso recibe el nombre de apomixis adventicia cuando la formación de los embriones tiene lugar a partir de divisiones mitóticas de una de las células somáticas del interior del óvulo, y apomixis gametofítica cuando el embrión se desarrolla por partenogénesis a partir la ovocélula (Conner y Ozias-Akins, 2017). La apomixis está presente en más de 60 familias de plantas angiospermas tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas, algunas tan importantes como las compuestas, crucíferas, gramíneas, rosáceas, leguminosas o palmáceas (Roche *et al*., 1999; Zorzatto *et al*., 2010; Worthington *et al*., 2016). Es un proceso que tiene lugar de forma espontánea y con cierta asiduidad en la naturaleza, tratándose de un evento tan natural como la embriogénesis cigótica y con casos tan conocidos como el de los cítricos, en los que ambos tipos (embriogénesis adventicia y cigótica) ocurren casi simultáneamente en el interior de la semilla.

In vivo también tiene lugar la denominada embriogénesis somática, donde el embrión se desarrolla en la superficie de algún tejido vegetal a partir de células somáticas del mismo. Por ejemplo, en especies del género *Kalanchoe* los embriones se desarrollan a lo largo del margen de la hoja, surgiendo de la proliferación de células descritas como “meristemos latentes” que se encuentran en muescas a lo largo del margen foliar (Germanà y Lambardi, 2016).

1.2.2 Embriogénesis asexual *in vitro*

Tras la observación y el estudio de estos sistemas de embriogénesis que se dan de manera espontánea en la naturaleza sin que medie la fecundación, surge la idea de desarrollar sistemas experimentales capaces de imitarla bajo condiciones controladas de laboratorio, denominándose al proceso embriogénesis *in vitro*. Estos métodos resultan muy útiles para el estudio de la embriogénesis, ya que el embrión crece fuera del gametofito femenino sin estar rodeado de las distintas capas de tejido esporofítico del óvulo que dificultan el estudio de los procesos celulares y moleculares implicados en

el proceso (Raghavan, 1990; Gomez-Jimenez y Matilla, 2006; Fernández-Otero *et al*., 2007).

1.2.3 Embriogénesis somática

En 1986, Williams y Masheshwari describieron el proceso de embriogénesis somática como un método por el cual las células somáticas diferenciadas o en proceso de diferenciación se desarrollan en plantas completas a través de las etapas embriogénicas típicas pero sin que haya fusión de gametos (Williams y Maheshwari, 1986). La embriogénesis somática permite por tanto la obtención de embriones a partir de células somáticas, sin que sea necesaria la formación previa de un cigoto (Tisserat *et al*., 1979), pudiendo evitarse así la espera hasta el momento de la reproducción natural de la planta. Este proceso es posible debido a la totipotencia que caracteriza a las células vegetales y también gracias al desarrollo de sofisticadas técnicas de cultivo *in vitro* que permiten la aplicación de sustancias reguladoras de crecimiento y estímulos adecuados para ello (Freire, 2003).

Uno de los primeros investigadores en obtener y desarrollar embriones somáticos *in vitro* fue Steward en el año 1964 (Steward *et al*., 1964), utilizando como material de partida tejidos de zanahoria. En la actualidad, la técnica *in vitro* de embriogénesis somática se lleva a cabo en un gran número de especies de interés agronómico.

Se pueden obtener embriones somáticos utilizando explantos (porción de la planta donante cultivada *in vitro*) de muy diversas partes de la planta como microsporas, óvulos, yemas, ápices radiculares y caulinares, hipocótilos, peciolos, y en general cualquier tipo de tejido u órgano con características embrionarias, meristemáticas o reproductivas (Copeland y McDonald, 1995).

La inducción de la embriogénesis somática es un proceso de desarrollo multifactorial que generalmente se inicia en respuesta a estímulos externos producidos por hormonas, ciertos tratamientos de estrés (altas o bajas temperaturas, choque osmótico o sequía, entre otros), o por una combinación de ambos (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2016; Díaz-Sala, 2019).

La inducción de la embriogénesis somática está determinada por cambios en la expresión génica de aquellas células del explanto que van a evolucionar hasta formar embriones somáticos (Sharp *et al*., 1979; Evans D. *et al*., 1981; Karami y Saidi, 2010). Parrot afirmó en 1993 (Parrot, 1993) que la inducción del estado embriogénico incluye la inducción de los mismos mecanismos genéticos que tienen lugar en la embriogénesis cigótica.

El proceso por el que las células del explanto cambian su patrón de expresión y generan los embriones somáticos iniciales está generalmente condicionado por la presencia de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo, fundamentalmente auxinas y citoquininas (Ibáñez *et al*., 2020). Sin embargo, si el explanto es suficientemente inmaduro, el proceso también puede desencadenarse en ausencia de los mismos, tanto en angiospermas (Fernández-Guijarro *et al*., 1994) como en gimnospermas (Lelu *et al*., 1999). En la mayoría de las especies, la embriogénesis somática se obtiene a partir de embriones cigóticos inmaduros (Sánchez-Romero *et al*., 2005), siendo también éste el caso de la especie *Quercus suber* (Bueno *et al*., 1992; Manzanera *et al*., 1993; Testillano *et al*., 2018), sistema experimental utilizado en esta tesis para estudiar el proceso de embriogénesis somática.

No obstante, hay ya muchos trabajos en los que obtiene embriogénesis somática a partir de cotiledones de embriones cigóticos maduros (Toribio, 1986) o a partir de tejidos no embrionarios como son las hojas procedentes de plantas jóvenes (Fernández-Guijarro *et al*., 1994; Rancillac *et al*., 1996; Cuenca *et al*., 1999) o adultas (Fernandez-Guijarro, 1997; Toribio *et al*., 2000), o a partir de segmentos nodales (El Maâtaoui, 1990; Trindade y Pais, 2003).

En muchos sistemas experimentales desarrollados para especies recalcitrantes, el establecimiento de un protocolo eficiente de embriogénesis somática se basa en el uso de material juvenil como fuente de explantos (Carman, 1990; Karunaratne *et al*., 1991), ya que las células de éste presentan mayor totipotencia que las de un tejido maduro. La poca capacidad del tejido maduro para iniciar cultivos embriogénicos es hasta el momento la mayor limitación de la embriogénesis somática en especies leñosas (Merkle *et al*., 1995).

Cuando llevamos a cabo la embriogénesis somática *in vitro*, hay que tener en cuenta una serie de factores que influyen en el proceso: el genotipo de la planta (Rodrigues-Otubo *et al*., 2000), las condiciones de cultivo (Bornhoff y Harst, 2000), los reguladores de crecimiento y el resto de componentes del medio de cultivo (Perrin *et al*., 2001), así como el tipo de explanto con que se trabaja y su estado fisiológico (Fiore *et al*., 2002).

Dependiendo de las características de las células del explanto y de la eficacia del tratamiento de inducción al que se sometan, podemos obtener dos tipos de respuesta: 1) la inducción puede conducir a la formación de embriones directamente a partir de una célula o grupo de células del explanto (**embriogénesis somática directa**), o 2) puede dar lugar a la proliferación de masas de células embriogénicas que más adelante darán lugar a embriones (**embriogénesis somática indirecta**) (Smertenko y Bozhkov, 2014; Fehér, 2015) (Fig. 8). En algunos casos, los embriones ya desarrollados actúan como fuente de producción de nuevos embriones, denominándose a este proceso embriogénesis secundaria o recurrente (Raemakers, 1993; Puigderrajols *et al*., 1996).

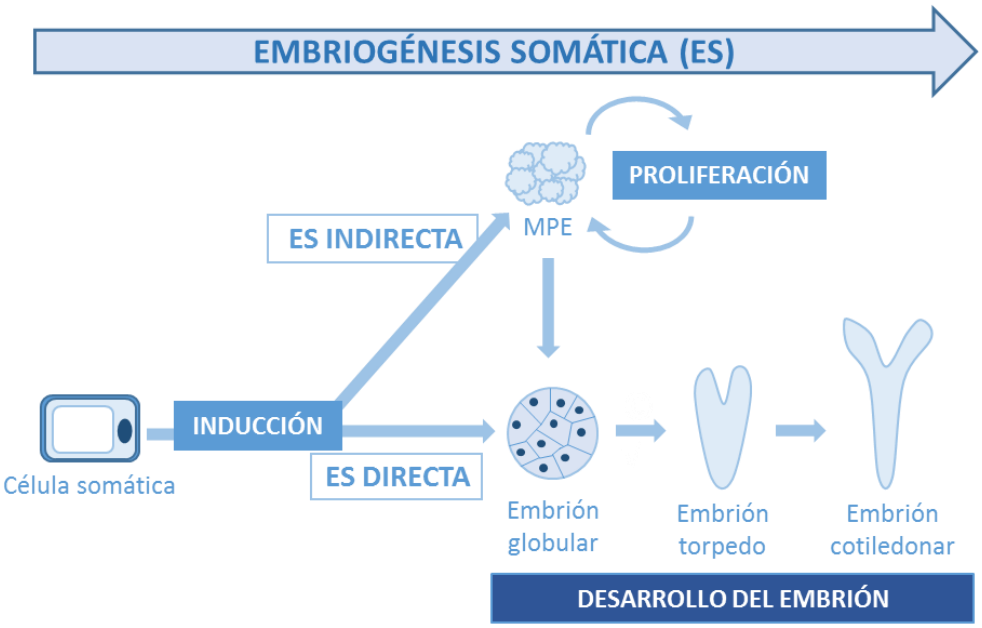


Figura 8. Descripción esquemática del proceso de embriogénesis somática. Fuente: modificado a partir de Ibañez *et al*., 2020.

Los embriones somáticos presentan similitudes y diferencias con el embrión cigótico. El desarrollo del embrión sigue prácticamente el mismo patrón de desarrollo que el embrión cigótico pasando por las mismas etapas estructurales y tiene el potencial de formar un nuevo individuo capaz de desarrollarse como una planta completa. Sin embargo, el embrión somático no tiene suspensor y tampoco permanece en estado de latencia. Además, los embriones somáticos presentan la ventaja de tener autonomía frente al tejido precursor, por lo que puede ser separado del mismo sin dañar ninguna conexión vascular. Por tanto, este sistema de propagación permite obtener de forma rápida una gran cantidad de embriones sin necesidad de esperar a los periodos reproductivos de la planta (Leal *et al*., 2004), obteniéndose en un solo proceso estructuras completas con ápice y raíz, que pueden ser perfectamente almacenadas y encapsuladas. Todos estos conocimientos tienen su aplicación en propagación y mejora de plantas, en saneamiento de enfermedades, en conservación de germoplasma y en ingeniería genética y selección de especímenes transformados (Klimaszewska *et al*., 2016).

1.2.4 Embriogénesis de la microspora

La embriogénesis de microsporas es un tipo de embriogénesis somática llevado a cabo mediante técnicas *in vitro*, en el que se induce la formación de un embrión partiendo de la microspora como célula precursora. Los primeros embriones obtenidos mediante esta técnica datan de 1964 (Guha y Maheshwari, 1964). Guha y Maheshwari estudiaban el desarrollo del polen cultivando *in vitro* en medio sólido anteras de la solanácea *Datura innoxia*, cuando observaron la aparición de embriones que emergían del interior de las anteras, los cuales posteriormente continuaban el desarrollo hasta formar plántulas completas. Al analizar la dotación cromosómica de las mismas, vieron que la haploidía de estas plantas demostraba su origen a partir de las microsporas o pólenes en desarrollo y no del tejido de la antera (Guha y Maheshwari, 1966). A partir de este momento, la técnica se aplicó a muchas otras especies (Raghavan, 1986).

A pesar del éxito del cultivo *in vitro* de anteras, pronto surgió la necesidad de un entendimiento mayor del proceso de obtención de embriones haploides. En 1969, Nitsch y Nitsch (Nitsch y Nitsch, 1969) lograron poner a punto una nueva metodología

de cultivo a partir de microsporas aisladas con el fin de eliminar la barrera que supone la pared de la antera. La pared de la antera supone una barrera no solo para la observación microscópica directa de la evolución de la microspora durante el proceso, sino también para la transferencia de componentes desde el medio de cultivo hasta las microsporas. Además, estos tejidos añaden al sistema una serie de sustancias que dificultan el control de la inducción y desarrollo del embrión, sin olvidar que con esta metodología no se tiene la completa seguridad de que los embriones obtenidos por cultivo de anteras deriven de microsporas y no de células somáticas con dotación diploide.

Ya sea a partir del cultivo de anteras o de microsporas aisladas, el proceso consiste en desviar la microspora de su ruta normal de desarrollo gametofítico (que originaría en última instancia un grano de polen maduro), hacia una ruta embriogénica que tiene como finalidad la obtención de un embrión haploide. Este embrión puede continuar su desarrollo dando lugar a plantas haploides o duplicar su dotación cromosómica de manera espontánea o inducida mediante la aplicación de agentes antimitóticos como la colchicina, originando así plantas doble-haploides (DHs).

Esta reprogramación de la microspora requiere de la aplicación de tratamientos específicos de estrés como pueden ser el frío, el calor o el ayuno (Touraev *et al*., 1996; Shariatpanahi *et al*., 2006) en un estadio determinado del desarrollo del polen que presente una mayor respuesta a la reprogramación a embriogénesis. El tipo de estrés que debemos aplicar varía dependiendo de la especie con la que trabajemos. Por ejemplo, en *Nicotiana tabacum* el estrés que consigue mayor éxito en la tasa reprogramación es el ayuno (Kyo y Harada, 1986). Por otro lado, el elegir la etapa del desarrollo más susceptible a la reprogramación es clave, siendo la microspora vacuolada la fase más adecuada para inducir la embriogénesis en la mayoría de las especies (González-Melendi *et al*., 1995; Bárány *et al*., 2005;). En esta tesis, se trabaja con la reprogramación embriogénica de *Brassica napus* y *Hordeum vulgare*. En ambas plantas, la etapa del desarrollo más susceptible a la reprogramación es la microspora vacuolada y el estrés aplicado para la inducción es un estrés térmico por calor en el primer caso y por frío en el segundo.

Tras aplicar el estrés inductor pueden ocurrir varias cosas. Si la microspora responde positivamente al estímulo, observaremos como ésta abandona la ruta gametofítica, dividiéndose de forma simétrica para dar lugar a dos células de tamaño y morfología similar, que continúan dividiéndose y avanzando en el programa de desarrollo embriogénico para formar estructuras más complejas que finalmente originarán un embrión maduro. También puede ocurrir que el estrés aplicado no sea eficaz para la reprogramación de la microspora. Si se da esta situación, podemos observar como la microspora continúa su desarrollo dentro del programa gametofítico o puede darse el caso en el que la microspora pare su desarrollo y entre en un proceso de muerte celular durante los primeros días de cultivo (Maraschin *et al*., 2005; Satpute *et al*., 2005; Rodríguez-Serrano *et al*., 2012). La situación más común es que, tras la aplicación del estrés inductor, un gran número de microsporas no reprogramadas coexistan en el cultivo *in vitro* con un número mucho menor de microsporas que se han conseguido reprogramar.

Las microsporas reprogramadas con éxito abandonan la ruta gametofítica y continúan su desarrollo siguiendo una ruta embriogénica (Fig. 9). En esta ruta, la microspora aumenta su tamaño, observamos fragmentación de su vacuola y se forma un plano de división que conduce hacia la formación de un embrión (Testillano, 2019). El primer indicio de inducción es una primera división de la célula que da origen a un proembrión de dos células. Estas células continúan dividiéndose y, a medida que aumenta la proliferación celular, se obtienen estructuras multicelulares que, al aumentar su tamaño, producen la rotura de la exina que recubre la microspora y los proembriones más jóvenes (Testillano, 2019). El embrión que se origina continúa el desarrollo siguiendo los mismos patrones que el embrión cigótico. En el caso de plantas dicotiledóneas, los proembriones continúan proliferando hasta formar el embrión globular, luego aparecen los primordios de los cotiledones que definen la etapa de embrión corazón con simetría bilateral y estos cotiledones continúan alargándose hasta formar el embrión torpedo y finalmente, tras varios episodios de proliferación y diferenciación, se forma el embrión cotiledonar. Si se trata de plantas monotiledóneas, el embrión pasa por los estadios de embrión globular, transicional, escutelar y coleoptilar (Testillano, 2019).

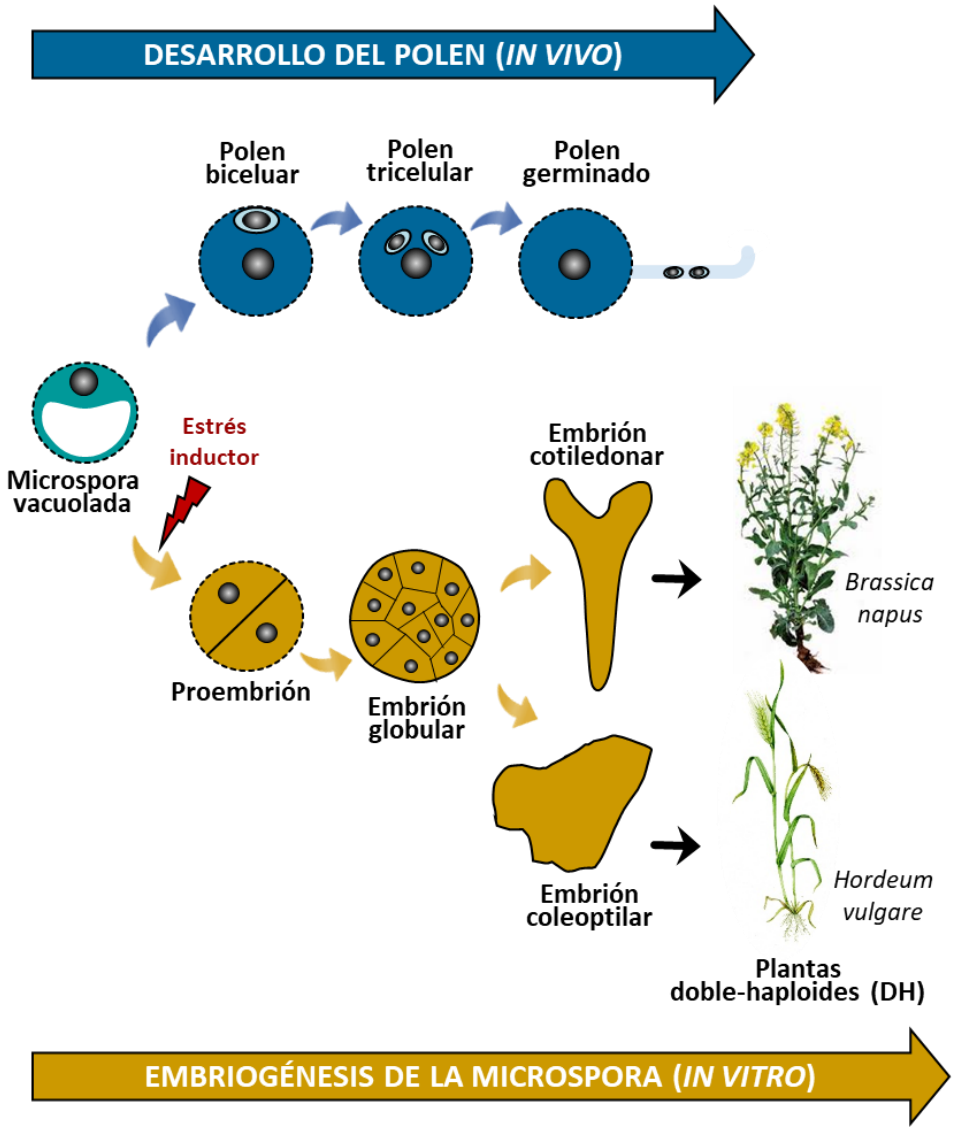


Figura 9. Embriogénesis de la microspora, reprogramación *in vitro*.

Si los embriones obtenidos por embriogénesis de la microspora permanecen en estado haploide, darán lugar a una planta con flores estériles y, en algunos casos, con malformaciones (Murovec y Bohanec, 2012). Dependiendo de la especie, puede tener lugar la diploidización espontánea de un porcentaje de los embriones obtenidos. En cereales, la tasa de diploidización espontánea es muy elevada y, por el contrario, muy baja en la mayoría de hortícolas y árboles, donde la diploidización es inducida mediante la aplicación de tratamientos con distintos agentes antimitóticos como la colchicina, amiprofos metil, trifluralina, orizalina o pronamida. (Jain *et al*., 1996; Barnabás *et al*., 1999; Pintos *et al*., 2007; Murovec y Bohanec, 2012). La frecuencia de diploidización espontánea ha sido descrita en especies como la colza (entre el 40-50%), el maíz (en

torno al 40%), el arroz (60%) y la cebada y el centeno (90%) (Castillo *et al*., 2009; Prem *et al*., 2012; Ren *et al*., 2017), siendo la fusión nuclear el principal mecanismo descrito para la diploidización espontánea de cereales (Shivanna y Johri, 1985; Kasha *et al*., 2001; Testillano *et al*., 2004; González-Melendi *et al*., 2005).

La embriogénesis de microsporas es por tanto una importante herramienta biotecnológica para la obtención de plantas haploides o DHs, siendo de gran utilidad en programas de mejora vegetal para la obtención de nuevas variedades y, en ciencia básica, para estudiar los mecanismos propios del proceso de embriogénesis (Ferrie y Caswell, 2011; Germanà y Lambardi, 2016).

1.2.5 Factores determinantes de la inducción embriogénica

Actualmente, la técnica de embriogénesis *in vitro* de microsporas ha sido descrita en más de 250 especies vegetales, con distinto grado de eficiencia. Entre las más exitosas se incluyen especies herbáceas cultivadas de interés agronómico como el maíz, la cebada, el arroz, el tabaco, el trigo y la colza (Maluszynski *et al*., 2003), y especies leñosas de interés forestal como el mandarino, el naranjo amargo o el alcornoque (Bueno *et al*., 1997; Srivastava y Chaturvedi, 2008; Germanà, 2009; Germanà y Lambardi, 2016). Sin embargo, a pesar del éxito de la técnica en algunas especies, la mayoría de ellas presentan una eficiencia muy baja o incluso nula en la obtención de embriones (Alisher Touraev *et al*., 2001; Ferrie *et al*., 2005; Malik *et al*., 2008). Algunos de los factores determinantes de la inducción embriogénica son:

Genotipo de la planta

El genotipo de la planta que utilizamos como donadora es uno de los factores más influyentes en la eficiencia de la inducción embriogénica. Por tanto, existirán diferencias en la respuesta a la inducción entre plantas de especies diferentes, pero también entre variedades dentro de una misma especie.

Esta capacidad de reprogramación de la microspora hacia una ruta embriogénica, abandonando la ruta de desarrollo gametofítico que está programada a seguir en un principio, es además un carácter hereditario recesivo controlado por más de un gen

según mostraron estudios llevados a cabo en la especie *Solanum tuberosum* (Smýkal, 2000).

A pesar de todos los estudios llevados a cabo, hoy en día todavía se desconoce la causa de que unos genotipos respondan mejor que otros a la inducción o incluso el motivo de que algunos de ellos sean totalmente recalcitrantes.

Estado fisiológico y condiciones de crecimiento de la planta donante

Otro factor que influye en la respuesta embriogénica es la edad de la planta, viéndose disminuida según transcurren las floraciones (Germanà, 2011), salvo en contados casos como *Aesculus carnea* (Marinkovié y Radojevié, 1992), donde se obtiene mejor respuesta en árboles de entre 40-100 años que en los menores de 40 años. También son determinantes los factores ambientales que controlan el crecimiento de la planta tales como el fotoperiodo, la intensidad de la luz, la temperatura, la humedad o los nutrientes disponibles (Kasha *et al*., 1990; Mayakaduwa y Silva, 2018). Lo idóneo es cultivar las plantas que vayamos a utilizar como donadoras en cámaras de crecimiento o invernaderos donde todos estos parámetros puedan ser ajustados y controlados, y donde además se reduce el riesgo de infección o contaminación que tantos problemas acarrean a la hora de trabajar con cultivos *in vitro* (Maluszynski *et al*., 2003; Ferrie y Caswell, 2011) y que además reducen drásticamente el éxito de la inducción (Wang *et al*., 2000).

Etapa del desarrollo del material de partida

No todas las especies son susceptibles a la reprogramación en el mismo estadio del desarrollo. Sin embargo, la mayoría de estudios sostiene que el pico de mayor respuesta al estrés inductor se obtiene en el estadio de microspora vacuolada tardía (antes de la primera división mitótica) (Raghavan, 1986; Gozález-Melendi *et al*., 1995; Maraschin *et al*., 2005; Germanà, 2011; Murovec y Bohanec, 2012). En este estadio, la célula mantiene características proliferativas y todavía no presenta un grado de diferenciación muy alto, manteniendo una elevada actividad transcripcional que le permite desviarse de su ruta de desarrollo hacia la ruta embriogénica alternativa (Gozález-Melendi *et al*., 1995; Seguí-Simarro *et al*., 2011; Mayakaduwa y Silva, 2018).

Siguiendo el mismo razonamiento, los granos de polen más maduros, aunque presentan mayor resistencia a la muerte celular durante el cultivo, son mucho más difíciles de desviar hacia la ruta embriogénica (Soriano *et al*., 2014), siendo prácticamente imposible el poder utilizarlos en esta metodología.

En la práctica, con el fin de obtener el mayor porcentaje de microsporas inducidas en nuestro cultivo, es muy útil establecer caracteres morfológicos fácilmente observables que nos ayuden a identificar el estadio óptimo de las flores jóvenes de las que vamos a extraer las microsporas. Por ejemplo, en plantas que presentan flores individuales, como es el caso de *Brassica napus*, podemos seleccionar el estadio del desarrollo en base al tamaño del botón floral. Otro caso diferente es el de las plantas que presentan inflorescencias en forma de espiga, como por ejemplo *Hordeum vulgare*, donde se selecciona la etapa en base al tamaño de la espiga. Además, en esta especie, la madurez de las flores muestra un gradiente acrópeto a lo largo de la espiga, debiendo tener en cuenta para los ensayos que las flores más maduras se encuentran en la base y las más jóvenes en la zona apical. En el caso de *Nicotiana tabacum* un carácter observable para determinar la etapa del desarrollo de las microsporas de sus flores es el ratio de distancia entre el pétalo y el sépalo (Silva, 2012).

Estrés inductor

Otro factor clave relacionado con la eficiencia de la inducción es el tratamiento inductor aplicado a las microsporas. Este estrés inductor debe ser capaz de someter a las microsporas a un conjunto de cambios fisicoquímicos capaces de promover una respuesta de estrés que conlleve un cambio en el desarrollo hacia una ruta embriogénica. Por ello, es imprescindible averiguar qué estrés inductor es el adecuado para cada especie y variedad. Se puede utilizar un estrés físico, empleando choches térmicos de frío o calor; un estrés fisiológico, sometiendo a las células a un estado de ayuno por falta de carbono o nitrógeno, o a un estrés hídrico ya sea por exceso o por falta de agua; o químicos, utilizando por ejemplo agentes que elevan la presión osmótica, hormonas, etanol, colchicina, etc. Incluso en algunos casos, la obtención de respuesta embriogénica implica la combinación de varios tipos de estrés (Shariatpanahi *et al*., 2006; Islam y Tuteja, 2012). De entre todos ellos, el choque térmico, ya sea por

frío o por calor, se ha considerado como el estrés más eficaz a la hora de inducir el desarrollo embriogénico de las microsporas (Germanà, 2011).

Composición del medio de cultivo

Hay que tener en cuenta que el medio de cultivo, además de proporcionar nutrientes a las microsporas, puede contribuir a la inducción de la embriogénesis si elegimos una composición adecuada (Germanà, 2011). Los requerimientos particulares para cada especie se han identificado mediante un proceso empírico de prueba y error. Es necesaria una fuente de carbono como fuente de energía (generalmente sacarosa o maltosa), macronutrientes (con especial importancia del nitrógeno), micronutrientes (como el cobre y el zinc, entre otros), pueden también añadirse osmoreguladores como el manitol o el sorbitol, y en algunos casos vitaminas, aminoácidos y reguladores de crecimiento, siendo la auxina y/o la citoquinina los más comúnmente utilizados. A lo largo de los años, se han desarrollado medios de cultivo estándar que han resultado útiles en diferentes especies. Los medios de cultivo más utilizados son el N6 (Chu, 1978), MS (Murashige y Skoog, 1962), NN (Nitsch y Nitsch, 1969) y B5 (Gamborg *et al*., 1968). En algunos casos estos medios se utilizan en su forma original, pero es muy común modificarlos con algún suplemento según el requerimiento del genotipo con el que trabajemos.

Densidad celular

No debemos olvidarnos del principal protagonista dentro del medio de cultivo, las microsporas. En este aspecto, si se trata de un cultivo de microsporas aisladas en medio líquido, debemos tener muy en cuenta la densidad celular que debe tener nuestro cultivo para que la técnica prospere correctamente. Algunos investigadores consideran que una densidad no muy elevada de microsporas en el medio de cultivo (de $2x10^4$ a $2x10^5$ microsporas por mililitro) resulta más efectiva para que se produzca la inducción de embriones, ya que disminuye la competencia por los nutrientes y el espacio para que se sucedan correctamente las divisiones celulares. Sin embargo, la densidad célular óptima del cultivo varía según la especie. Por ejemplo, en cultivos modelo como *Zea mays* la densidad óptima es de 20.000-70.000 microsporas/ml; en *Hordeum vulgare*, es

de 110.000 microsporas/ml; en *Brassica rapa* 100.000 microsporas/ml; y en *Brassica napus* de 40.000-80.000 microsporas/ml (Maluszynski *et al*., 2003; Prem *et al*., 2012; Rodríguez-Serrano *et al*., 2012)

1.3 APLICACIONES DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y DE MICROSPORAS EN MEJORA AGROFORESTAL

1.3.1. Interés de la embriogénesis de microsporas y los doble-haploides

La embriogénesis de microsporas es el método más utilizado para la producción de doble-haploides.

Las plantas doble-haploides son homocigotas completas para cada locus, lo que las convierte en importantes herramientas biotecnológicas para mejora vegetal, permitiendo acortar los programas de mejora (Maluszynski *et al*., 2003; Forster *et al*., 2007; Murovec y Bohanec, 2012).

En comparación con los métodos de mejora tradicional, la embriogénesis de microsporas permite obtener líneas isogénicas viables en tan solo una generación, mientras que este resultado implicaría varias generaciones de autofecundación y selección si se siguieran los métodos convencionales (Forster *et al*., 2007). Se trata por tanto de una importante herramienta biotecnológica a la hora de abordar estrategias como la selección *in vitro* de caracteres de interés (resistencia a patógenos, tolerancia a situaciones de estrés, etc.) o la creación de nuevas variedades. Los doble-haploides son además especialmente útiles para acortar los programas de mejora en especies con largos ciclos reproductivos, fuerte tendencia a la alogamia y alto grado de heterocigosidad, como ocurre en especies arbóreas, donde los métodos tradicionales de mejora genética son difícilmente aplicables. Por otro lado, resultan muy útiles en estudios genéticos de herencia de caracteres cualitativos y cuantitativos, detección de ligamientos genéticos, determinación de valores de recombinación genética, detección de posibles interacciones genéticas y eliminación del componente dominante, permitiendo la expresión diferencial de caracteres de naturaleza recesiva, transformación genética, mapas genéticos, marcadores ligados a genes, clonación de genes de interés, etc.

Los doble-haploides también son una herramienta muy útil en estudios de mutagénesis para la selección génica y *screening* de mutantes recesivos, permitiendo una fácil detección y selección de genes recesivos, ya que el fenotipo de las plantas obtenidas no estaría afectado por los efectos de dominancia (Pintos *et al*., 2014).

Además, los doble-haploides pueden ser utilizados como líneas parentales para la producción de híbridos, aumentándose así la eficiencia de selección debido a que los caracteres mejorados fijados en alelos recesivos se expresan en sólo una generación. Del mismo modo, debido a la naturaleza homocigota de los doble-haploides, los alelos recesivos deletéreos son eliminados en las primeras etapas de los programas de mejora (Prem *et al*., 2004; Germanà, 2011; Murovec y Bohanec, 2012; Dwivedi *et al*., 2015).

Otra ventaja que supone utilizar doble-haploides en programas de mejora es el incremento de ganancia génica, ya que las plantas doble-haploides se obtienen a partir de microsporas individuales y por tanto, gracias a la recombinación meiótica, éstas contienen nuevas combinaciones de genes que suponen nuevos productos recombinantes de los genomas parentales fijados en el homocigoto (Prem *et al*., 2004; Gurushidze *et al*., 2014; Dwivedi *et al*., 2015; Ren *et al*., 2017; Rustgi *et al*., 2017).

Además, la embriogénesis de microsporas no solo supone una ventaja para los programas de mejora, también resulta muy útil como sistema modelo en ciencia básica para el estudio de la embriogénesis ya que los embriones producidos *in vitro* son prácticamente idénticos a los embriones cigóticos y siguen procesos de desarrollo similares, con la ventaja de que no hay interferencia de tejido materno que dificulte el estudio (Supena *et al*., 2008; Seguí-Simarro y Nuez, 2008).

La embriogénesis *in vitro* de microsporas supone por tanto un método rápido, eficaz y de bajos costes para la generación de líneas isogénicas que pueden ser utilizadas en programas de mejora vegetal (Testillano, 2019), y son muchos los grupos de investigación que han trabajado y trabajan en su puesta a punto en diferentes especies de interés (Magoon y Khanna, 1963; Kasha, 1974; Zhang *et al*., 1990; Jain *et al*., 1996; Smýkal, 2000; Maluszynski *et al*., 2003; Andersen, 2005; Palmer *et al*., 2005; Germanà *et al*., 2006; Forster *et al*., 2007; Xu *et al*., 2007; Dunwell, 2010; Germanà, 2011; Bhatia *et al*., 2016; Testillano *et al*., 2018; Nowicka *et al*., 2019).

1.3.2. Interés de la embriogénesis somática

Los sistemas de embriogénesis somática *in vitro* son muy útiles en programas de mejora y estrategias de conservación y propagación de plantas (Germanà y Lambardi, 2016; Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2016). En especies forestales, los programas clásicos de mejora genética presentan muchas limitaciones a causa de los largos periodos reproductivos de estas especies, así como por la dificultad de conservar sus semillas y de llevar a cabo una reproducción vegetativa. Por todo ello, la embriogénesis somática resulta ser una herramienta muy útil por su gran potencial a la hora de llevar a cabo propagaciones a gran escala, así como por su capacidad para criopreservar genotipos de interés o llevar a cabo estrategias de transformación (Testillano *et al*., 2018).

Con el fin de aumentar el conocimiento sobre el funcionamiento de la embriogénesis somática *in vitro*, en esta tesis se han estudiado distintos factores implicados en el proceso de embriogénesis de especies tanto agrícolas (*Brassica napus* y *Hordeum vulgare*) como forestales (*Quercus suber*): implicación hormonal de auxinas y citoquininas, remodelación de la pared celular asociada a cambios en la metilesterificación de pectinas y niveles de proteínas de arabinogalactano, importancia de la muerte celular programada y posible participación de autofagia y proteasas relacionadas con el proceso de muerte celular.

1.3.3 Limitaciones en la aplicación de la embriogénesis somática y de microsporas

A pesar del gran interés que supone la embriogénesis tanto para la investigación como para las empresas de mejora genética, el encontrar condiciones eficientes para la regeneración de plantas *in vitro* a partir de células somáticas, ya sean microsporas, protoplastos o células de tejidos vegetativos, se ha convertido en un gran desafío en muchas especies de plantas de interés tanto agrícolas como forestales. El conocimiento adquirido en los últimos años, ha revelado que el inicio y la progresión de la embriogénesis somática y de microsporas involucran una compleja red de factores, cuyos papeles aún se desconocen en gran medida (Testillano, 2019; Ibáñez *et al*., 2020). Entre estos factores se encuentra la regulación hormonal, la remodelación de la pared celular, la muerte celular o el control epigenético. El tratamiento de estrés aplicado para cambiar el programa de desarrollo celular de las microsporas puede producir como

consecuencia daño celular e incluso muerte celular. En diversos estudios se ha observado que la muerte celular producida por el estrés inductor es un factor relevante que reduce en gran medida el rendimiento de embriogénesis somática de varios sistemas *in vitro*, particularmente en la embriogénesis de microsporas (Satpute *et al*., 2005; Rodríguez-Serrano *et al*., 2012). Estudios recientes indican que durante la embriogénesis de microsporas inducida por estrés se activan marcadores de muerte celular como autofagia (principal proceso catabólico de células eucariotas) y proteasas (cisteín proteasas o catepsinas, metacaspasas y proteasas con actividad caspasa-3 *like*) (Bárány *et al*., 2018; Pérez-Pérez *et al*., 2019; Testillano, 2019). Además, novedosos hallazgos en este campo han demostrado como el proceso de muerte celular puede llegar a reducirse mediante la aplicación de tratamientos farmacológicos con inhibidores de autofagia y proteasas, lo que en consecuencia aumenta la tasa de inducción embriogénica (Bárány *et al*., 2018; Berenguer *et al*., 2019, 2021) y supone el descubrimiento de nuevas vías para intervenir en el aumento de la viabilidad celular de cultivos de embriogénesis somática.

1.4 SISTEMAS EXPERIMENTALES

Para el estudio de la embriogénesis somática se han utilizado tres especies modelo, todas ellas angiospermas: la colza (*Brassica napus*), una planta hortícola dicotiledónea; la cebada (*Hordeum vulgare*), un cereal monocotiledónea; y el alcornoque (*Quercus suber*), árbol de interés forestal.

1.4.1 *Brassica napus* L.

Brassica napus es una planta oleaginosa conocida comúnmente como colza. La taxonomía la clasifica dentro de la familia de las brasicáceas (*Brassicaceae*) (Tabla 1), la cual acoge más de 350 géneros.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Brassica napus.*

Nivel taxonómico	Nomenclatura científica
REINO	*Plantae*
DIVISIÓN	*Magnoliophyta*
CLASE	*Magnoliopsida*
ORDEN	*Brassicales*
FAMILIA	*Brassicaceae*
GÉNERO	*Brassica*
ESPECIE	*Brassica napus* L.

Las semillas de colza poseen una alta concentración de ácido erúcico en su aceite (41-52%) y entre 100-150 µmoles de glucosinolatos por gramo de harina, siendo ambos compuestos tóxicos a altas dosis causantes de lesiones de miocardio (Clandinino y Yamashiro, 1982) y modificaciones en las glándulas suprarrenales (Borg, 1975). Tras muchos estudios, las recomendaciones para el consumo humano de este tipo de aceite se fijaron en un porcentaje máximo del 5% de ácido erúcico (Ziemlanski *et al*., 1977). En respuesta a esta problemática y considerando que la colza es una oleaginosa de alto rendimiento, en 1978 un grupo de fitogenetistas canadienses desarrollaron una variedad de colza cuyas semillas no superan el 2% de ácido erúcico en aceite y con una cantidad de glucosinolatos inferior a 30 µmoles/g de harina. Esta variedad de colza fue registrada con el nombre de "CANOLA" (*Canadian Oil Low Acid*), nombre común con el que también se nombra a la especie *Brassica napus* de forma general.

El género *Brassica* incluye 39 especies aceptadas y multitud de variedades, muchas de ellas cultivadas desde hace muchos años debido a su importancia en horticultura por el consumo de sus raíces, como en el caso del nabo (*Brassica rapa subsp. rapa*) o el colinabo (*Brassica napobrassica*), de sus tallos, como en la col (*Brassica oleracea var. Gongylodes*), de sus hojas, como en el caso del repollo (*Brassica oleracea var. Capitata*), de sus brotes como las coles de bruselas (*Brassica oleracea var gemmifera*), de sus flores como es el caso de la coliflor (*Brassica oleracea var. Botritis*) y el brócoli (*Brassica oleracea var. itálica*) o de sus semillas en el caso de la colza (*Brassica napus*).

Se cree que el origen de este género tuvo lugar en Asia Menor hace aproximadamente 37 millones de años. Posteriormente, con la llegada del ser humano,

se fue ampliando su producción a lo largo del Mediterráneo, siendo ampliamente cultivada por griegos y romanos con fines alimenticios y medicinales (Couvreur *et al*., 2010). Actualmente, la colza es un cultivo tradicional de muchos países europeos como Francia, Alemania, Inglaterra y Polonia, entre otros. A nivel mundial, los mayores productores son Canadá (15,4 millones de toneladas en 2017), China (12,6 millones de toneladas) e India (6,5 millones de toneladas) (FAOSTAT, 2016). La Unión Europea junto con Canadá representan el 57% de la producción mundial de esta oleaginosa. La colza se emplea para la obtención de aceite para consumo humano, para la fabricación de harinas y como forraje. Además, en los últimos años, se ha visto muy ampliada la superficie sembrada de esta oleaginosa debido a la gran demanda de su aceite como materia prima por parte de la industria del biodiesel. El aceite de colza es en muchos países europeos el principal aceite de uso alimentario, utilizado para cocinar y en la fabricación de alimentos. Sin embargo, es difícil encontrar este producto en España debido a la negativa de su consumo por el miedo de los españoles tras el envenenamiento masivo que tuvo lugar en la primavera de 1981, atribuido a un manejo irresponsable y criminal de este tipo de aceite que supuso 3800 muertes y más de 20.000 afectados en el país. En España la colza se cultiva principalmente como planta forrajera, aprovechándose principalmente su raíz y en algunos casos también las hojas para alimentar al ganado debido a su alto contenido en lípidos y proteínas.

La colza (Fig. 11) es una planta herbácea anual o bianual de entre 30 y 150 cm de altura. Tiene una raíz pivotante (de crecimiento vertical hacia abajo) y profunda, capaz de desarrollar fácilmente raíces secundarias que faciliten el avance en profundidad si encuentra obstáculos. Las hojas son pecioladas, con margen dentado las inferiores y acorazonado las superiores. Los frutos son silicuas con unas 20-25 semillas por vaina. Las silicuas cuando maduran son dehiscentes, abriéndose las suturas al golpearse o al secarse al sol y dejando caer las semillas al suelo. Las semillas son esféricas, de 2 a 2,5mm de diámetro. Una vez maduras, las semillas son de un color castaño rojizo o negro y presentan un alto contenido en aceite (en torno al 39%).



Figura 10. Ilustración de *Brassica napus*. Fuente: http://www.hear.org/pier/imagepages/singles/28_Brassica_napus_L.htm.

Se trata de un cultivo que se siembra en secano y en terrenos poco fértiles, con un rendimiento mínimo de 1.500 kg/ha. Gracias a la gran diversidad de variedades de esta especie, es posible cultivarla en la totalidad de la Península Ibérica. No tolera temperaturas inferiores a los -2ºC desde la germinación hasta que alcanza el estado de roseta, donde puede tolerar hasta los -15ºC. Puede desarrollarse a partir de los 400 mm de lluvia, resiste la sequía invernal y se ve dañada con los encharcamientos. Al tener una raíz pivotante, crece mejor en suelos profundos y con buen drenaje.

El género *Brassica* incluye especies de gran importancia agrícola, entre ellas *Brassica napus* y otras 5 especies se encuentran formando lo que se conoce como el "triángulo de U" (Ferrie, 2003) (Fig. 11). Este triángulo representa cómo el cruzamiento de tres especies entre sí (situadas en los vértices del triángulo), ha dado lugar a la aparición de tres nuevas especies del género (que aparecen como aristas del triángulo),

las cuales contienen la mezcla de los genomas de dos de las tres especies iniciales progenitoras. Las tres especies iniciales (representadas en los vértices: *Brassica nigra*, *Brassica rapa* y *Brassica oleracea*) tienen dotación cromosómica diploide, mientras que las nuevas (representadas en las aristas: *Brassica napus*, *Brassica juncea* y *Brassica carinata*) son plantas anfiploides o alotetraploides, término que hace referencia a un organismo poliploide formado por la unión de dos juegos cromosómicos distintos y posteriormente duplicados. De esta manera, *Brassica napus* es un híbrido natural con dotación cromosómica n=19 que surge como especie tras el cruzamiento de una col y un nabo (*Brassica rapa* x *Brassica oleracea*).

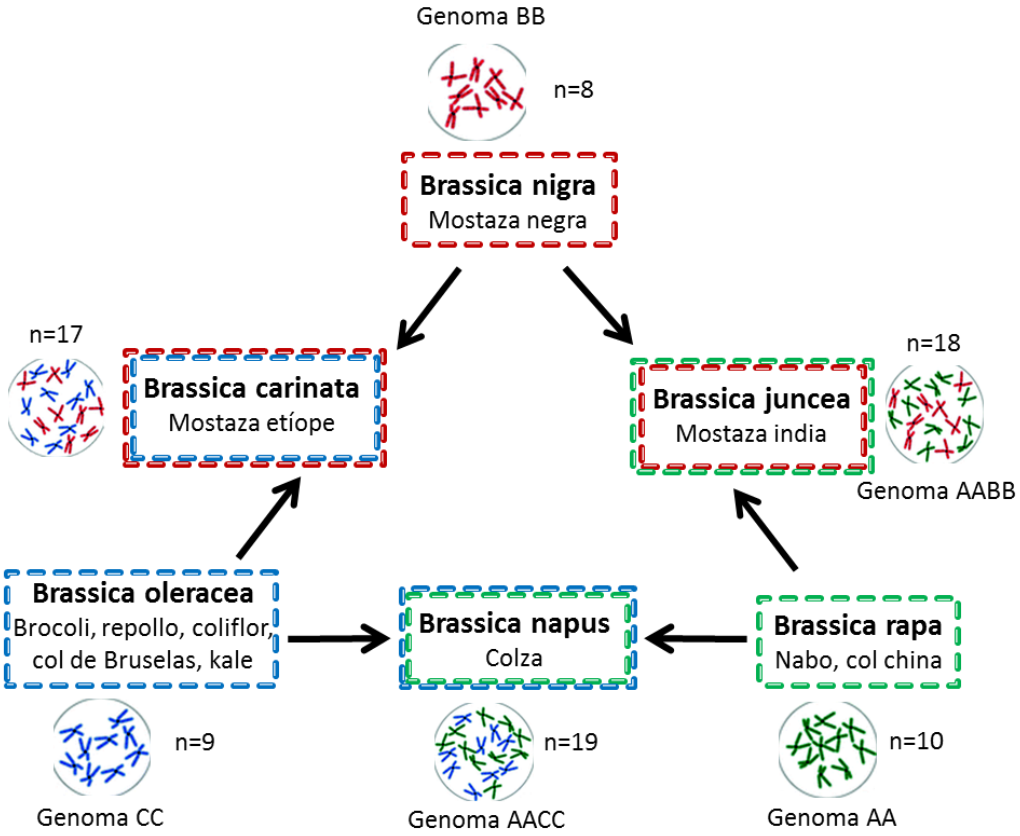


Figura 11. Triángulo de U del género *Brassica*.

Este fenómeno despertó el interés científico por el género *Brassica*, siendo muy interesante para el estudio de la evolución genómica en especies poliploides (Zhang *et al*., 2018). La primera especie del género en tener secuenciado su genoma fue *Brassica rapa* (Wang *et al*., 2011) y aún hoy en día es utilizado como genoma de referencia para los estudios génicos de *Brassica napus*.

Brassica napus es una especie de gran importancia no solo en el ámbito económico por su alta rentabilidad de producción y la gran demanda de sus productos, sino también en el ámbito científico. En el año 1970 se obtuvo a partir del polen de *Brassica napus* el primer brasinoesteroide con actividad hormonal, denominado brasinolide, demostrándose su actividad inductora en el crecimiento vegetal a manos de científicos norteamericanos (Mitchell *et al*., 1970).

En 1982, Lichter llevó a cabo por primera vez la producción de plantas haploides a partir de microsporas aisladas de *Brassica napus* (Lichter, 1982). Los rendimientos embrionarios de estos experimentos iniciales fueron bajos, pero desde entonces el cultivo de microsporas de *Brassica napus* ha sido ampliamente estudiado, mejorándose su rendimiento y convirtiéndose en un sistema modelo de embriogénesis *in vitro*.

Como ya se ha explicado en apartados anteriores, el genotipo es un factor determinante de la inducción embriogénica en el cultivo de microsporas, siendo el genotipo de la variedad Topas línea DH4079 el más sensible a la reprogramación de entre los genotipos de *B. napus* (Maluszynski *et al*., 2003). Por esta razón, se ha seleccionado esta variedad para llevar a cabo la parte experimental correspondiente a esta especie.

1.4.2 *Hordeum vulgare* L.

La especie *Hordeum vulgare*, comúnmente conocida como cebada, es una planta monocotiledónea clasificada taxonómicamente dentro de la familia de las poáceas también conocidas como gramíneas (Tabla 2), a la que pertenecen 650 géneros.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Hordeum vulgare*.

Nivel taxonómico	Nomenclatura científica
REINO	*Plantae*
DIVISIÓN	*Magnoliophyta*
CLASE	*Liliopsida*
ORDEN	*Poales*
FAMILIA	*Poaceae*
GÉNERO	*Hordeum*
ESPECIE	*Hordeum vulgare* L.

El género *Hordeum* está representado por más de 30 especies y unas 13.000 variedades (Blattner, 2018). Se cree que la cebada fue una de las primeras plantas domesticadas al principio de la agricultura. Según datos arqueológicos, la domesticación de la cebada data de hace más de 10.000 años (Zohary *et al*., 2012), época en la que surgió la cebada cultivada *Hordeum vulgare* a partir de la cebada silvestre *Hordeum spontaneum*, prodecente de Oriente Medio (Badr *et al*., 2000). Su cultivo se remonta al antiguo Egipto donde supuso una importante fuente de alimento para el desarrollo de esta civilización. A lo largo de la historia, el consumo de este cereal ha estado asociado a las clases más pobres, mientras las clases altas consumían harinas más refinadas y de mayor coste como el trigo.

Hoy en día la cebada ocupa el cuarto puesto en términos de producción mundial de cereales, con un total de 160 millones de toneladas (FAOSTAT, 2016), posicionándose detrás del maíz, el trigo y el arroz (Ablin, 2014). A nivel mundial los cultivos de cebada ocupan cerca de 70 millones de hectáreas, siendo Rusia (con más de 20 millones de toneladas), seguido de Australia, Alemania y Francia (FAOSTAT, 2017) los mayores productores.

Algunos países como Finlandia, Colombia, Perú o Ecuador siguen utilizando la cebada como alimento para consumo humano mediante un proceso de tostado y molido del que se obtiene la máchica, un tipo de harina usada tradicionalmente en bebidas, sopas y repostería. Sin embargo, el principal uso de la cebada es la alimentación animal, siendo especialmente relevante en climas fríos donde otros cereales no se pueden cultivar. Otro uso destacado de la cebada es la obtención de malta para su utilización en la industria cervecera y en la elaboración de bebidas alcohólicas como el whisky y la ginebra. En los últimos años, ha aparecido también un nuevo producto de cebada en el mercado denominado *barley grass* (hierba de cebada), que consiste en brotes muy jóvenes liofilizados que son considerados como un superalimento al que se le atribuye el efecto de una disminución del colesterol en sangre, ayudando por tanto a la prevención de enfermedades cardiovasculares.

La cebada (Fig. 12) es una planta anual de 20-120 cm. Tiene una raíz fasciculada y fibrosa que alcanza poca profundidad, se estima que el 60% del peso de las raíces se encuentra en los primeros 25 cm del suelo y que las raíces apenas alcanzan 1,20 metros

de profundidad. Su tallo es una caña hueca, gruesa y erecta que presenta de siete a ocho entrenudos, siendo éstos más largos a medida que el tallo crece desde la región basal. El número de tallos en cada planta es variable, presentando cada uno de ellos una espiga. Las hojas son lanceoladas y están formadas por la vaina basal y la lámina, están unidas por la lígula y presentan dos prolongaciones membranosas llamadas aurículas. Las hojas se encuentran insertadas a los nudos del tallo por un abultamiento en la base de la hoja y se disponen de manera opuesta. La cebada presenta inflorescencias en forma de espiga, la cual está formada por un raquis de tres carriles, tres espiguillas en cada nudo del raquis y una flor en cada espiguilla. De las tres espiguillas puede ocurrir que sólo sea fértil la flor central (cebada de dos carreras), las dos flores laterales (cebada de cuatro carreras) o las tres flores (cebada de seis carreras). De la base de cada espiguilla surgen dos pequeñas glumas: la pálea y una lemma con arista apical. Cada flor está envuelta por la lemma y la palea, y está formada por un ovario sentado, tres estambres, dos estilos y dos estigmas plumosos. El grano es de forma ahusada, más grueso en el centro y más estrecho en los extremos (McKim *et al*., 2018; Rossini *et al*., 2018).



Figura 12. Ilustración de *Hordeum vulgare*. Fuente: http://www.biolib.de/.

La cebada se cultiva normalmente en tierras arenosas de poca calidad que, por ser más ligeras y con menor poder retentivo de agua, no son idóneas para el cultivo de otros cereales. Estos cultivos exigen más cantidad de agua al principio de su desarrollo que al final y es una especie muy utilizada para ir detrás de cultivos en los que puede retrasarse su recolección hasta el invierno, como por ejemplo el maíz o la remolacha.

Las variedades de cebada se dividen tradicionalmente en variedades de invierno y de primavera. Las primeras se siembran en otoño y se cosechan al final de la primavera o al principio del verano. Las segundas se siembran al final del invierno o en primavera (dependiendo de la latitud) y se cosechan en verano. La distribución geográfica de estas variedades viene determinada por la crudeza del invierno a fin de evitar condiciones desfavorables que arruinen la producción de grano. Por tanto, en países como Escandinavia, donde son habituales las fuertes heladas invernales, se cultiva la variedad de primavera, mientras que por ejemplo en Francia o Alemania los cultivos de invierno representan aproximadamente dos tercios de la producción. Hay consenso sobre el

hecho de que el ciclo de cultivo más largo de las cebadas de invierno permite un mayor rendimiento potencial, así que estas suelen ser las preferidas allí donde las condiciones lo permiten (Garstang *et al*., 2011).

Existe un gran interés por parte del sector agrario en el desarrollo de nuevas variedades de cebada mediante el uso de técnicas de mejora genética, con la finalidad de obtener plantas más productivas, de mayor calidad y con resistencia a plagas y enfermedades.

En 1970 se desarrolló una nueva técnica para la obtención de plantas doble-haploides de cebada a partir de la hibridación interespecífica de *H. vulgare* y *H. bulbosum.* Más tarde se logró la obtención de plantas doble-haploides en cebada mediante el cultivo *in vitro* de anteras (Hunter, 1988) y también a través del cultivo *in vitro* de microsporas aisladas (Olsen, 1987). El desarrollo de estas técnicas ha permitido la obtención de numerosas variedades por parte de científicos y mejoradores, sacando al mercado variedades de alto rendimiento, resistentes a la roya, el oídio o al encame (Chicaiza et al., 1992; Fischbeck, 1992).

Entre todas las técnicas para la obtención de doble-haploides en cebada, el cultivo *in vitro* de microsporas aisladas ha resultado ser el método más eficaz para su producción a gran escala. Además, esta especie presenta una tasa de diploidización espontánea cercana al 90% (Castillo *et al*., 2009), lo que supone una gran ventaja a la hora de obtener plantas doble-haploides sin necesidad de añadir agentes antimitóticos o diploidizantes al cultivo. Entre las variedades más utilizadas para la inducción embriogénica en microsporas destaca la variedad Igri de tipo invernal, cuya elevada tasa de respuesta embriogénica la convierte en un genotipo modelo para el desarrollo de estudios básicos sobre el proceso (Maluszynski *et al*., 2003), razón por la cual en esta tesis se ha seleccionado dicha variedad para para llevar a cabo la parte experimental correspondiente a esta especie.

A pesar de la importancia de este cereal tanto a nivel agrícola como en investigación básica, no ha sido hasta el año 2017 cuando se ha conseguido la secuenciación completa de su genoma (Mascher *et al*., 2017), lo que ha supuesto sin duda un gran avance en la investigación de la especie.

1.4.3 *Quercus suber* L.

La especie *Quercus suber*, comúnmente conocida como alcornoque, es un árbol clasificado taxonómicamente dentro de la familia de las fagáceas (Tabla 3), a la que pertenecen solamente 8 géneros. El género *Quercus* es el más amplio de la familia y agrupa en torno a unas 600 especies. Dentro de las fagáceas, se encuentran especies tan conocidas como los castaños, las hayas o las encinas.

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *Quercus suber*.

Nivel taxonómico	Nomenclatura científica
REINO	*Plantae*
DIVISIÓN	*Magnoliophyta*
CLASE	*Magnoliopsida*
ORDEN	*Fagales*
FAMILIA	*Fagaceae*
GÉNERO	*Quercus*
ESPECIE	*Quercus suber* L.

El alcornoque es un árbol originario de Europa y del norte de África. Existen evidencias del uso del corcho del alcornoque de manera puntual en la Edad Antigua para revestimientos de viviendas, colmenas, taponado de vasijas e incluso calzado. En los siglos XV-XVIII el corcho tuvo cierta actividad comercial, pero su revalorización no se produjo hasta el siglo XIX con el auge de la industria taponera. Sin embargo, por efecto de las desamortizaciones del siglo XIX y el traspaso de montes públicos a manos privadas, se originó una reducción generalizada de la superficie de alcornocales mediante talas, roturaciones, carboneo y sobreexplotación de leña. El interés por recuperar este recurso natural de gran valor ecológico, económico y social se produjo en el siglo XX, cuando se autorizaron numerosas repoblaciones que incrementaron notablemente la superficie de alcornocal (López de Heredia y Gil, 2006).

En la actualidad, el alcornoque es considerado una especie de gran interés económico-forestal, extendiéndose por todo el litoral mediterráneo occidental de influencia atlántica. A nivel mundial existen más de 2,5 millones de hectáreas dedicadas al cultivo de alcornoque, siendo Portugal (859.000 has) y España (725.000 has), seguidos

de Argelia, Marruecos, Italia, Túnez y Francia, los países con mayor número de alcornocales. En España, las comunidades autónomas con mayor superficie de alcornocales son Andalucía (350.000 has), Extremadura (250.000 has) y Cataluña (75.000 has) (Houston Durrant *et al*., 2016).

El principal interés por esta especie reside en la producción de corcho. El corcho aparece recubriendo el tronco y las ramas del árbol y es producido por el característico meristemo secundario denominado felógeno. El felógeno produce hacia el interior un tejido llamado felodermis y hacia el exterior produce lo que se conoce como súber o felema, cuyas células se refuerzan con una sustancia muy impermeable llamada suberina. Esta suberina hace que la célula se asfixie y muera, rellenándose de gas y formando el corcho. Esta corteza está compuesta por células muertas y cavidades de aire, y sus paredes contienen grandes cantidades de suberina que le confiere al corcho propiedades aislantes al aire y el agua. Esta corteza suberosa tiene la misión natural de proteger al árbol frente a los frecuentes incendios que se producen en los bosques mediterráneos, ardiendo la parte exterior y quedando la parte interior cerrada a la entrada de aire y por tanto evitando la combustión de las partes vitales de la planta y pudiendo rebrotar tras el incendio. El árbol genera corcho continuamente a lo largo de su vida y puede extraerse a intervalos regulares sin provocar daños al individuo. La primera recogida del corcho no se realiza hasta que el ejemplar tiene alrededor de 30-40 años. El primer corcho, denominado bornizo, es muy grueso e irregular y por tanto de menor valor, por lo que suele triturarse para fabricar aglomerados. La segunda pela se realiza 9 o 10 años más tarde según las zonas y se obtiene el llamado corcho segundero, de mayor calidad que el anterior. Sin embargo, hasta la tercera pela (a los 45-50 años de vida del árbol) no se obtiene el primer corcho considerado de calidad para, por ejemplo, la elaboración de tapones. La media de producción de corcho de un alcornoque adulto con un desarrollo normal se estima entre 40 y 60 kilos por saca. La calidad del corcho producido comienza a declinar después de los 150 años de edad del individuo, a partir de la cual dejan de utilizarse para fines comerciales. Portugal es el primer productor mundial de corcho con un total de 160.000 toneladas al año, lo que supone el 50% del corcho producido mundialmente y seguido por España que produce el 22% de la producción mundial (Ruiz de la Torre, 2006).

El corcho es un material con propiedades únicas: es ligero, resistente, aislante térmico y acústico, impermeable a líquidos, elástico y compresible, ignífugo e hipoalergénico. Su principal uso es la elaboración de tapones para la industria del vino, aunque también es utilizado en artesanía y en la industria para elaboración de colmenas, aislantes, parqués, juntas de automóviles, calzado, etc. Una aplicación novedosa del corcho incluye el uso de subproductos generados durante el procesamiento de las planchas de corcho, capaces de actuar como inhibidores de la proliferación de linfocitos humanos y del crecimiento de líneas celulares cancerígenas (Moiteiro *et al*., 2001) .

Pero el interés del alcornoque no radica exclusivamente en su interés por la producción de corcho. Los alcornocales son un tipo de bosque de los que se extrae otro producto valioso como son las bellotas, muy apreciadas para la alimentación de cerdos ibéricos. La madera del alcornoque no es muy apreciada en artesanía por la dificultad de trabajarla y la facilidad con que se rompe, sin embargo, es muy utilizada como leña o carbón vegetal por su alto poder calorífico y su combustión lenta y duradera.

Además de su valor económico, el alcornocal también posee un gran valor social y ecológico. En España, los alcornocales forman parte de los bosques abiertos llamados dehesas, que son gestionados como sistemas silvopastoriles (integrando árboles, pasto y ganado) y tienen una gran importancia para el desarrollo rural de la zona.

El alcornoque (Fig. 13) es un árbol perennifolio que puede alcanzar los 20 metros de altura. Su copa es amplia y extendida cuando crece aislado. El tronco está cubierto por una corteza gruesa de color grisáceo y con profundas grietas longitudinales. Al descortezar el árbol para extraer el corcho, la capa visible es de un color rojo anaranjado muy llamativo que se va oscureciendo a medida que produce una nueva capa de corcho. Sus hojas son pecioladas y con el limbo de ovalado, algo coriáceas, brillantes por el haz y grisáceas por el envés a causa de la pilosidad que lo recubre. Se disponen en la rama de forma alterna. El margen puede ser liso o con algunos dientecillos agudos, pero no punzantes. Los nervios suelen ser visibles hasta el borde del limbo. En otoño se forman en las axilas de las hojas unas yemas de pequeño tamaño (unos 2 mm). Se trata de una especie monoica, por lo que las flores son unisexuales y aparecen sobre el mismo pie de planta. Las flores masculinas se disponen en pedúnculos colgantes de 4 a 8 cm llamados amentos, que penden de las axilas de las hojas y de las ramas cortas. Las flores

femeninas se encuentras aisladas o se reúnen en pequeños grupos formando pedúnculos cortos que contienen de 2 a 5 flores. El fruto es una bellota castaño-rojiza de tamaño variable, cubierta en su base y hasta aproximadamente la mitad del fruto por una cúpula formada por escamas triangulares imbricadas. Las bellotas no maduran al mismo tiempo, sino que lo hacen de forma escalonada. La mayoría se producen en octubre o noviembre, pero pueden aparecer de septiembre a febrero.

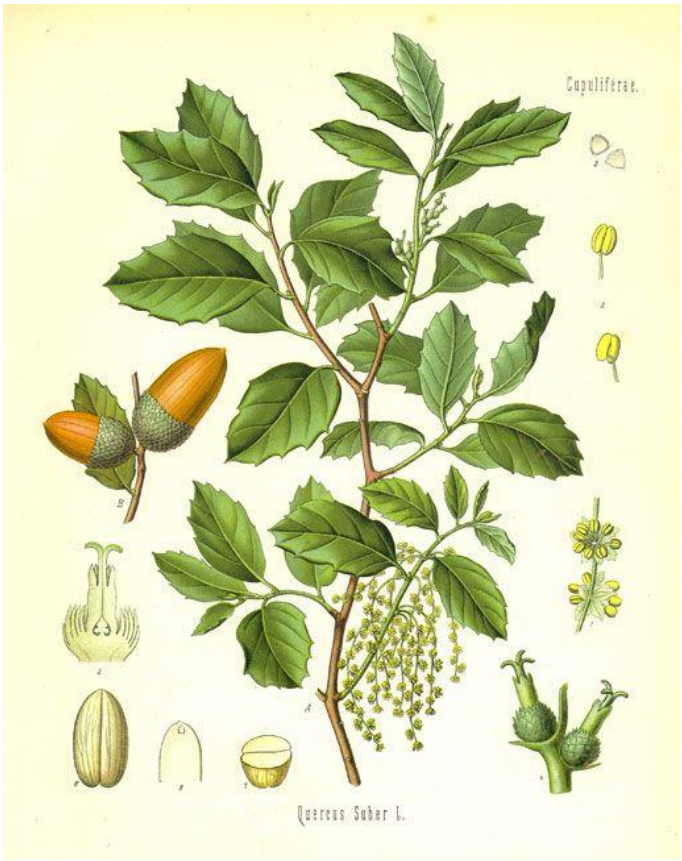


Figura 13. Ilustración de *Quercus suber*. Fuente: https://web.archive.org/web/20150928164107/http://pharm1.pharmazie.uni-greifswald.de/allgemei/koehler/koeh-254.jpg.

El alcornoque, como especie mediterránea, se desarrolla en climas con veranos secos y cálidos e inviernos suaves y lluviosos. Soporta bien la sequía estival siempre que se compense con precipitaciones más abundantes el resto del año. Al verse afectado por las heladas, no se distribuye en climas muy fríos o en alta montaña. Esta especie suele crecer en suelos pobres en calcio de tipo silíceo. Requiere buena aireación para sus raíces, por lo que crece en suelos arenosos, con pocas arcillas y sin encharcamientos (Ruiz de la Torre, 2006).

Como hemos visto, *Quercus suber* es una especie de gran interés económico y forestal y son muchos los esfuerzos enfocados en conseguir variedades con características cada vez más ventajosas en términos de producción como una tasa de crecimiento más rápida, mayor producción de corcho y de mayor calidad, resistencia a plagas, enfermedades y condiciones ambientales adversas o incremento de la producción de frutos. Sin embargo, los programas de mejora tradicional no resultan útiles para hacer frente a estas demandas ya que se trata de especies con una alta heterocigosidad, que además presentan un ciclo de vida largo y un periodo juvenil muy prolongado que precede al periodo reproductivo. Además, en especies forestales resulta difícil tanto la conservación de sus semillas como la reproducción vegetativa.

En este sentido, las técnicas de embriogénesis *in vitro* resultan ser una de las herramientas más útiles para la mejora del alcornoque, entre ellas está la embriogénesis procedente de microsporas y la procedente de embriones somáticos inmaduros. En la especie *Quercus suber* se han desarrollado tanto sistemas de embriogénesis *in vitro* de microsporas (Bueno *et al*., 2003) como embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos inmaduros (Manzanera *et al*., 1993; García-Martín *et al*., 2005) con elevadas tasas de éxito de inducción embriogénica en ambos casos.

La micropropagación mediante embriogénesis somática, ha sido considerada como la vía de regeneración más adecuada para especies forestales (Merkle y Dean, 2000; Sutton, 2002) ya que su elevado potencial multiplicativo permite la producción a gran escala e incluso permite el desarrollo de cultivos a nivel industrial en biorreactores gracias a su posibilidad de automatización. También permite la obtención de semillas sintéticas mediante la encapsulación de los embriones somáticos producidos. Además, estos cultivos de embriones somáticos poseen una alta capacidad de regeneración después de la crioconservación (Janeiro *et al*., 1996; Engelmann *et al*., 1997).

Además, si se utilizan como explantos tejidos vegetativos (como por ejemplo las hojas), esta técnica hace posible el clonaje de genotipos de aquellos individuos que presenten características de interés y es considerada de gran relevancia en los estudios de transformación (Peña y Séguin, 2001) y de genómica funcional, a fin de validar genes relacionados con determinados procesos del desarrollo (Campbell *et al*., 2003).

La inducción de embriogénesis somática ha sido estudiada en muchas especies del género *Quercus* como *Q. suber*, *Q. robur*, *Q. ilex* y *Q. alba* (Mauri y Manzanera, 2003; Barra-Jiménez *et al*., 2014; Corredoira *et al*., 2014; Corredoira *et al*., 2017). En el caso de *Q. suber*, en los últimos años se han utilizado varios sistemas de propagación *in vitro* mediante embriogénesis somática de hojas (Hernández *et al*., 2003), embriones cigóticos inmaduros (Testillano *et al*., 2018), óvulos o endospermo (Bueno *et al*., 1992). También se ha estudiado el grado de eficiencia del proceso en base a las condiciones de cultivo y componentes del medio (García-Martín *et al*., 2005; Beatriz Pintos *et al*., 2010), todo ello con la finalidad de conseguir una mayor eficiencia del proceso de embriogénesis somática de esta especie.

1.5 HORMONAS VEGETALES DE DESARROLLO Y EMBRIOGÉNESIS

El correcto desarrollo de una planta requiere de ciertos mecanismos que le permitan regular y coordinar las diferentes actividades de sus células, tejidos y órganos; y, al mismo tiempo, debe ser capaz de percibir y responder a los distintos estímulos del medio externo. Dentro de los distintos mecanismos de regulación, ocupa un papel relevante el sistema de mensajeros químicos o señalización química y, entre las distintas moléculas que pueden actuar como mensajeros químicos, destaca la comunicación química a través de las denominadas hormonas vegetales o fitohormonas.

Esta comunicación química se establece fundamentalmente a través de lo que se denominan hormonas vegetales o fitohormonas. Las fitohormonas son pequeñas moléculas orgánicas con actividad a muy bajas concentraciones (del orden de los nanomoles), que desempeñan un papel crucial en la regulación de distintos procesos del crecimiento y desarrollo de la planta como la floración, la germinación y la senescencia. El control de la respuesta hormonal se lleva a cabo mediante cambios en la concentración de las fitohormonas y la sensibilidad de los tejidos a las mismas. Las funciones de las fitohormonas se solapan en gran medida, por tanto, es importante entender la regulación hormonal desde la perspectiva de una interacción entre los distintos grupos de fitohormonas y no como el efecto individual de cada una de ellas. Una misma fitohormona actúa sobre varios procesos, y sobre un proceso específico actúan varias fitohormonas.

Se sabe que las vías de señalización hormonal interactúan a nivel de expresión génica (Santner *et al*., 2009; Santner y Estelle, 2009). De esta manera, las hormonas pueden regular la síntesis (niveles hormonales), la señalización (respuesta hormonal) y el transporte (distribución hormonal) de otras hormonas (Cheng *et al*., 2013; Gómez-Cadenas *et al*., 2014).

Una fitohormona puede ser sintetizada en diferentes partes de la planta. En ocasiones es activa en el propio tejido en el que ha sido sintetizada y en otros casos es transportada mediante distintos mecanismos hasta un tejido diferente para ejercer su función. Actualmente se conocen 9 grupos de hormonas vegetales: auxinas, giberelinas (GA), citoquininas (CK), brasinosteroides (BR), estrigolactonas (SL), etileno, ácido abscísico (ABA), jasmonatos (JA) y ácido salicílico (SA) (Yi *et al*., 2017)

El concepto de fitohormona fue acuñado en el año 1887 por Julius von Sachs para describir aquellos compuestos producidos internamente por la planta, capaces de regular el crecimiento vegetal. Más adelante, aparecieron los productos de síntesis, tratándose de compuestos sintetizados químicamente u obtenidos a partir de otros organismos no vegetales. En ese momento se acuño el término "regulador de crecimiento vegetal" para designar aquellos compuestos sintéticos que, aun no siendo sintetizados de manera natural por la planta, presentan funciones análogas a las fitohormonas naturales. La obtención de estos compuestos supuso un gran avance para la aplicación agronómica, siendo en general mucho más potentes que sus análogos naturales. Sin embargo, para poder llegar a aplicar con criterio este tipo de compuestos en agronomía, es necesario comprender cómo, dónde y cuándo actúan las fitohormonas de manera natural en la planta y su implicación en la regulación de los distintos procesos del desarrollo (Munné-Bosch y Müller, 2013). La investigación de las hormonas vegetales comenzó a principios del siglo pasado, siendo muchos y muy diversos los trabajos realizados desde entonces en este ámbito de estudio (Kamiya, 2010; Fahad *et al*., 2014; Asami y Nakagawa, 2018).

La señalización por estrés térmico y los mecanismos hormonales se han descrito como factores cruciales subyacentes a la adquisición de totipotencia e inducción de embriogénesis de microsporas (Testillano, 2019), así como en la embriogénesis somática de otros tipos celulares (Fehér, 2015; Díaz-Sala, 2019).

En esta tesis se ha llevado a cabo un estudio sobre la regulación hormonal de la reprogramación celular a embriogénesis inducida por estrés. A pesar de que en los últimos años ha aumentado mucho el conocimiento sobre la regulación hormonal en distintos procesos del desarrollo, aun no se conocen bien los efectos de las hormonas vegetales en el inicio y la progresión de la embriogénesis *in vitro*. Uno de los objetivos de esta tesis se centra en el estudio de dos de las hormonas vegetales más ampliamente estudiadas por su patente implicación a lo largo de diferentes procesos del desarrollo de la planta, las auxinas y las citoquininas, durante la reprogramación de microsporas *in vitro* y el desarrollo del polen *in vivo*.

1.5.1 Auxinas

La palabra auxina deriva del término griego “αυξανω” ("auxein"), que significa crecer o aumentar. Las auxinas son un importante grupo de fitohormonas implicadas en inducir respuestas de crecimiento a lo largo del ciclo de vida de la planta. El efecto de la auxina fue documentado por primera vez en 1881 con el trabajo de Charles y Francis Darwin publicado en el libro *The Power of Movement in Plants*, donde detallaban algunos de los primeros experimentos conocidos sobre sustancias reguladoras del crecimiento. Los Darwin llevaron a cabo las primeras observaciones sistemáticas sobre la curvatura de las plantas hacia la luz (fototropismo positivo) utilizando plántulas de alpiste (*Phalaris canariensis*) y de avena (*Avena sativa*). Estos estudios concluyeron que cuando unas plántulas son expuestas libremente a una luz lateral se transmite cierta influencia desde la parte superior a la parte inferior, que obliga a la planta a curvarse. Sin embargo, si se cubría la parte superior del coleoptilo con un cilindro de metal o un tubo de vidrio ennegrecido con tinta china y se exponía a una fuente de luz lateral, no se producía la curvatura característica. En cambio, si sobre los ápices se colocaba un tubo de vidrio transparente, el coleoptilo se curvaba con normalidad. De esta manera, los experimentos indicaban la existencia de cierta comunicación entre el ápice y el resto del coleoptilo, donde se da la respuesta de crecimiento. “Debemos concluir, por tanto –escribieron-, que cuando las plántulas son expuestas libremente a una luz lateral se transmite cierta influencia desde la parte superior a la parte inferior, que obliga a la planta a curvarse”. Unos años más tarde, en 1926, el fisiólogo vegetal Frits W. Went

consiguió aislar esa "influencia" de los ápices de los coleoptilos. Went cortó los ápices de un número determinado de coleoptilos de plántulas de avena y los colocó durante una hora en un bloque de agar, de manera que las superficies de corte estuvieran en contacto con el agar. Luego cortó el agar en pequeños bloques y los adhirió a un lado del "muñón" de las plantas decapitadas, que se mantuvieron en la oscuridad durante todo el experimento. Al cabo de una hora, observó una curvatura apreciable hacia el lado contrario de donde estaba colocado el bloque de agar. Los bloques de agar que no habían sido puestos en contacto con los coleoptilos no produjeron curvatura alguna, o bien producían una ligera curvatura hacia el lado en que había sido colocado el bloque de agar. Los bloques de agar que habían estado en contacto con porciones de coleoptilo de la parte inferior tampoco produjeron ningún efecto fisiológico. Con estos experimentos Went demostró que el ápice del coleoptilo ejerce su efecto mediante una sustancia química y no mediante un estímulo físico, y denominó a esta sustancia auxina.

La curvatura del coleoptilo de la avena hacia el lado contrario de donde está el bloque de agar que contiene la auxina, se debe a la distribución asimétrica de la auxina que a su vez causa un aumento asimétrico del tamaño celular del coleoptilo. Las células que están en el lado del bloque de agar que contiene auxina aumentan más que las células del lado opuesto. Las condiciones de manipulación de las plántulas de Avena con bloques de agar se estandarizaron de forma que se podía correlacionar el ángulo de curvatura con la cantidad de auxina presente en el bloque de agar. Esta técnica, denominada "bioensayo de la curvatura de coleoptilo de avena", permitió a los investigadores aislar e identificar una auxina natural, que recibió el nombre de ácido indol-3-acético (AIA).

Aunque fue el primero en descubrirse, el AIA no es la única auxina existente, actualmente se conocen otros compuestos químicos pertenecientes a este grupo de fitohormonas que tienen efectos similares al AIA pero que difieren en su estructura química. Dentro del grupo de auxinas se diferencian aquellas obtenidas directamente de la planta, clasificadas como auxinas naturales, y las producidas por síntesis química industrial, a las que se denominan auxinas sintéticas. Las principales auxinas naturales son el ácido indol-3-acético (AIA), el ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-AIA), el ácido indol-3-butírico (IBA), el ácido fenilacético (PAA) y el ácido indol-3-propiónico (IPA).

Dentro del grupo de las auxinas sintéticas cabe destacar el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el Picloram y el Dicamba, utilizados como herbicidas sistémicos, y el ácido naltaleno-1-acético (NAA) muy utilizado en horticultura para el enraizamiento en estacas y como raleador químico en árboles frutales. (Fig. 14).

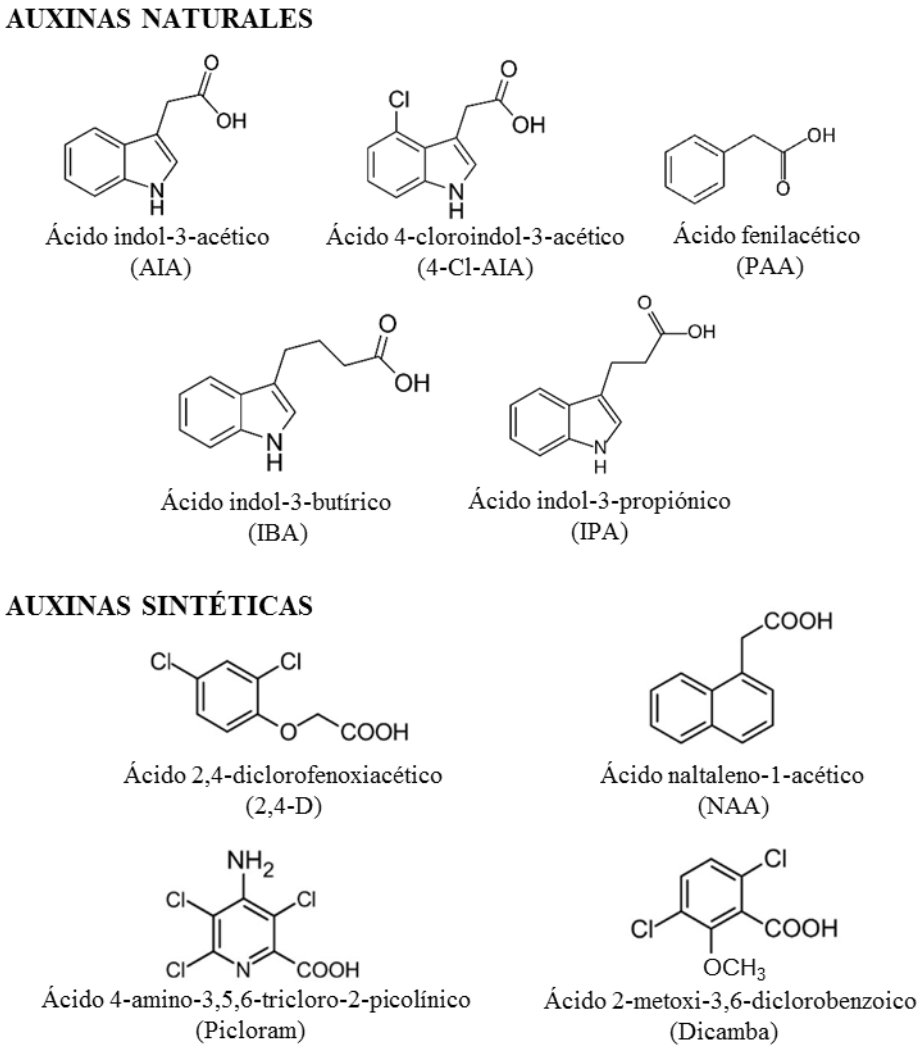


Figura 14. Principales auxinas naturales y sintéticas.

Las auxinas son consideradas el grupo de fitohormonas más importantes implicadas en el crecimiento de la planta, con un papel clave en la regulación de la división y diferenciación celular (Weijers *et al*., 2018). Pueden encontrarse en la planta como moléculas libres (forma activa) o formando conjugados con otros compuestos generalmente de bajo peso molecular (formas inactivas). Las formas conjugadas

desempeñan un papel importante como moléculas almacenadas y transportadas. Se sabe que la interconversión entre bases libres y sus conjugados es reversible, lo que permite regular la concentración de compuestos activos en la planta (Korasick *et al*., 2013). La forma predominante de auxina en la planta es el ácido indol-3-acético (AIA) y está involucrado en numerosos procesos del desarrollo, como por ejemplo en la dominancia apical de brotes (Müller y Leyser, 2011) , en el crecimiento del tallo y los coleoptilos (Prasad y Dhonukshe, 2013), en la formación y diferenciación del tejido vascular de las hojas (Mattsson *et al*., 2003), en el desarrollo de meristemos radiculares (Blilou *et al*., 2005), en la respuesta de la raíz a estímulos gravitacionales, o en la formación de raíces laterales (Moreno-Risueño *et al*., 2010) .

El AIA también está implicado en el proceso de embriogénesis desde las primeras etapas (Chen *et al*., 2010) hasta la polarización y diferenciación del embrión, viéndose aumentada su biosíntesis a medida que avanza el desarrollo del embrión cigótico (Möller y Weijers, 2009; Rademacher *et al*., 2012).

Hay varios mecanismos encargados de regular la homeostasis de la auxina en la planta. La mayoría de las rutas de biosíntesis, transporte y señalización estudiadas en las últimas décadas se han basado en la especie modelo dicotiledónea *Arabidopsis thaliana* (Mironova *et al*., 2017; Leyser, 2018). Sin embargo, a pesar de que se dispone de menos información sobre los mecanismos de la auxina en monocotiledóneas, hay trabajos realizados en plantas de maíz y arroz que muestran que hay un alto grado de conservación de las rutas de auxina entre especies monocotiledóneas y dicotiledóneas (McSteen, 2010; Forestan y Varotto, 2012; Balzan *et al*., 2014).

La acción de la auxina depende, mayoritariamente, de su biosíntesis local y su distribución diferencial dentro de los tejidos de la planta, regulada principalmente por su transporte direccional entre células (Petrášek y Friml, 2009). De este modo, las alteraciones en los niveles celulares de esta hormona en distintas zonas de la planta y momentos del desarrollo median la respuesta celular frente a auxina. El cómo las células procesan la señal de auxina para originar las distintas respuestas fisiológicas es una pregunta que todavía no ha sido del todo respondida, aunque en los últimos años se han impulsado nuevos métodos de estudio de la auxina que están permitiendo descifrar datos novedosos sobre su síntesis y regulación (Weijers *et al*., 2018).

Biosíntesis de auxina

La biosíntesis de AIA en las células de la planta puede llevarse a cabo utilizando dos rutas principales, una independiente de triptófano y otra dependiente de triptófano. A su vez, la síntesis del AIA puede derivar del triptófano (Trp) por 4 vías: 1) por descarboxilación para producir triptamina (TAM), 2) por oxigenación para producir indol-3-acetamida (IAM), 3) por oxigenación para producir indol-3-acetaldoxima (IAOx) y 4) por transaminación para producir ácido indol-3-pirúvico (IPA). (Fig. 15).

De entre todas estas rutas, la ruta del indol-3-pirúvico (IPA) es la ruta de biosíntesis mayoritaria tanto en plantas dicotiledóneas como monocotiledóneas (McSteen, 2010; Zhao, 2014). En esta ruta, las enzimas triptófano aminotransferasa 1 de *Arabidopsis* (TAA1) y triptófano aminotrasferasa-related 1 y 2 (TAR1, TAR2) transforman el aminoácido triptófano en ácido indol-3-pirúvico (IPA) mediante una reacción de transaminación. A continuación, enzimas flavin monooxigenasas pertenecientes a la familia YUCCA (YUC) catalizan la conversión de IPA a AIA mediante una reacción de decarboxilación oxidativa (Brumos *et al*., 2014; Zhao, 2014).

Se sabe que los genes TAA1/TAR y YUC juegan un importante papel en numerosos procesos del desarrollo de plantas, y particularmente en la embriogénesis de plantas tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas (Zhao, 2014 ; Shao *et al*., 2017).

Un método muy eficiente para estudiar el papel de la biosíntesis de auxina dependiente de TAA1/TAR es el uso de kinurenina (Kin). La Kinurenina es una pequeña molécula que, dada su similitud estructural con la molécula L-triptófano, actúa como sustrato alternativo de TAA1/TAR inhibiendo de forma competitiva su actividad y bloqueando por tanto la biosíntesis de AIA de la ruta (He *et al*., 2011) . El hecho de bloquear la actividad enzimática de TAA1/TAR hace que se produzcan alteraciones en procesos del desarrollo de la planta en los cuales la auxina esté implicada (de Wit *et al*., 2015; Nomura *et al*., 2015).

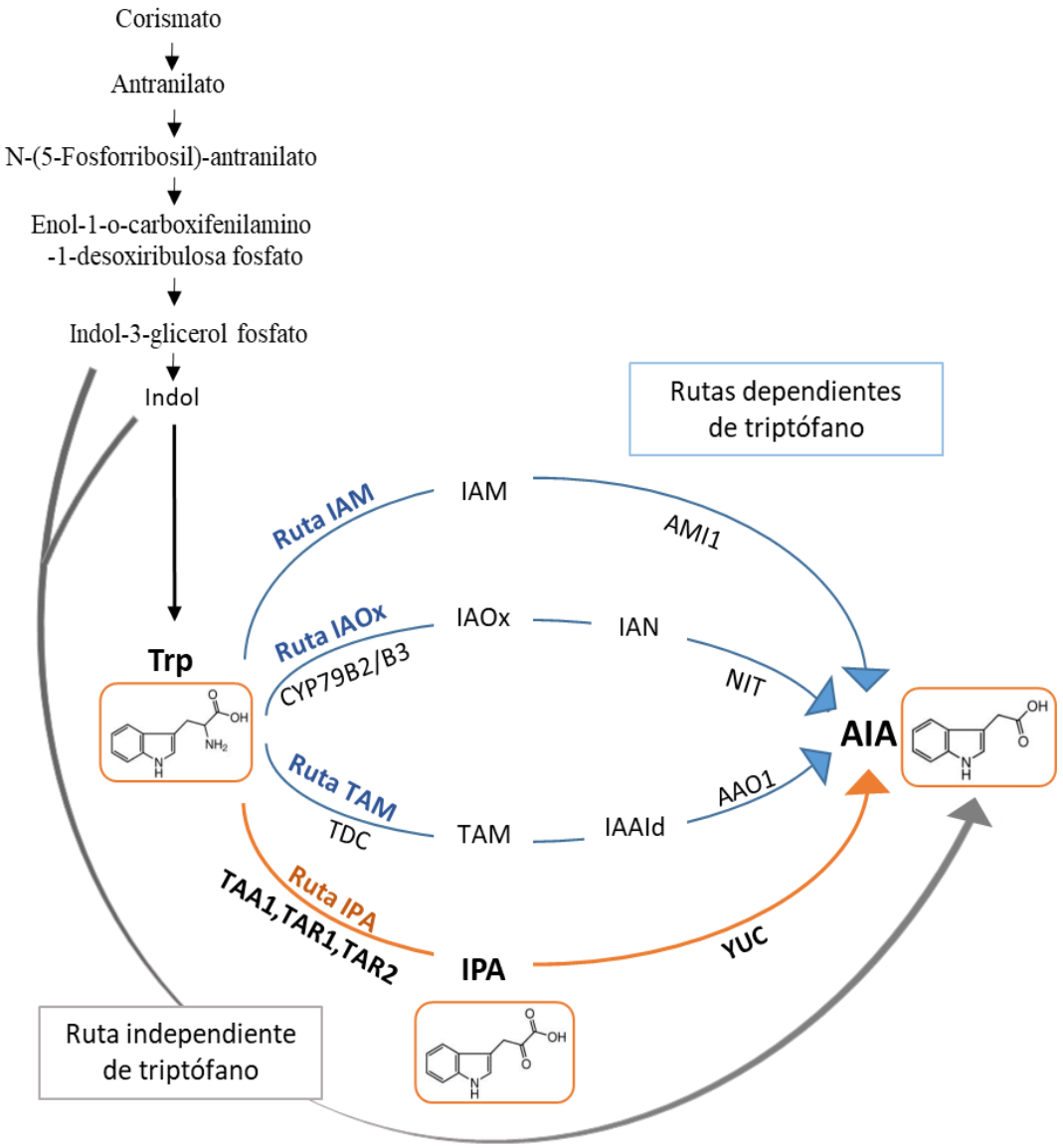


Figura 15. Biosíntesis de auxina.

Transporte de auxina

Dado que la biosíntesis de auxina tiene lugar a nivel local en la planta, es necesario un mecanismo de transporte que la distribuya hasta sus dianas en los distintos tejidos de la planta. Este proceso es llevado a cabo principalmente mediante un mecanismo de transporte polar entre células (PAT, *polar auxin transport*). De esta manera, la auxina es transportada entre las células siguiendo una polaridad. Este transporte está regulado principalmente por tres familias de proteínas, ambas localizadas en la membrana plasmática: las proteínas *AUXIN RESISTANT1/LIKE AUX* (*AUX1/LAX*), encargadas de

regular el flujo de entrada de auxina en la célula (auxin *influx*), acoplado a una bomba de protones; y las proteínas *PIN-FORMED* (*PIN*) y *ATP-binding cassete* tipo B (ABCB), que regulan el flujo de salida de auxina desde el citosol hacia el apoplasto (*auxin efflux*) (Petrášek y Friml, 2009*;* Zazimalova *et al*., 2010; Ljung, 2013*;* Adamowski y Friml, 2015; Bennett, 2015) (Fig. 16).

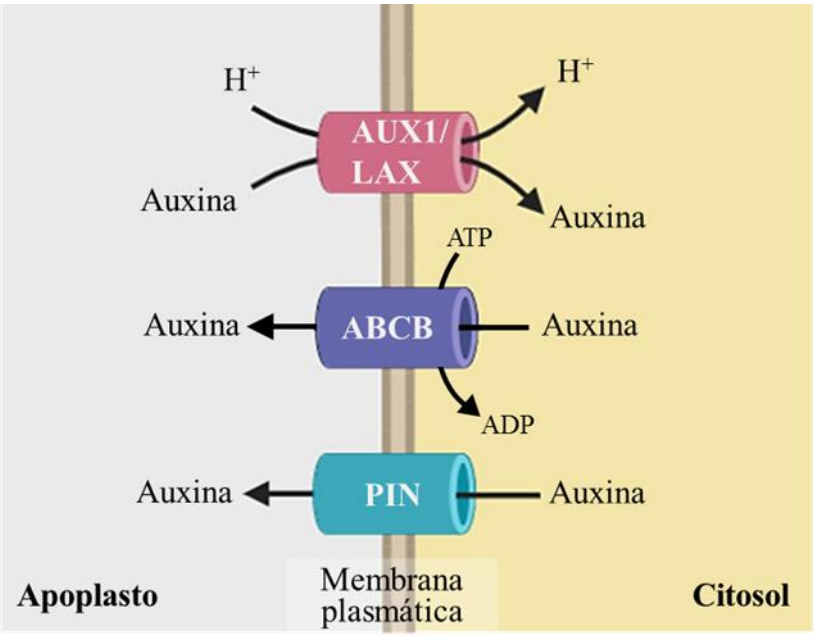


Figura 16. Transporte de auxina.

La concentración de auxina en células específicas se debe principalmente al transporte intercelular de la misma y a su biosíntesis, así como a su metabolismo (Grones y Friml, 2015). Los niveles de auxina regulan la expresión de los genes *PIN*, *ABCB* y *AUX1*, y también su localización y degradación, formando de este modo un complejo bucle de retroalimentación entre los niveles de auxina, su transporte y la dirección del flujo, de tal manera que una elevada concentración de auxinas induce la expresión de los genes de las proteínas PIN. Durante el desarrollo embrionario, las proteínas PIN contribuyen a la creación de gradientes de auxina en el embrión y esto regula en gran medida la expresión de genes *PIN* durante el desarrollo (Prasad y Dhonukshe, 2013) . En *Arabidopsis* se han descrito ocho genes *PIN* que se dividen en dos subclases principales: una subclase que codifica para proteínas PIN 'largas' (*PIN1- PIN4 y PIN7*), con localización polar en la membrana plasmática y una función de transporte directo de auxina; y otra subclase que codifica para proteínas PIN 'cortas' (*PIN5, PIN6 y PIN8*) que se localizan en

endomembranas y participan en la distribución intracelular de auxina y en su homeostasis (Zazimalova *et al*., 2010) . Entre los *PINs* canónicos, *PIN1* juega un papel central en el control direccional del PAT durante el desarrollo embriogénico, donde se produce el establecimiento de flujos polarizados de auxina, de gradientes y de valores máximos en regiones basales y apicales del embrión en diferentes fases de desarrollo (Zazimalova *et al*., 2010; Prasad y Dhonukshe, 2013).

En las plantas superiores, el PAT genera concentraciones máximas y mínimas de auxina célula a célula, que dirigen el crecimiento y desarrollo. Sin embargo, el papel del PAT no se conoce del todo en muchas especies y, para su análisis, es fundamental el estudio de las proteínas PIN, ya que el flujo de salida de auxina es proporcional al grado de expresión y la localización polar de los *PINs*.

Hay estudios que demuestran el importante papel que juega el transporte de auxina durante el desarrollo mediante el uso de inhibidores de PAT como el ácido N-1-naftilftalámico (NPA), el cual inhibe el transporte de auxina bloqueando su flujo de salida de las células mediante un mecanismo en el que el NPA se une a las proteínas PIN1. Los tratamientos con NPA se han ensayado en plantas tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas, y se ha visto que en ambos casos causa defectos en la planta tanto a nivel de desarrollo vegetativo como reproductivo, incluyendo el proceso de embriogénesis (Wu y McSteen, 2007; Larsson *et al*., 2008; McSteen, 2010; Prasad y Dhonukshe, 2013; Rodríguez-Sanz *et al*., 2015).

Señalización de auxina

Se han caracterizado diferentes rutas de señalización de la auxina que conducen a la expresión de genes o a una respuesta no transcripcional, según los niveles de auxina. En las últimas décadas se ha identificado cómo estos niveles de auxina son percibidos por sistemas receptores específicos. (Rademacher *et al*., 2011).

Tras la percepción en el núcleo, la auxina puede desencadenar respuestas transcripcionales amplias y específicas. Los componentes principales de la maquinaria de señalización de auxina pertenecen a tres familias de proteínas: 1) los co-receptores de auxina F-box *Transport Inhibitor Response 1 /Auxin signaling F-box protein* **(TIR1/AFB)**, que se encuentran formando parte del complejo $SCF^{TIR1/AFB}$ (Skp1/ Cullin/ F-

box), una multiproteína E3 ubiquitina ligasa de cuatro subunidades (TIR/AFB, ASK1: proteína skp1-like, CUL1: Cullin y RBX: Ring Box1) que cataliza la ubiquitinación de proteínas destinadas a la degradación en el proteasoma; 2) los represores transcripcionales *Auxin / Indole-3-acetic acid* (**Aux/IAA**) de localización nuclear y vida corta; y 3) los factores de transcripción *Auxin response factor* (**ARF**) que son proteínas de unión al DNA que actúan como activadores o represores transcripcionales de genes de respuesta a auxina (Lavy y Estelle, 2016) .

Cuando los niveles de auxina son bajos, los represores transcripcionales Aux/IAA interaccionan con los ARFs y bloquean su actividad, involucrando a menudo en el proceso a otras proteínas represoras denominadas TOPLESS (TPL) que al igual que Aux/IAA actúan modificando la cromatina, en este caso mediante la eliminación de grupos acetilo de proteínas histonas que aumenta la condensación del DNA y conlleva una represión transcripcional (Szemenyei *et al*., 2008). Por el contrario, la presencia de auxina promueve la interacción entre las proteínas TIR1/AFB y Aux/IAA, derivando en la poliubiquitinación y degradación de Aux/IAA en el proteasoma y liberando de la represión a las proteínas ARF, lo que permite que ARFs regulen la expresión de los genes de respuesta a auxina (Calderón-Villalobos *et al*., 2012; Wang y Estelle, 2014; Salehin *et al*., 2015; Guilfoyle, 2015). (Fig. 17).

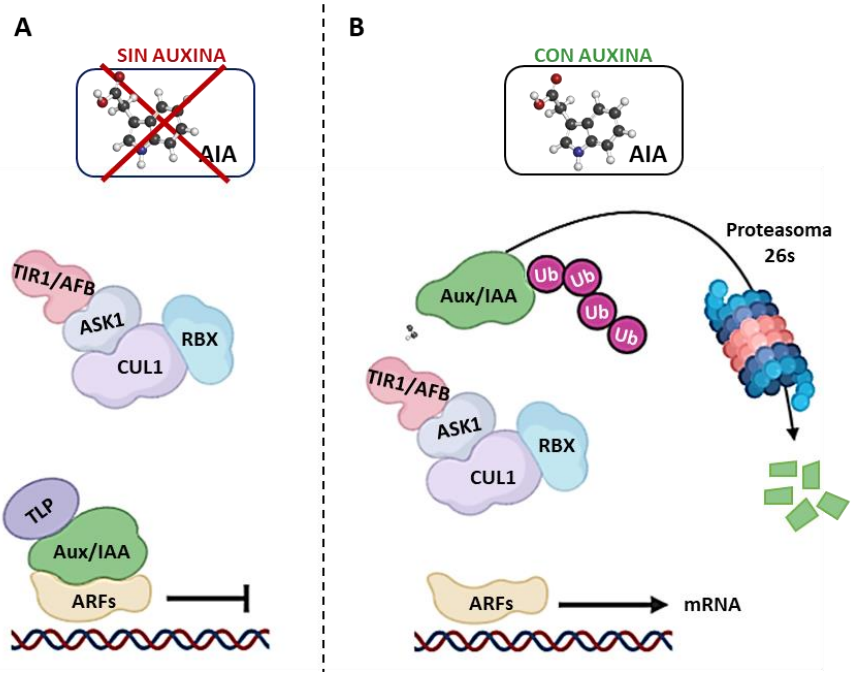


Figura 17. Ruta de señalización de auxina.

Hay numerosos genes TIR1/AFB, Aux/IAA y ARFs identificados en *Arabidopsis thaliana* que ofrecen un gran repertorio para modular las respuestas celulares en base a los niveles de auxina. Sin embargo, las herramientas para analizar la distribución de auxinas y su dinámica de señalización durante el desarrollo son todavía limitadas.

Un inhibidor muy utilizado para llevar a cabo estudios funcionales de la ruta de señalización de auxinas es el α-(*p*-chlorophenoxy)-isobutyric acid (PCIB), un compuesto que actúa como antagonista de las auxinas e inhibe su acción, bloqueando por tanto los procesos fisiológicos inducidos por la hormona (Xie *et al*., 2000). A pesar de que el mecanismo de inhibición de esta sustancia no está del todo caracterizado a nivel molecular, se ha visto que el tratamiento con PCIB no altera el flujo de entrada o salida de auxinas, puesto que no interacciona con las proteínas PIN (Oono *et al*., 2020). El modo de acción de este compuesto reside en su similitud estructural con la molécula de AIA, alterando de este modo la ruta de señalización de la hormona (McRae y Bonner, 1953; Q. Xie *et al*., 2000).

El estudio de la señalización por auxina se ha abordado en muchos trabajos mediante el uso de promotores sintéticos de respuesta a auxina como DR5, aunque este abordaje presenta limitaciones en muchas especies (Rodríguez-Sanz *et al*., 2015). En este tipo de estudios destaca actualmente el uso de anticuerpos anti-AIA, los cuales han permitido analizar los niveles de acumulación de auxina durante distintos procesos de desarrollo en diversas especies (Schlicht *et al*., 2006; Forestan *et al*., 2010; Krouk *et al*., 2010; Rodríguez-Sanz *et al*., 2015; Pérez-Pérez *et al*., 2019). Muchos de los datos obtenidos en relación al papel que juega la auxina en el desarrollo de la planta se han obtenido mediante estudios *in vitro*, generalmente utilizando sistemas en los que se emplean concentraciones de auxina exógena en los medios de cultivo (Larsson *et al*., 2008; Hakman *et al*., 2009; Abrahamsson *et al*., 2012) . En este sentido, los sistemas de embriogénesis *in vitro* de *Brassica napus* y *Hordeum vulgare* son muy adecuados para llevar a cabo estudios sobre el papel de la auxina durante la embriogénesis de microsporas, ya que el proceso de inducción se lleva a cabo a partir de células individuales aisladas que se reprograman y dan lugar a embriones que se desarrollan y diferencian en condiciones *in vitro* en un medio de cultivo en el que en ningún momento se adiciona auxina exógena.

En esta tesis, se ha analizado la dinámica y el posible papel de la auxina endógena durante la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Brassica napus* y *Hordeum vulgare*, así como durante el desarrollo *in vivo* del polen en ambas especies.

1.5.2 Citoquininas

Las citoquininas son un grupo de hormonas vegetales que promueven la división y la diferenciación celular. La función de estas fitohormonas está presente a lo largo de los distintos procesos del desarrollo de la planta (Taiz y Zaiger, 2006), desde la germinación de las semillas hasta la senescencia de la planta (Segura, 2008).

En el año 1941, van Overbeek (van Overbeek *et al*., 1941) observó que la leche de coco promovía la proliferación celular en cultivos de tejidos vegetales, algo que ya había descrito Wiesner en informes anteriores (Wiesner, 1892) al observar cómo determinadas sustancias eran capaces de inducir proliferación celular en tejido dañado. También Haberlandt (Haberlandt, 1913) había ya presentado evidencias científicas de la existencia de sustancias inductoras de la división celular, al descubrir que los tejidos floemáticos difundían una o más sustancias capaces de inducir la división celular en tejido parenquimático de patata en el que previamente no se había detectado división celular. Fueron muchos los esfuerzos llevados a cabo por distintos grupos de científicos para tratar de identificar aquellas sustancias capaces de inducir la división celular, pero no fue hasta la década de 1950 cuando Miller y sus colaboradores (Miller *et al*., 1955) descubrieron la primera citoquinina, una sustancia capaz de provocar la división de células del tabaco, aislada a partir de DNA de esperma de arenque sometido a autoclave. A este compuesto se le asignó el nombre de kinetina en base a su capacidad de promover la división celular (citocinesis) en organismos vegetales. En 1961 el grupo de Miller (Miller, 1961) aisló la primera citoquinina natural en plantas a partir del endospermo de semillas inmaduras de maíz (*Zea mays*), a la que se le otorgó el nombre de zeatina en base al origen de su descubrimiento. Casi simultáneamente, Letham publicó un informe sobre la misma molécula describiéndola como un factor capaz de inducir la división celular, atribuyéndoseles por tanto a ambos el descubrimiento simultáneo de la zeatina. Más adelante, en 1963 Letham describió sus propiedades químicas (Letham, 1963) y desde entonces se han aislado muchas otras citoquininas

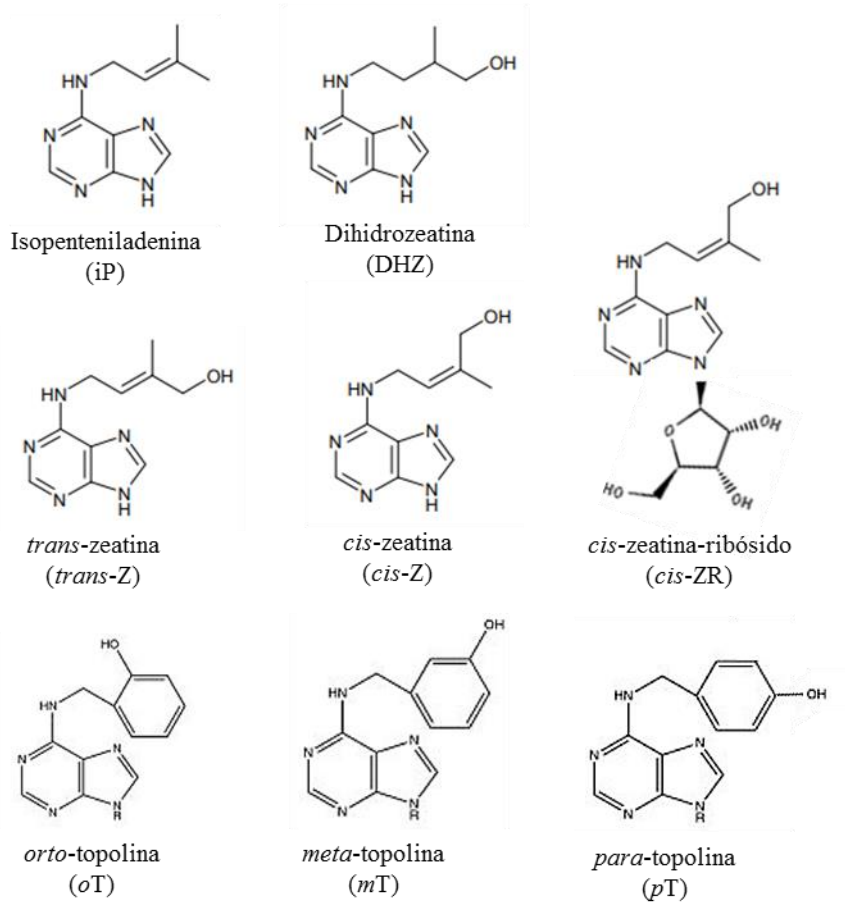
naturales en distintas especies vegetales (Mok y Mok, 2001). También se han descrito varias citoquininas sintéticas con una actividad biológica similar a las naturales, pero mucho más activas que éstas y de las que se requiere por tanto una menor concentración para inducir los efectos propios de este grupo de hormonas. De este modo se pueden distinguir las citoquininas de origen natural, las cuales son derivados de adenina, y las citoquinas sintéticas que pueden derivar de adenina (como la kinetina y la 6-Bencilaminopurina) o de difenilurea (como el thidiazuron) (Kurosaki *et al*., 1981; Schmülling, 2004).

Todas las citoquininas naturales poseen en su estructura molecular un sustituyente de naturaleza isoprenoide o aromática en el nitrógeno amínico de la posición 6 del anillo de purina. En base a la naturaleza de este sustituyente, las citoquininas se clasifican en dos grandes grupos: citoquininas isoprenóidicas, donde se incluyen la isopentenil adenina (iP), la zeatina (Z) y la dihidrozeatina (DHZ); y citoquininas aromáticas como la benciladenina (BA), la kinetina y las orto/meta/para-hidroxibenciladeninas (conocidas comúnmente como topolinas oT, mT y pT por la denominación checa del chopo: *topol*, donde fueron aisladas).

Las CKs pueden encontrarse en las plantas como bases libres o formando conjugados con diversos compuestos químicos que se unen al anillo de purina o a la cadena lateral. Las principales formas conjugadas de las CKs son los ribósidos (conjugación con una ribosa en la posición 9 del anillo de purina), los ribótidos (cuando el ácido ortofosfórico se esterifica en posición 5' con el correspondiente ribósido) y los glicósidos (conjugación con un resto de glucosa, ya sea en el anillo (N-glucósidos) o en el grupo hidroxilo de la cadena lateral (O-glucósidos) (Frébort *et al*., 2011). Una característica del metabolismo de las citoquininas es la rápida interconversión entre bases libres y sus conjugados, considerándose un mecanismo para regular la concentración de compuestos activos en la planta. Se piensa que las bases libres son los compuestos biológicamente más activos, mientras que sus conjugados juegan un papel en el transporte, en la protección frente a la degradación y en la inactivación reversible e irreversible de estos compuestos (Letham, 1994; Schmülling, 2004).

En la figura 18 aparece una recopilación de las citoquininas, tanto naturales como sintéticas, más importantes.

CITOQUININAS NATURALES



CITOQUININAS SINTÉTICAS

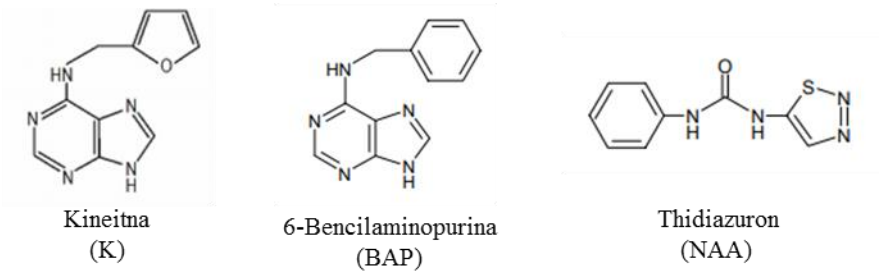


Figura 18. Principales citoquininas naturales y sintéticas.

En plantas superiores se ha descrito la zeatina como forma predominante de citoquinina. Debido a que la cadena lateral de la zeatina tiene un doble enlace, puede estar presente en la planta en su configuración *cis* o *trans*, siendo ambas interconvertibles por la enzima zeatina isomerasa. Aunque tradicionalmente la mayoría de los efectos de la zeatina se han atribuido a su forma *trans*, estudios recientes sugieren

que la forma *cis* se encuentra en niveles elevados y jugando un papel importante en un gran número de especies vegetales y en determinados tejidos (Martin *et al*., 2001).

Tras numerosos estudios, se ha visto que la citoquinina está involucrada en múltiples procesos del crecimiento y desarrollo de la planta como por ejemplo en el desarrollo del meristemos (Werner *et al*., 2003), en la floración (Bartrina *et al*., 2017), inhibición de la senescencia foliar (Gan y Amasino, 1995; Akhtar *et al*., 2019), en la tolerancia a distintos estreses abióticos (Ha *et al*., 2012; Pavlú *et al*., 2018), inhibiendo la formación de raíces laterales (Laplaze *et al*., 2007;Bielach *et al*., 2012), en la diferenciación del floema y el metaxilema en raíces (Mahönen *et al*., 2000) y promoviendo el movimiento de nutrientes (Taniguchi, *et al*., 2001). También se ha demostrado su implicación en el desarrollo de cloroplastos (Cortleven y Schmülling, 2015), de frutos y semillas (Ashikari *et al*., 2005; Jameson y Song, 2015) y, más recientemente, también se ha visto que juega un importante papel en la interacción planta-bacteria (Akhtar *et al*., 2020).

Sin embargo, a pesar de las importantes funciones que desempeña la citoquinina en el crecimiento y desarrollo postembrionario, aún no está claro el papel que juega esta hormona en la embriogénesis temprana. Lo que si se ha demostrado es que la citoquinina tiene un efecto estimulante en la regeneración vegetal (Tran *et al*., 2016; Sagare *et al*., 2000) y, al mismo tiempo, hay cada vez más evidencias de que su función debe ir acompañada de la intervención de otras hormonas que complementen su efecto. Existen estudios que demuestran la interacción de citoquininas con otras fitohormonas como las giberelinas, el etileno, las estrigolactonas o el ácido abscísico, pero la mayoría de los estudios se centran en su destacada interacción con las auxinas (El-Showk *et al*., 2013).

Desde hace más de medio siglo, se sabe que la interacción entre citoquininas y auxinas juega un papel crucial en múltiples aspectos del desarrollo de la planta, a menudo actuando de manera antagónica (Coenen y Lomax, 1997). En 1957, Skoog y Miller (Skoog y Miller, 1957) demostraron que la organogénesis *in vitro* podía controlarse variando las cantidades relativas de citoquinina y auxina en el medio de cultivo. Si los callos indiferenciados se cultivaban en un medio con alta proporción de citoquinina con respecto a auxina se desarrollan numerosos brotes y escasas raíces,

mientras que si el medio contaba con una mayor proporción de auxina frente a citoquinina se producían pocos brotes y numerosas raíces; si la concentración de ambas hormonas era equivalente, el resultado final era la obtención de callos indiferenciados. Desde entonces, la interacción entre estas dos hormonas ha sido objeto de estudio en múltiples sistemas de desarrollo (Müller y Sheen, 2008; Lee *et al*., 2009; Moubayidin *et al*., 2009; Shimizu-Sato *et al*., 2009; Cheng *et al*., 2010; Jones *et al.*, 2010; Pernisova *et al*., 2011; Su *et al*., 2011;; Hwang *et al*., 2012; El-Showk *et al*., 2013; Schaller *et al*., 2015). Sin embargo, aún no se ha establecido una relación clara en cuanto a la interferencia en sus rutas de biosíntesis, transporte y señalización, pudiendo actuar ambas hormonas de manera sinérgica o antagónica dependiendo del proceso y sistema estudiado (El-Showk *et al*., 2013). En gran medida este desconocimiento es causa de que a día de hoy aún no se tiene información suficiente del modo de acción de la citoquinina, su biosíntesis o sus mecanismos de transporte y degradación.

En los últimos años, la mayoría de estudios se han centrado en la aplicación exógena de la hormona y la posterior evaluación de la respuesta inducida en la planta (Valdés *et al*., 2001; Z. Xie *et al*., 2004; Yang *et al*., 2016; Panda *et al*., 2018), con la consecuente limitación que ello supone para la caracterización de los genes implicados en la transducción, la liberación, la conjugación y la inactivación de esta hormona. Sin embargo, el creciente acceso a herramientas genéticas y moleculares disponibles en los últimos años, con especial importancia de la trasformación genética de plantas (Walden *et al*., 1997), están permitiendo caracterizar con más detalle los componentes implicados en sus rutas (Hutchison y Kieber, 2002; Aoyama y Oka, 2003; Grefen y Harter, 2004; Ferreira y Kieber, 2005; Hwang y Sakakibara, 2006; Bartrina *et al*., 2017), aunque aún quedan muchas preguntas que resolver. La mayoría de los estudios realizados en este campo se han llevado a cabo en la especie modelo *Arabidopsis thaliana*. Sin embargo, a día de hoy ya son muchos los estudios de citoquininas que utilizan otras especies de interés y que han permitido comprobar como la alteración de cualquiera de sus rutas conlleva grandes impactos en las distintas etapas del crecimiento y desarrollo de la planta (Márquez-López *et al*., 2019).

Biosíntesis y degradación de citoquinina

Hasta hace unos años, se pensaba que la única vía de producción de citoquininas en las plantas era mediante la biosíntesis *de novo* de la molécula. Y, aunque recientemente se ha descrito una ruta alternativa en la que se parte de t-RNA para la obtención de citoquininas del tipo *cis*-zeatina mediante la modificación de las bases de los nucleótidos, es una ruta muy poco frecuente.

Las biosíntesis *de novo* de citoquininas implica la actividad en cascada de tres familias de genes: isopenteniltransferasas (IPT), citocromo monooxigenasas P450 (CYP735A) y fosforibohidrolasas 5´-monofosfato o *LONELY GUY* (LOG) (Fig. 19).

En *Arabidopsis thaliana* se han identificado nueve genes dentro de la familia de las IPT, siete de ellos codifican para ATP/ADP/AMP-IPTs (*IPT1*, *IPT3*, *IPT4*, *IPT5*, *IPT6*, *IPT7* e *IPT8*) y los otros dos codifican para tRNA-IPTs (*IPT2* e *IPT9*) (Takei *et al*., 2001b). También en esta especie se han identificado nueve genes LOG (*LOG1*-*LOG9*) (Kuroha *et al*., 2009) y dos genes que codifican para citocromo P450 monooxigenasas (*CYP735A1* y *CYP735A*) (Takei *et al*., 2004). Además, se han encontrado genes homólogos de las tres familias en un gran número de especies vegetales, lo que apoya una alta conservación de sus funciones en plantas (Frébort *et al*., 2011; Nelson y Werck-Reichhart, 2011; Simm *et al.*, 2016).

La primera reacción de esta ruta está catalizada por isopenteniltransferasas, estas enzimas utilizan preferiblemente ATP, ADP y menos comúnmente AMP como sustratos aceptores de isopreno y el compuesto dimetilalil pirofosfato (DMAPP) como donante de prenilo (Hwang y Sakakibara, 2006). El DMAPP se puede obtener a través de la ruta del metileritritol (MEP) o por la vía del mevalonato (MVA). La iP y *t*Z se originan predominantemente a partir de DMAPP procedente de la ruta MEP, mientras que el mayor porcentaje de *c*Z se origina a partir del DMAPP producido en la ruta MVA.

En esta primera reacción mediada por IPTs se obtiene como producto iP ribótidos que pueden ser de tipo iPRTP, iPRDP o iPRMP, dependiendo del sustrato de partida. Tanto las formas iPRTP como iPRDP pueden experimentar defosforilación por enzimas fosfatasas, dando lugar al ribótido iPRMP.

A continuación, estas moléculas iPRMP experimentan una hidrólisis en su grupo fosfato por la acción de la enzima 5´-ribonucleótido fosfohidrolasa pasando a formar iP ribósidos (iPR) que más tarde darán lugar a moléculas de iP por una reacción llevada a cabo por la enzima adenosina nucleosidasa. Paralelamente, la enzima CYP735A transforma iP ribótidos en *t*Z ribótidos (*t*ZRTP, *t*ZRDP o *t*ZRMP), que darán lugar a *t*Z ribósidos (*t*ZR) y en último lugar a la forma activa de la citoquinina *t*Z. Se ha descrito que las formas *t*ZR y *t*Z pueden transformarse en moléculas de DZR y DZ respectivamente por la acción de la enzima zeatina reductasa.

Por otro lado, tiene lugar la prenilación de adenina por la acción de la enzima tRNA-isopenteniltransferasa (Miyawaki *et al*., 2004), dando lugar a prenil-tRNA. A continuación, la enzima citoquinina *cis*-hidroxilasa media la obtención de *cis*-prenil-tRNA a partir del cual se obtienen *c*Z ribótidos de tipo *c*ZRMP. Finalmente, estos *c*Z ribótidos pasan a formar *c*Z ribósidos que dan lugar a moléculas de *cis*-zeatina (*c*Z). Adicionalmente, en cualquiera de los casos se puede obtener directamente la forma activa de las distintas citoquininas (iP, *t*Z, DZ o *c*Z) a partir de su forma ribótida mediante la acción de enzimas LOG. Además, como se ha comentado anteriormente, una característica destacada del metabolismo de las citoquininas es la rápida interconversión entre bases libres y sus conjugados, donde intervienen enzimas adenosina kinasas (AK) y purina nucleósido fosforilasas.

A pesar de que la ruta de biosíntesis por degradación de tRNA se considera una ruta de escasa relevancia para la síntesis de citoquinina, esta ruta supone una importante vía en determinadas especies como el maíz o el arroz donde los niveles de *cis*-zeatina son elevados, sugiriendo que las plantas son capaces de modular de manera independiente los niveles de *t*Z y *c*Z (Kasahara *et al*., 2004).

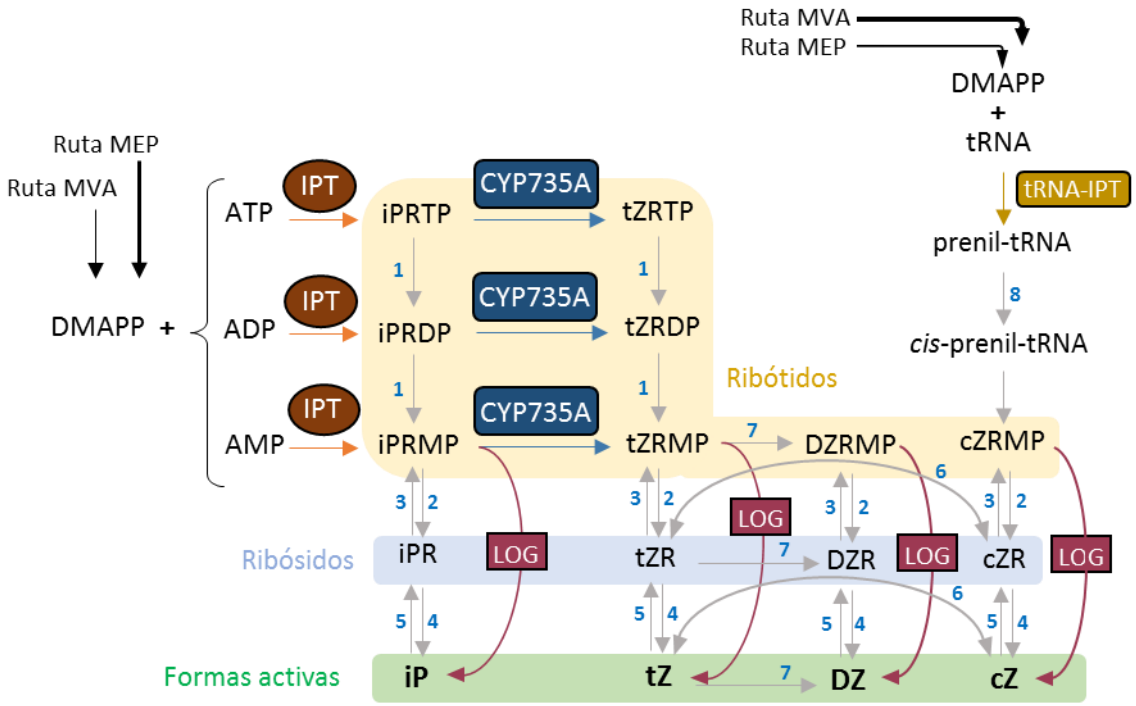


Figura 19. Ruta de biosíntesis de citoquininas. Isopenteniladenina (iP), *trans*-zeatina (*t*Z), *cis*-zeatina (*c*Z), dihidrozeatina (DHZ), ruta del metileritritol (ruta MEP), ruta del mevalonato (ruta MVA). La flecha más gruesa marca la procedencia mayoritaria del dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Isopenteniltransferasa (IPT). Los números junto a las fechas de tono gris indican la enzima responsable de la reacción: 1) fosfatasa; 2) 5´-ribonucleótido fosfohidrolasa; 3) adenosina kinasa; 4) adenosina nucleosidasa; 5) purina nucleósido fosfohidrolasa; 6) zeatina *cis*-*trans*-isomerasa; 7) zeatina reductasa; 8) citoquinina *cis*-hidroxilasa. Ribótidos de isopenteniladenina (iPRTP, iPRDP, iPRMP), ribósidos de isopenteniladenina (iPR), Ribótidos de *trans*-zeatina (*t*ZRTP, *t*ZRDP, *t*ZRMP), ribósidos de *trans*-zeatina (*t*ZR), ribótidos de dihidrozeatina (DZRMP), ribósidos de dihidrozeatina (DZR), Ribótidos de *cis*-zeatina (*c*ZRTP, *c*ZRDP, *c*ZRMP), ribósidos de *cis*-zeatina (*c*ZR).

Los niveles de citoquinina activa en la planta vienen determinados tanto por la degradación como por la inactivación por conjugación de las formas activas de citoquinina. La inactivación por conjugación es llevada a cabo por glicosiltransferasas, las cuales inactivan las moléculas de citoquinina mediante una reacción de glicosilación. Por otro lado están las enzimas citoquinina oxidasa/deshidrogenasa (CKX), encargadas de catalizar la degradación irreversible de citoquininas mediante escisión de la cadena lateral de la molécula, dejando como resultado de la reacción bases de adenina o adenosina escindidas de su cadena lateral (Amstrong, 1994; Thomas Schmülling *et al.*, 2003). Las proteínas CKXs están codificadas por una familia multigénica que en *A. thaliana* comprende siete genes (*CKX1-CKX7*) localizados principalmente en el

apoplasto, el citosol y la vacuola (Niemann *et al*., 2018). En este proceso de degradación resulta determinante el grado de afinidad que presenta la molécula de citoquinina frente a las enzimas metabólicas. Por ejemplo, se ha demostrado que las formas *t*Z y iP son catalizadas rápidamente por CKX en varias especies de plantas (Bilyeu *et al*., 2001; Galuszka *et al*., 2004), mientras que *c*Z es generalmente menos sensible a la acción de estas enzimas. Además, debido a que la acción de las CKX implica el reconocimiento del doble enlace presente en la cadena lateral del isoprenoide, DZ y las citoquininas aromáticas son resistentes a la degradación por estas enzimas, desconociéndose hasta el momento una ruta alternativa para su degradación irreversible. Sin embargo, y aunque hasta el momento no se ha descrito con exactitud, se ha visto que las citoquininas aromáticas podrían compartir algunos de los sistemas de biosíntesis e inactivación descritos para las citoquininas isoprenoides, ya que muchas de las enzimas y receptores involucrados son capaces de reconocer ambos tipos de citoquininas (Mok *et al.*, 2005).

Transporte de citoquinina

Debido a que la biosíntesis *de novo* de citoquininas ocurre en tejidos y células específicos, se hace evidente el hecho de que estas citoquininas deben ser transportadas hasta las células diana mediante algún sistema de transporte. Hasta hace unos años se desconocía la existencia de transportadores para estas moléculas, atribuyéndose su movilización a vías pasivas de difusión. Sin embargo, los estudios en este campo sugerían que era necesaria la existencia de un sistema de transporte activo adicional al transporte por difusión para llevar a cabo el transporte intercelular, intracelular y la translocación a larga distancia como por ejemplo entre las raíces y la parte aérea de la planta. Como veremos más adelante, la disponibilidad de citoquininas en el apoplasto juega un papel crucial en la ruta de señalización de esta hormona, puesto que es ahí donde se encuentran las proteínas receptoras de la molécula.

Hasta el momento se han descrito tres posibles transportadores involucrados en el transporte transmembrana y la translocación intracelular de citoquininas: purina permeasas (PUPs), transportadores equilibrativos de nucleósidos (ENTs, *Equilibrative*

nucleoside transporters) y transportadores dependientes de ATP o transportadores ABC de la subfamilia G (ABCGs, *ATP-binding cassette*) (Borghi *et al*., 2015) (Fig. 20)

Durante la última década, la investigación en transportadores de citoquininas se ha centrado en el estudio de PUPs y ENTs, por la similitud estructural que presentan citoquininas y purinas. Ambos se consideran transportadores encargados de importar citoquininas desde el apoplasto hasta el citosol, difiriendo en su afinidad por la forma en que se encuentre la citoquinina. Los transportadores PUPs se encargan de transportar formas activas de la citoquinina (predominantemente *t*Z y *c*Z) (Bürkle *et al*., 2003), mientras que las proteínas ENT se han propuesto como los principales trasportadores de nucleósidos (Sun *et al*., 2005).

Recientemente fue descrito el tercer tipo de transportadores, los ABCGs, que al contrario de los dos tipos anteriores, actúan como exportadores de citoquininas desde el citosol hacia el apoplasto, atribuyéndoseles el transporte acropétalo a larga distancia de citoquininas desde la raíz hacia la parte aérea del brote (Ko *et al*., 2014 ; Zhang *et al*., 2014). El genoma de *Arabidopsis* codifica para numerosos miembros de las tres familias de transportadores, incluyendo 21 PUPs, 8 ENTs Y 28 transportadores del tipo ABCG (Kang *et al*., 2011; Li *et al*., 2003; Zürcher *et al*., 2016), mientras que el número de homólogos varía drásticamente en otras especies (Liu *et al*., 2019) como por ejemplo la presencia de solo cuatro ENTs en el genoma del arroz (Hirose *et al*., 2005). Es muy probable que exista algún tipo de trasportador que actúe a nivel intracelular desde los plastidios, mitocondrias y vacuola hacia el citosol, sin embargo hasta el momento no hay información al respecto (Márquez-López *et al*., 2019), ya que a pesar de los últimos progresos en esta área (Durán-medina *et al*., 2017; Kang *et al*., 2017; Ko y Helariutta, 2017; Park *et al*., 2017; Liu *et al*., 2019), aún faltan muchos aspectos por comprender en el transporte de citoquininas.

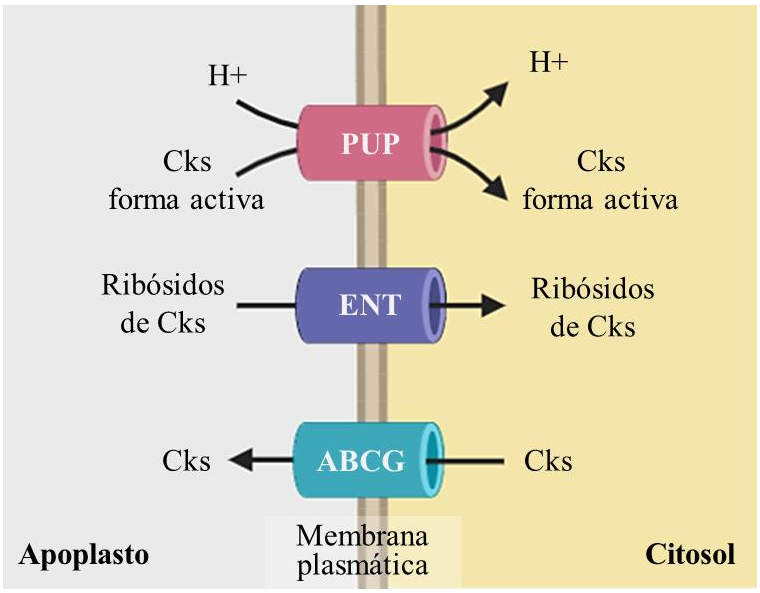


Figura 20. Transporte de citoquininas.

Se ha visto que la forma DZ de la citoquinina se encuentra predominantemente en órganos de reserva, actuando como un reservorio principalmente durante la germinación de la planta (Frébort *et al*., 2011), mientras que por el contrario las formas iP, *t*Z y *c*Z activas y sus ribósidos y glicósidos tienen una tasa de acumulación muy baja (Hwang y Sakakibara, 2006; Kieber y Schaller, 2014) y una mayor movilidad a través de transportadores que les permite actuar en la diana de un tejido o tipo celular concreto (Lomin *et al*., 2015). Además, la glicosilación de citoquininas que tiene lugar en el citosol le sirve a la célula para mantener la homeostasis intracelular, ya que hace a la molécula más hidrofílica y fácil de reconocer por los transportadores, afectando a la liberación de citoquininas desde el citosol hacia el apoplasto.

Señalización de citoquinina

Las citoquininas presentan una vía de señalización de dos componentes (TCS, *Two-component system*). Este tipo de señalización TCS es habitual en organismos procariotas y eucariotas inferiores, y en eucariotas superiores está presente únicamente en plantas. Se trata de un sistema que implica la presencia de una proteína receptora histidina kinasa (HK, *Histidin kinase*) ubicada en la membrana. Esta proteína se caracteriza por tener un dominio extracelular de reconocimiento del ligando denominado CHASE (*Cyclases/Histidine Kinases Associated Sensory Extracellular*), que actúa como sensor. Al

unirse la citoquinina con el receptor, se inducen cambios conformacionales en el mismo, dimerizando y provocando la autofosforilación de un residuo de histidina que se encuentra en su dominio citoplásmico. A continuación, el grupo fosforilo se transfiere desde el residuo de histidina a un residuo de aspartato del carbono terminal de la HK, que más adelante se transfiere a un residuo de histidina de una proteína histidina fosfotransferasa (HP, *Histidin phosphotransferase*). Las HPs, que continuamente están moviéndose entre el núcleo y el citosol, son las encargadas de activar mediante la fosforilación de un residuo de aspartato a los reguladores de respuesta a citoquinina (RR, *Response Regulators*) (Schmülling, 2004). Este movimiento dentro y fuera del núcleo de los RR es independiente de su estado de fosforilación y se ha visto que no se ve alterado por la aplicación de citoquinina exógena (Punwani *et al*., 2010).

En *Arabidopsis*, los reguladores de respuesta a citoquinina (ARR, *Arabidopsis Response Regulators*) se clasifican en tres tipos: A, B y C, en función de la secuencia de su dominio receptor y de la estructura del dominio C terminal (To y Kieber, 2008). El grupo de los ARR de tipo A agrupa a las proteínas ARR3-9 y ARR15-17, las cuales presentan un dominio receptor central flanqueado a ambos lados por secuencias cortas sin un dominio de unión al DNA (D´Agostino *et al*., 2000). La transcripción de estos genes está regulada positivamente por citoquininas y actúan como reguladores negativos de la señal, además se ha visto que son capaces de inhibir su propia expresión mediante un mecanismo de retroalimentación negativa (Kim, 2008).

El grupo de los ARR de tipo B incluye las proteínas ARR1-2, ARR10-14 y ARR18-21, este grupo presenta un dominio receptor y un dominio de unión a DNA en la región C-terminal llamado GARP que se une preferentemente a secuencias 5´-(A/G)GAT(T/C)-3. Estas características en su estructura indican su función como activadores de la transcripción y reguladores positivos de la señalización de citoquininas (Schmülling, 2004).

El tercer grupo son los ARR de tipo C, los cuales incluyen a las proteínas ARR22 y ARR24. Este último grupo no presenta ningún dominio de unión al DNA y no están regulados por citoquininas (To y Kieber, 2008), de modo que carecen de interés para la ruta de señalización de citoquininas.

El gran número de ARR descritos tanto en plantas angiospermas como gimnospermas y su similitud en cuanto a estructura y comportamiento, sugieren un alto grado de conservación de las mismas (Pils y Heyl, 2009).

Puede por tanto resumirse que la fosforilación de los reguladores de respuesta de tipo A bloquea la fosforilación de ARR tipo B, mientras que la fosforilación de reguladores de respuesta de tipo B induce su unión al DNA e inicia la transcripción de genes de respuesta a citoquinina, incluyendo los reguladores de respuesta de tipo A, los cuales actúan como inhibidores de señalización de citoquinina (El-Showk *et al*., 2013)(Fig. 21).

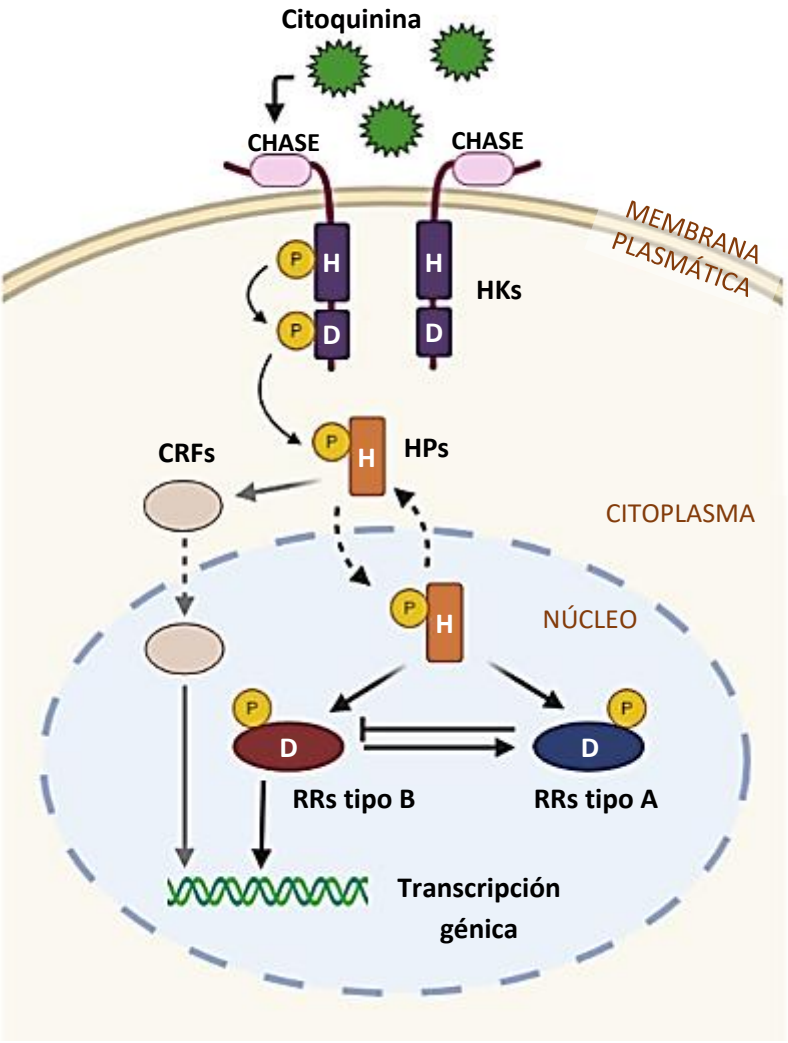


Figura 21. Ruta de señalización de citoquininas.

Sin embargo, a pesar de los avances llevados a cabo para intentar explicar el modo de acción de las CKs en base a un modelo similar para todos los procesos en los que participa, aún no está claro que su modo de acción sea único y el mecanismo de transducción parece ser diferente dependiendo del tipo celular y del receptor concreto que sea activado por la CK.

En *Arabidopsis* se han descrito tres receptores de citoquinina: AHK2, AHK3 y AHK4. En todos ellos el dominio extracelular (CHASE) que actúa como sensor de citoquininas está altamente conservado. Estos receptores tienen diferentes afinidades por los distintos tipos de CKs (Spíchal *et al*., 2004) y su distribución específica en los tejidos de la planta podría ser la responsable de los distintos efectos que una misma CK tiene en los diferentes tejidos. También en esta especie se han descrito cinco genes AHP (AHP1-AHP5) (Suzuki *et al*., 1998), todos ellos con actividad de fosforilación (Tanaka *et al*., 2014).

Además, en los últimos años se han descrito un conjunto de factores de transcripción regulados por CKs conocidos como factores de respuesta de citoquinina (CRFs, *Citoquinin Response Factors*), a los que se ha considerado como una rama potencial de la TCS. Sin embargo, poco sabe acerca de cómo los CRFs realmente interactúan entre sí y con los miembros de la vía TCS, aunque los estudios realizados hasta el momento sostienen que CRFs podrían estar situados aguas abajo en la vía de señalización de las AHPs y probablemente funcionarían en paralelo con los ARRs de tipo B en su acción sobre las CKs (Rashotte y Goertzen, 2010; Cutcliffe *et al*., 2011)

Se ha avanzado mucho en el conocimiento de la percepción y transducción de la señal de citoquininas, sin embargo, aún son muchas las incógnitas por resolver. Una nueva herramienta de gran interés para el avance en este ámbito ha resultado ser el uso de compuestos sintéticos, los cuales asemejan su estructura a la de las citoquininas endógenas y son capaces de unirse con gran afinidad a sus receptores, modificando la ruta de señalización (Lomin *et al*., 2012).

En esta tesis se ha llevado a cabo un estudio sobre la dinámica y posible implicación de la citoquinina durante la embriogénesis de microsporas de *Brassica napus* y *Hordeum vulgare*. Entre las distintas metodologías empleadas cabe destacar el uso del compuesto 6-(2-hidroxi-3-metillbencilamino) purina (PI-55) para llevar a cabo

estudios funcionales de actividad de la citoquinina durante la embriogénesis de la microspora. El PI-55 es la primera molécula descubierta que actúa como antagonista de la actividad de la citoquinina a nivel de receptores, habiéndose demostrado en numerosos casos su capacidad de inhibir la percepción de citoquinina *in planta* (Spíchal *et al*., 2009), específicamente a nivel del receptor AHK4.

1.6 PARED CELULAR

La pared celular vegetal es una estructura compleja que cumple importantes funciones a lo largo del ciclo de vida de la planta. Se trata de una estructura que rodea la membrana plasmática y tiene una rigidez suficiente como para mantener la integridad estructural de la célula resistiendo las presiones hidrostáticas internas y, a su vez, presenta la flexibilidad necesaria para remodelarse rápidamente en respuesta a estímulos del desarrollo, permitiendo la división y diferenciación celular. Además, actúa como primera línea de defensa frente a patógenos y estrés ambiental. Esta estructura también juega un importante papel en la comunicación intercelular y con el entorno debido a la amplia gama de receptores, poros y canales que regulan el movimiento molecular (Keegstra, 2010; Houston *et al*., 2016).

La estructura general de la pared celular vegetal está compuesta por tres capas principales: la lámina media, la pared celular primaria y la pared celular secundaria, enumeradas de más externa a más interna (Fig. 22). La lámina media es una capa compuesta principalmente por pectinas y hemicelulosas que une las paredes primarias de dos células contiguas. La denominada pared primaria es más dinámica y se establece en las células jóvenes durante la división, mientras que por el contrario la pared secundaria es más gruesa y no aparece hasta que la célula ha dejado de crecer y dividirse, localizándose entre la pared primaria y la membrana plasmática.

La pared celular está compuesta principalmente por polisacáridos de celulosa, hemicelulosas (principalmente xiloglucanos), pectinas y proteínas. Estructuralmente, la celulosa aparece formando microfibrillas unidas entre sí por hemicelulosas. Esta red de celulosa-hemicelulosa se encuentra embebida en una matriz compuesta principalmente de pectinas y aproximadamente un 10% de proteínas y, en el caso de la pared secundaria, hasta un 40% de lignina (Tan *et al*., 2013).

Dentro de las proteínas que forman parte de esta matriz están las denominadas proteínas solubles (como las peroxidasas) y las proteínas estructurales. En el grupo de proteínas estructurales se encuentran proteínas ricas en glicina y proteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs, *Hyp-rich glycoproteins*), clasificándose estas últimas en proteínas ricas en prolina, extensinas y proteínas de arabinogalactano (AGPs, *arabinogalactan proteins*).

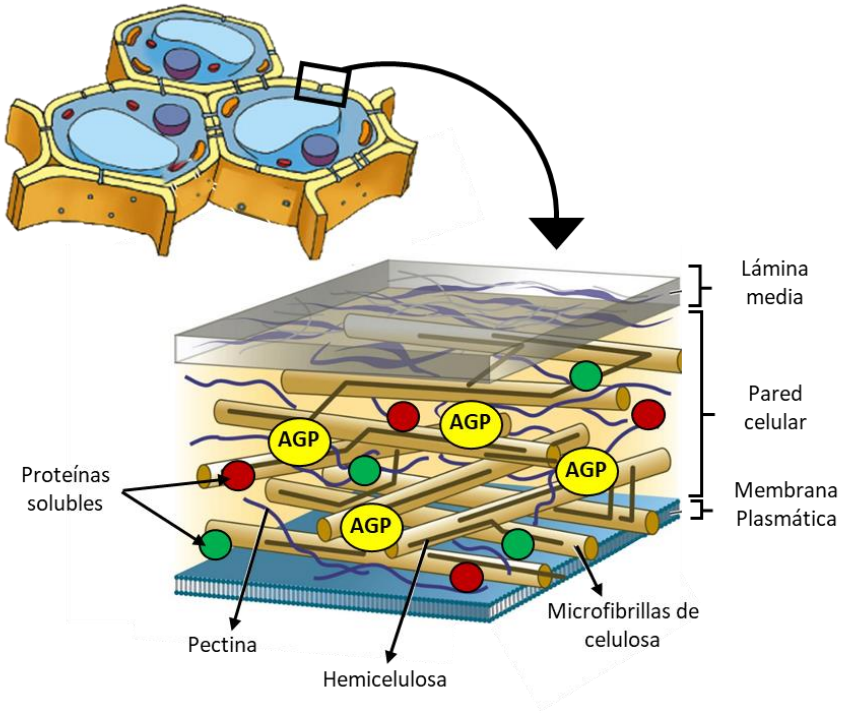


Figura 22. Estructura de la pared celular. Fuente: modificado de https://biology-forums.com.

Durante el desarrollo y en respuesta a señales externas, tanto el crecimiento como la diferenciación celular requieren de la remodelación de las redes de polisacáridos y los componentes de la matriz (Barnes y Anderson, 2018). Varios estudios han evidenciado el papel crucial de componentes de la pared celular como las pectinas y las AGPs durante distintos procesos del desarrollo en plantas (Chudzik *et al*., 2018; Leszczuk *et al*., 2019; Ric-Varas *et al*., 2020), incluyendo la embriogénesis somática y cigótica (van Hengel *et al*., 2002; Šamaj *et al*., 2005; El-Tantawy *et al.*, 2013; Rodríguez-Sanz *et al*., 2014; Corral-Martínez *et al*., 2019).

1.6.1 Pectinas

Las pectinas son uno de los principales componentes de la pared celular de las plantas, las cuales constituyen aproximadamente un 35% de las paredes celulares primarias de las plantas dicotiledóneas (Fry, 1988). Las pectinas influyen en múltiples propiedades de la pared celular, como la porosidad, la carga superficial, el pH y balance iónico (McNeil *et al*., 1984).

El término pectina describe una familia de heteropolisacáridos que tienen en común la presencia de ácido galacturónico (GalA) en su composición en mayor o menor medida. Se reconocen tres dominios principales de polisacáridos en las pectinas, en función de su estructura molecular y la diversidad de sus cadenas laterales: homogalacturonano (HG), ramnogalacturonano I (RGI) y ramnogalacturonano II (RGII). HG es un polímero lineal formado por residuos de ácido galacturónico, unidos entre sí por enlaces (1→4)-α-D-GalA y es el dominio más abundante de las pectinas de la pared celular (65%). RGI suele aparecer en una proporción del 20-30%, consiste en una repetición de los disacáridos constituidos por ramnosa y ácido galacturónico [→4)-α-D-GalA- (1→2)-α-L-Rha-(1→], siendo frecuente la presencia de cadenas laterales integradas por distintos azúcares neutros como galactosa y arabinosa partiendo de los residuos de ramnosa. RGII es la pectina menos abundante (1-8%) y a su vez la más compleja, tratándose de una cadena principal similar al HG asociada a una amplia variedad de azúcares como ramnosa, fucosa, xilosa, galactosa y otros menos comunes como apiosa, ácido acérico o ácido 3-desoxi-mano-octulosónico (KDO) (Fig. 23). La estructura de las pectinas es alterada de forma muy significativa por enzimas específicas de la pared celular, ya que es necesario una remodelación constante durante el desarrollo (Willats y Knox, 1999).

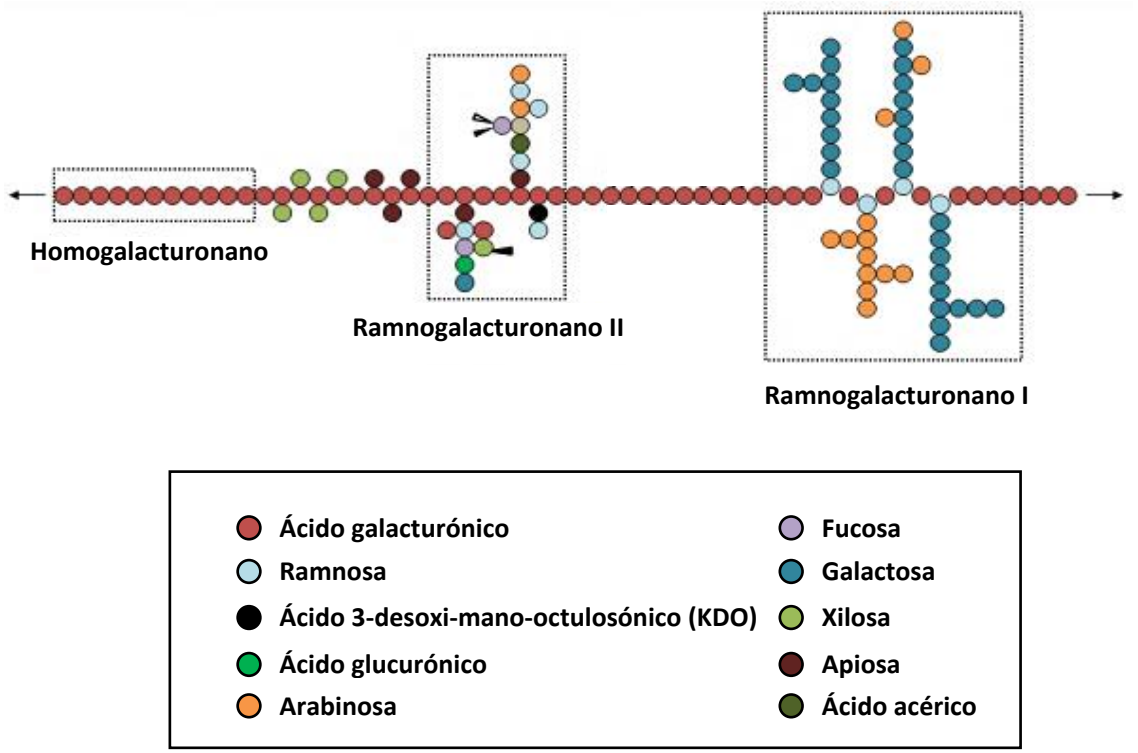


Figura 23. Estructura básica de la pectina. Fuente: modificado de Willats *et al*., 2006.

El polímero HG es el más abundante de los dominios de las pectinas, se sintetiza en el aparato de Golgi y más tarde es depositado en la pared celular en una forma altamente metilesterificada, formando estructuras con un 70-80% de residuos de GalA metilesterificados en el grupo carboxilo del C-6 (O'Neill *et al*., 1990; Mohnen, 1999), los cuales pueden ser desesterificados *in muro*. El grado de metilesterificación del HG está controlado por enzimas pectinmetilesterasas (PMEs) (Pelloux *et al*., 2007), reguladas a su vez por el pH de la pared celular y por inhibidores endógenos de PME (PMEIs) (Bosch *et al*., 2005; Juge, 2006; Röckel *et al*., 2008). A menudo la literatura se refiere al proceso de metiesterificación de las pectinas como esterificación, de forma abreviada. Las PME son enzimas que pertenecen a una familia multigénica muy conservada (Pelloux *et al*., 2007) las cuales catalizan la demetilesterificación o desesterificación del HG, liberando metanol y dejando grupos carboxilo cargados negativamente en el proceso (Fig. 24).

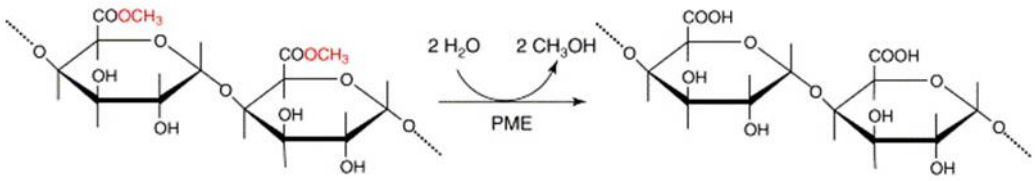


Figura 24. Demetilesterificación de pectinas por la acción de pectinmetilesterasas PME. Fuente: http://saber.ucv.ve/.

El grado y el patrón de la metilesterificación del HG determinan las propiedades biomecánicas de la pared celular. La demetilesterificación puede darse de dos maneras: en bloque o *random* (Fig. 25).

Cuando varios residuos de GalA son demetilesterificados se denomina demetilesterificación en bloque o *block-wise de-methylesterification* y los grupos carboxilos cargados negativamente pueden formar puentes de calcio con otras moléculas HG demetilesterificadas, aumentando la rigidez de la pared celular (Wormit y Usadel, 2018). También puede tener lugar la demetilesterificación parcial del HG denominada demetilesterificación *random*, que convierte a estos dominios en dianas para enzimas degradadoras de pectinas como las poligalacturonasas y las pectato/pectin liasas que pueden dar lugar a la formación de moléculas señal (oligogalacturonidos) durante por ejemplo las interacciones planta-patógeno, y por tanto afectan también a la textura y rigidez de la pared celular (Wormit y Usadel, 2018). Los principales reguladores de PME son las enzimas PMEI, identificadas por primera vez en el fruto de la planta del kiwi (*Actinidia deliciosa* (Balestrieri *et al*., 1990), y desde entonces objeto de estudio de múltiples investigaciones en distintas especies vegetales (Wormit y Usadel, 2018).

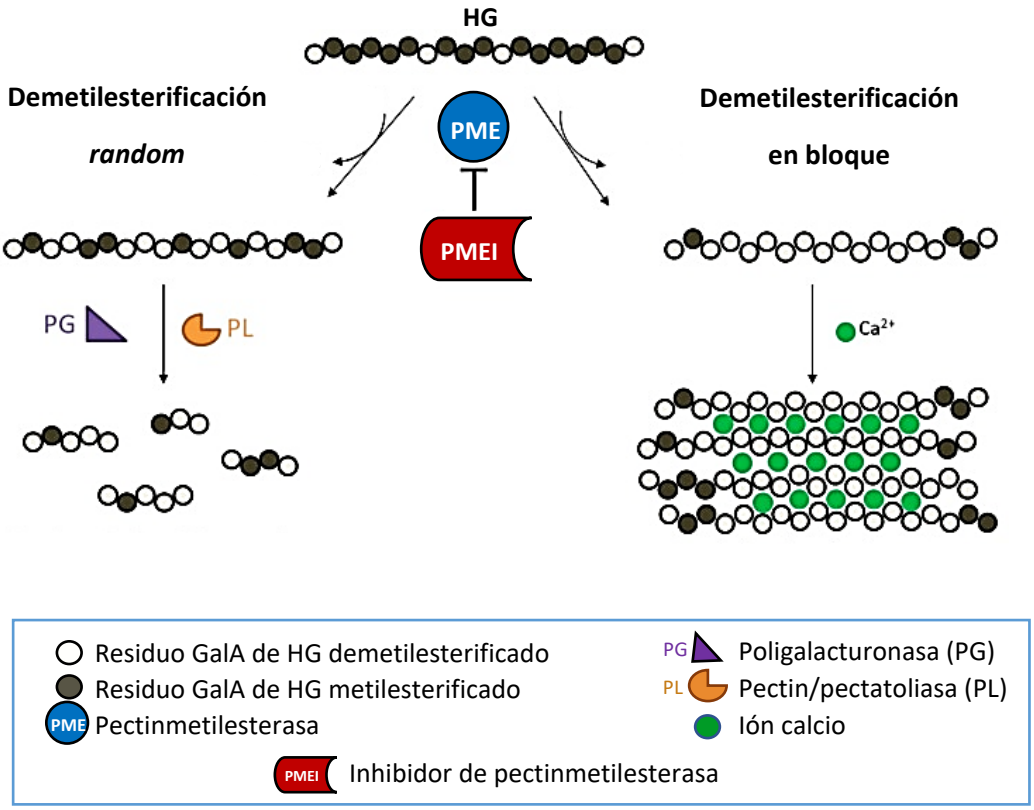


Figura 25. Demetiesterificación del HG de las pectinas y los efectos en su estructura. Fuente: modificado de Wormit y Usadel, 2018.

Los cambios en el estado de metilesterificación de las pectinas, controlados por PMEs y PMEIs, han sido relacionados con la remodelación de la pared celular que tiene lugar durante diversos procesos del desarrollo de las plantas, incluyendo la adhesión celular, la apertura de estomas, la maduración de frutos y senescencia e incluso el movimiento sistémico del virus del mosaico del tabaco (Willats, *et al*., 2001; Willats *et al*., 2001; Baluška *et al*., 2002; Chen y Citovsky, 2003; Ryden *et al*., 2003; Baluška *et al*., 2005; Daher y Braybrook, 2015; Amsbury *et al*., 2016). Estudios recientes han mostrado que los cambios en la mecánica de la pared celular controlados por el estado de metilesterificación y demetilesterificación están relacionados con el inicio de la organogénesis, el crecimiento de embriones tempranos y la progresión de la embriogénesis (Levesque-Tremblay *et al*., 2015).

Existe una importante batería de anticuerpos monoclonales como JIM5, JIM7 (desarrollados en el John Innes Institute, de donde procede su denominación como JIM: John Innes Monoclonal), LM19 y LM20 (Desarrollados en la Universidad de Leeds, razón

de su denominación como LM: Leeds Monoclonal) que tienen especial interés en este tipo de estudios, ya que reconocen pectinas con distinto grado de esterificación, haciendo posible el revelar los patrones de esterificación de pectinas de la pared celular durante el desarrollo. Los anticuerpos JIM5 y LM19 se unen específicamente a zonas con residuos de GalA contiguos no esterificados, marcando por tanto epítopos de pectina prácticamente desesterificados. Por el contrario, los anticuerpos JIM7 y LM20 se unen a residuos metilesterificados de GalA, mostrando la presencia de epítopos de pectina altamente esterificados (Christiaens *et al*., 2011; Solís *et al*., 2016).

Existe un compuesto denominado catequina PP60, formado por una mezcla de los principales componentes polifenólicos del flavonoide catequina extraídos del té verde (Souto *et al*., 2020), descrito como inhibidor de la actividad PME *in vitro* en un amplio rango de especies vegetales (Lewis *et al*., 2008). Además, al tratarse de moléculas con una alta estabilidad y una larga vida útil, es capaz de inducir su efecto aplicarse de manera exógena en tejidos. La catequina PP60 ha sido muy utilizada en la industria alimentaria y en la agricultura, principalmente para estudios sobre las propiedades gelificantes de las pectinas en frutos y alimentos derivados como jugos y mermeladas (Lewis *et al*., 2008).

Con la finalidad de conocer los cambios en la dinámica de la pared celular controlada por la esterificación de pectinas, mediados por enzimas pectinmetilesterasas (PME) e inhibidores de pectinmetilesterasas (PMEI) durante el proceso de embriogénesis, en esta tesis se han analizado los cambios en la esterificación de las pectinas durante la embriogénesis somática de *Quercus suber* y las etapas más avanzadas de la embriogénesis de microsporas de *Brassica napus* y *Hordeum vulgare*.

1.6.2 Proteínas de arabinogalactano (AGPs)

Las proteínas de arabinogalactano (AGPs, *arabinogalactan proteins*) son una extensa y compleja familia de proteínas altamente glicosiladas y ricas en hidroxiprolina (HRGP, *hidroxyproline-rich glycoproteins*) que están presentes en las células vegetales formando parte de la pared celular, en la superficie de la membrana plasmática y en secreciones celulares.

Estas glicoproteínas presentan una estructura compuesta por una parte proteica que supone entre el 1-10% de su peso molecular y una parte glucídica que forma el 90-98% restante de su peso molecular y le confiere a la molécula una gran resistencia frente a procesos proteolíticos (Rumyantseva, 2005).

La gran heterogeneidad de este grupo de proteínas reside tanto en la longitud de su cadena proteica como en el tipo de polisacárido arabinogalactano que componga la parte glucídica de la molécula. En función del tipo de aminoácidos que compongan la parte proteica, las AGPs se clasifican en: 1) AGPs clásicas, las cuales contienen como aminoácidos mayoritarios hidroxiprolina/prolina, alanina, serina, treonina y glicina; 2) péptidos AG, con una cadena proteica compuesta por un menor número de aminoácidos que las AGPs clásicas (de 10-15 aminoácidos); 3) AGPs ricas en lisina; y 4) AGPs quiméricas, las cuales presentan otros dominios proteicos además del dominio AGP (Seifert y Roberts, 2007; Yang *et al*., 2007; Showalter y Basu, 2016).

La cadena proteica de las AGPs clásicas consiste en tres partes principales: a) un péptido señal en el dominio N-terminal; b) un dominio central de longitud variable rico en residuos de hidroxiprolina/prolina, alanina, serina y treonina (denominada PAST); y c) una zona correspondiente a la señal de anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI, *glycosylphosphatidylinositol*) en el C-terminal (Schultz *et al*., 2000) (Fig. 26).

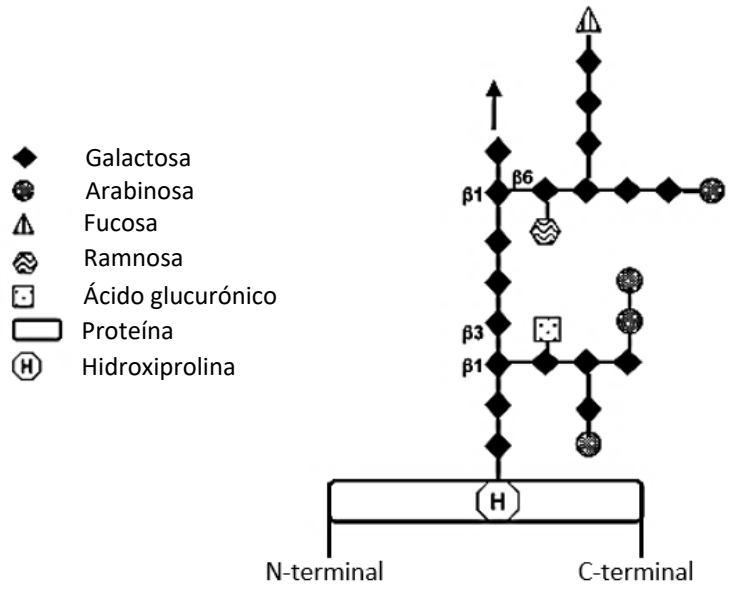


Figura 26. Representación esquemática de la estructura de las AGPs clásicas. Fuente: modificado a partir de Gaspar *et al*., 2001).

El grupo GPI, presente en las AGPs clásicas, es un oligosacárido formado por acetilglucosamina y residuos de manosa (en ocasiones pudiendo ser sustituidos por residuos de β-galactosa), que se une al extremo C-terminal de la proteína. Este anclaje GPI constituye un domino transmembrana hidrofóbico que mantiene unida la AGP a la cara externa de la membrana plasmática, habiendo ciertas regiones de estas macromoléculas localizadas en la pared celular (Rumyantseva, 2005; Seifert y Roberts, 2007; Ellis *et al*., 2010). Por el contrario, el resto de AGPs, clasificadas como no clásicas, al carecer de este grupo GPI se encuentran probablemente como moléculas solubles en la superficie de la pared celular o en el espacio periplasmático (Gaspar *et al*., 2001).

La parte glucídica de la molécula suele estar siempre formada por cadenas de arabinogalactano (AG) tipo II, compuestas principalmente por galactano y arabinosa. La estructura de estas AG consiste en un esqueleto de β-(1,3) D-galactopiranosa con ramificaciones de β-(1,6)-D-galactopiranosa a las que pueden unirse adicionalmente azúcares como arabinosa y menos frecuentemente galactosa, ramnosa, fucosa o ácido glucurónico. Estas cadenas AG tipo II aparecen unidas por un enlace O-glicosídico a los residuos de hidroxiprolina (Hyp) de la parte proteica (Ellis *et al*., 2010) de las AGPs.

La biosíntesis de las AGPs es un proceso coordinado donde una vez que se sintetiza la parte proteica, se lleva a cabo una modificación postraduccional en la que los residuos de prolina se convierten en hidroxiprolina por hidroxilación enzimática y luego la hidroxiprolina es O-glicosilada con arabinogalactanos (AG). La enzima que cataliza la modificación a hidroxiprolina es la peptidil-prolina hidroxilasa, que se encuentra en el retículo endoplasmático (Majewska-sawka y Nothnagel, 2000; Gaspar *et al*., 2001; Showalter, 2001), mientras que la glicosilación de los residuos de hidroxiprolina tiene lugar en el aparato de Golgi. Las AGPs sintetizadas son secretadas hacia la superficie celular a través de vesículas, para ser depositadas en el periplasma, en la pared celular o liberadas al apoplasto (Lamport *et al*., 2006). En el caso de las AGPs clásicas, se propone que la eliminación del dominio C-terminal hidrofóbico ocurre en coordinación con la adición del GPI en un aminoácido específico. Esto implica que la liberación de la AGP con GPI de la membrana a la pared celular, o al espacio extracelular, requiere de la actividad de al menos una fosfolipasa (Rumyantseva, 2005).

Las AGPs desempeñan un papel clave en distintos procesos del desarrollo de la planta como la proliferación celular, el desarrollo de patrones morfológicos o la interacción con microorganismos (Seifert y Roberts, 2007). Entre sus múltiples implicaciones en el desarrollo, también se ha descrito su papel en distintos aspectos de la reproducción sexual y la embriogénesis (Chapman *et al*., 2000; Zhong *et al*., 2011; Losada y Herrero, 2012; Losada y Herrero, 2014; Losada *et al*., 2014; Pereira *et al*., 2014; Pereira *et al*., 2016; Costa *et al*., 2015; Lopes *et al*., 2016). Se ha comprobado que la adicción de AGPs exógenas en el medio de cultivo promueve embriogénesis somática en distintas especies vegetales, incluyendo entre ellas especies arbóreas (Thompson y Knox, 1998; Yuan *et al*., 2012; Smertenko y Bozhkov, 2014). Además, la presencia de AGPs secretadas por las células en el medio de cultivo se ha descrito como un factor estimulante en el desarrollo de embriones en cultivos *in vitro* de microsporas y zigotos de maíz (Borderies *et al*., 2004; Testillano *et al*., 2010), así como en cultivos embriogénicos en suspensión de zanahoria (van Hengel *et al*., 2001). Sin embargo, a pesar de su alto grado de implicación en estos procesos, el papel preciso de las AGPs endógenas en la regulación de la embriogénesis somática sigue siendo desconocido.

Las técnicas experimentales más utilizadas en estudios de AGPs son el uso de anticuerpos monoclonales que reaccionan con epítopos de la parte glucídica de su estructura (como por ejemplo el anticuerpo LM6 (Willats *et al*., 1998) y la utilización del reactivo β-Yariv (1,3,5-tri-(pglycosyloxyphenylazo)-2,4,5-trihydroxybenzene) (Seifert y Roberts, 2007). El reactivo de Yariv es un compuesto de tonalidad rojo-teja que se utiliza comúnmente como herramienta en la investigación con AGPs, ya que es capaz de unirse de forma no covalente a las moléculas de AGPs y precipitarlas. Se ha comprobado en distintas especies que al añadir este reactivo al medio de cultivo, éste se une a las AGPs formando agregados y, en consecuencia, la acción de estas moléculas queda bloqueada afectando negativamente a la embriogénesis y demostrando su implicación en el proceso (Gao y Showalter, 1999; Tang *et al*., 2006; Sardar y Showalter, 2007).

En esta tesis se han analizado los cambios que tienen lugar en las AGP de la pared celular durante la embriogénesis somática de *Quercus suber* empleando distintas metodologías, entre las que desatacan los análisis funcionales con el reactivo de Yariv o

el uso de anticuerpos monoclonales. también se ha analizado el patrón de expresión génica de AGPs durante la embriogénesis de microsporas de *Hordeum vulgare*.

1.7 MUERTE CELULAR, AUTOFAGIA Y PROTEASAS

1.7.1 Muerte celular

La muerte celular se describe como el cese de las funciones vitales de una célula producido por cambios morfológicos, funcionales y químicos irreversibles. La muerte de las células puede desencadenarse por diversas causas como pueden ser la pérdida de funcionalidad, el daño mecánico, la infección por agentes patógenos, la toxicidad de agentes químicos o la falta de nutrientes.

Estos procesos de muerte celular pueden tener lugar de forma regulada, recibiendo el nombre de muerte celular programada (MCP), o pueden ocasionarse sin un mecanismo de regulación concreto.

La MCP es un proceso activado y regulado por la propia célula, muy bien organizado tanto a nivel genético como bioquímico, que resulta esencial para el crecimiento y supervivencia de la planta. Este hecho implica que las células posean los mecanismos moleculares necesarios para llevar a cabo su propia destrucción. La habilidad de células específicas para activar procesos de MCP surgió muy temprano a escala evolutiva, habiendo varios genes y moléculas implicadas comunes a filos muy distantes de organismos, pertenecientes incluso a distintos reinos (Ameisen, 2004).

La primera observación de la existencia de MCP la realizó Vogt en 1842 al estudiar la morfogénesis de los anfibios, donde en el paso de renacuajo a rana las células del renacuajo son inducidas a sufrir muerte celular programada y como consecuencia se pierde la cola. Aunque la MCP se asoció en un primer momento con organismos multicelulares eucariotas, también ocurre en organismos unicelulares eucariotas y bacterias, donde la muerte del organismo unicelular es parte de la multifuncionalidad de la colonia.

En las plantas, la muerte celular programada se ha relacionado con múltiples procesos del desarrollo. Algunos ejemplos son la degeneración de las células del suspensor durante el desarrollo embrionario, la muerte de las células del escutelo y el

endospermo en el proceso de germinación, la abscisión de órganos florales, la muerte de células que constituyen traqueidas, fibras y esclereidas para la formación del xilema, la formación del parénquima y tricomas de raíces, la degeneración del tapetum de las anteras durante el desarrollo del polen y la remodelación y senescencia foliar, entre otros (van Hautegem *et al*., 2015). Además, la MCP puede también desencadenarse como consecuencia de determinados estreses tanto abióticos como bióticos (Huysmans *et al*., 2017).

La progresión de la MCP en plantas pasa por tres fases principales: I) la diferenciación o envejecimiento de determinadas células hace que éstas se vuelvan competentes para someterse a MCP y vayan acumulando moléculas ejecutoras de PCD en su forma inactiva o secuestradas de forma segura en su forma activa; II) seguidamente se inician señales específicas que ejecutan el inicio de MCP irreversible; y III) finalmente se procede a la eliminación parcial o completa de los restos celulares muertos (Daneva *et al*., 2016).

Mientras que en animales se tienen amplios conocimientos sobre la maquinaria y modo de acción de la MCP, la función fisiológica y los mecanismos implicados en la MCP de las plantas aún es limitado. No obstante, es un tema que en las últimas décadas ha sido objeto de numerosos trabajos (Greenberg, 1996; Pennell y Lamb, 1997; Reape *et al*., 2008; Fomicheva *et al*., 2012; van Hautegem *et al*., 2015; Buono *et al*., 2019) y del que cada vez se tiene más información.

En comparación con los animales, las plantas poseen componentes celulares únicos como la pared celular, los cloroplastos y una gran vacuola central, los cuales otorgan a la célula mecanismos alternativos para llevar a cabo la muerte celular programada (van Durme y Nowack, 2016). No obstante, tanto plantas como animales también comparten ciertas características bioquímicas y morfológicas que hacen que la MCP de ambas presente episodios similares como la contracción del citoplasma, la condensación y agregación de la cromatina, la fragmentación del DNA del núcleo y la alteración de la morfología de la célula (Wang *et al*., 1996).

Múltiples estudios han demostrado la implicación de especies reactivas del oxígeno (ROS), de la autofagia y de cisteín proteasas específicas (como cisteín proteasas de tipo papaína y metacaspasas) durante numerosos procesos de muerte celular

programada en plantas (Pak y van Doorn, 2005; Bozhkov y Jansson, 2007; Minina *et al*., 2013; Minina *et al*., 2014; Yang y Bassham, 2015, Bárány *et al*., 2018; Berenguer *et al*., 2020), asociándose con eventos de muerte celular de tipo vacuolar (van Doorn *et al*., 2011). Por ello, en esta tesis se ha abordado el estudio de la MCP y el posible papel de las ROS, de la autofagia y de cisteín proteasas de tipo papaína (PLCPs, *papain like cysteine proteases*) durante la inducción de la embriogénesis de microsporas de cebada, así como durante el proceso de MCP que experimentan las células del tapetum durante el desarrollo *in vivo* del polen en la misma especie.

1.7.2 Autofagia

A diferencia de los animales, las plantas no pueden huir de ambientes adversos, quedando en múltiples ocasiones sujetas a sobrevivir bajo condiciones de estrés. Para combatir estas situaciones se ayudan de un sofisticado mecanismo de *self-eating* o autofagia, similar al que presentan otros organismos eucariotas como animales o levaduras. La autofagia es un mecanismo de catabolismo intracelular altamente conservado mediante el cual las células eucariotas transportan ciertos componentes celulares hacia vacuolas líticas, donde son degradados y reciclados (Marshall y Vierstra, 2018). El fenómeno de la autofagia fue descrito por primera vez por Christian de Duve a mediados del siglo XX, mediante la utilización de técnicas de microscopía electrónica (Klionsky, 2008). Más adelante, el grupo de Yoshinori Ohsumi (Matsuura *et al*., 1997) identificó en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* el primer gen relacionado con la autofagia, al que bautizó como Autophagy 1 (APG1, que más tarde pasó a denominarse ATG1). Posteriormente, el grupo de Yoshinori identificó otros 14 genes ATG (*Autophagy-related genes*) y logró caracterizar el modelo del sistema autofágico (Ohsumi, 2014). Debido a sus destacadas contribuciones, Yoshinori Ohsumi fue galardonado con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 2016.

La autofagia está asociada al estado metabólico de las células y participa en múltiples procesos biológicos como la resistencia a estrés, el reciclaje de nutrientes, la defensa y la senescencia (Avin-Wittenberg *et al*., 2018). A diferencia de otros sistemas de degradación, la autofagia se caracteriza por su capacidad para degradar prácticamente cualquier sustrato o agregado celular, incluyendo tanto biomoléculas

innecesarias como orgánulos disfuncionales, e incluso microorganismos invasores tal y como describen algunos de los trabajos más recientes (Hafrén *et al*., 2017).

Se ha visto que en condiciones normales existe un nivel basal de autofagia en las células para mantener la homeostasis. Sin embargo, la intensidad en los niveles de autofagia se ven aumentados bajo condiciones de estrés. Mientras que en la autofagia en animales los orgánulos encargados de degradar el material son los lisosomas, en plantas este proceso se lleva a cabo en vacuolas, denominadas más específicamente vacuolas líticas (Mizushima, 2007). Existen dos tipos principales de autofagia: microautofagia y macroautofagia.

La microautofagia es llevada a cabo por la propia vacuola, en la que se forma una pequeña vesícula intravacuolar originada por la invaginación del tonoplasto, a la que se denomina cuerpo autofágico, la cual se encarga de envolver los componentes citoplásmicos acumulados en la superficie de la vacuola. La macroautofagia, denominada comúnmente como autofagia, implica la formación de estructuras especializadas de doble membrana en el citoplasma celular, llamadas autofagosomas, que engloban los componentes destinados a degradación. En ambos tipos, el proceso finaliza con la liberación en la vacuola de los componentes a degradar, para su posterior hidrólisis y, en la mayoría de los casos, la consiguiente liberación al citoplasma de nuevos componentes originados tras la hidrólisis, como material reciclado para su aprovechamiento (Bassham *et al*., 2006).

En el mecanismo de la autofagia se distinguen distintas fases: la inducción, la fusión y la degradación (Fig. 27).

La fase de inducción consiste en la formación del autofagosoma rodeando al material seleccionado para la degradación, también denominado cargo. En la siguiente fase, la membrana externa del autofagosoma se fusiona con el tonoplasto y el cargo entra en la vacuola, rodeado únicamente por la membrana interna del autofagosoma (a esta estructura se la denomina cuerpo autofágico). Finalmente, el cuerpo autofágico es degradado por diversas enzimas vacuolares y, en ocasiones, se procede al posterior almacenamiento y/o reciclaje de materiales obtenidos de la degradación liberados al citoplasma de la célula (Liu y Bassham, 2012).

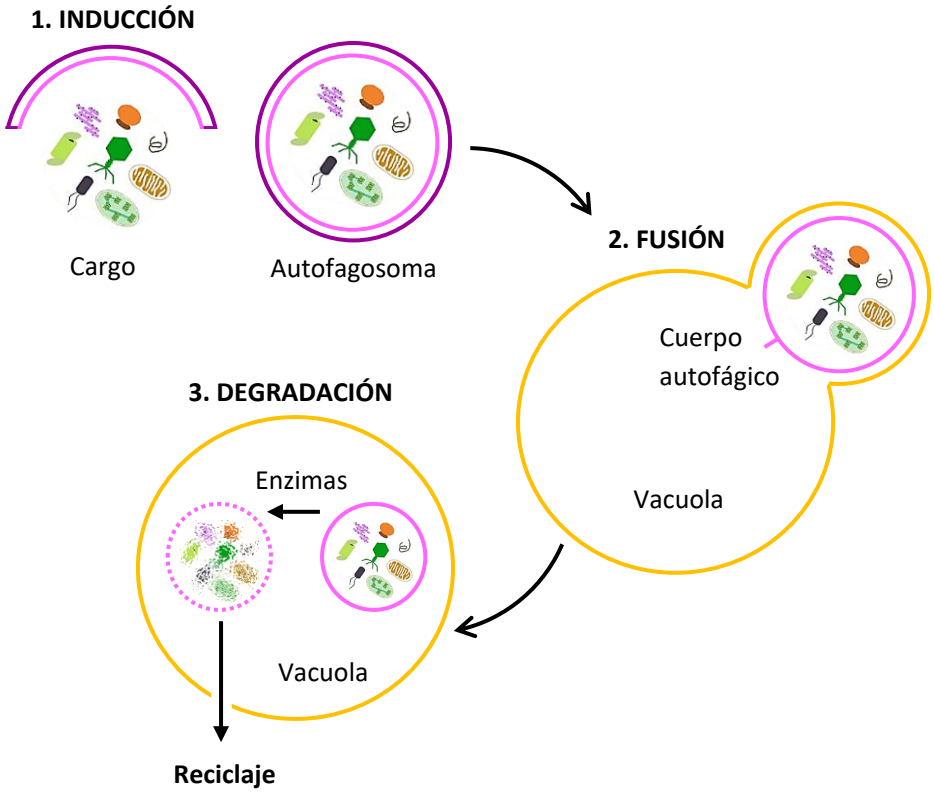


Figura 27. Proceso autofágico en plantas.

Estudios realizados en la levadura *S. cerevisiae* han permitido identificar más de 30 genes relacionados con la autofagia (Atg, *autophagy-related genes*). Estos genes fueron descubiertos utilizando levaduras mutantes deficientes de autofagia, cuyas células mostraban baja o nula acumulación de autofagosomas durante condiciones de estrés por ayuno (Tsukada y Ohsumi, 1993). La mayoría de estos genes se ha conservado evolutivamente, y se han identificado genes homólogos a los de la levadura en diversos organismos eucariotas, incluyendo animales y plantas (Reumann *et al.*, 2010). El mecanismo por el cual se lleva a cabo la autofagia en plantas ha sido objeto de estudio en numerosos trabajos de las últimas décadas, pero a pesar de ello aún hay muchos aspectos desconocidos en comparación con el mayor conocimiento que se tiene del proceso en animales y levaduras.

Se ha visto que el genoma de las plantas contiene la mayoría de los genes de autofagia descritos en levaduras (Bassham, 2015). Este hecho, junto con la actual disponibilidad de mutantes, fundamentalmente en *Arabidopsis thaliana*, ha permitido avanzar en la caracterización del papel de la autofagia en plantas.

En la maquinaria autofágica de las plantas destaca el papel de dos proteínas de ATG: ATG8 y ATG5, consideradas marcadores autofágicos clave para el estudio del proceso (Liu y Bassham, 2012). ATG8 se ha propuesto como una proteína de vital relevancia durante la autofagia, participando en el proceso con múltiples funciones como la elongación de la membrana, el reconocimiento del cargo, el cierre del autofagosoma, el movimiento autofagosómico, la unión del mismo a la membrana de vacuolas líticas y la degradación de la membrana interna del autofagosoma (Klionsky y Schulman, 2014). ATG8 permanece en la membrana del autofagosoma durante todo el proceso, lo que le convierte en un marcador autofágico clave para la localización de autofagosomas a nivel celular (Lamb *et al*., 2013). Mientras que en *S. cerevisiae* solo hay un gen Atg8, en *A. thaliana* se han descrito 9 isoformas (ATG8a-ATG8i) para este gen (Liu y Bassham, 2012). La proteína ATG5 se encuentra conjugada ATG12, jugando un papel esencial en la lipidación de ATG8 y consecuente formación del autofagosoma (Yang y Klionsky, 2009). Al contrario que ATG8, la proteína ATG5 presenta una única isoforma en plantas.

Dentro de la regulación de la autofagia en plantas, destaca el papel esencial del complejo quinasa TOR (*Target Of Rapamycin*), que actúa como regulador negativo de la autofagia. TOR inhibe la autofagia mediante la fosforilación de aminoácidos de treonina y serina de proteínas diana. La actividad de TOR puede verse inhibida bajo condiciones de distintos estreses tanto abióticos como bióticos, en respuesta al déficit de nutrientes o en determinados momentos del desarrollo de la planta, induciéndose la formación del autofagosoma y dando lugar al inicio del proceso de autofagia (Liu y Bassham, 2012).

Múltiples estudios indican la conexión entre la autofagia y las especies reactivas del oxígeno (ROS) en plantas y algas (Pérez-Pérez *et al*., 2012). Además, se ha demostrado que la autofagia juega un importante papel en la eliminación de proteínas y orgánulos que se han podido dañar como consecuencia de la acumulación de ROS (Bárány *et al*., 2018)

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son moléculas que se generan durante el metabolismo aeróbico celular y pueden ser perjudiciales para la planta debido a su capacidad para oxidar otras moléculas como proteínas, DNA y lípidos. Entre estas moléculas causantes de lo que se conoce como estrés oxidativo se encuentran los

radicales libres, como los radicales superóxido (O_2^-) e hidroxilo (^-OH), y otras moléculas como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los peróxidos orgánicos (ROOH). En plantas, la producción de ROS en los distintos compartimentos de la célula y su interacción con otras moléculas aún está poco caracterizada (De Pinto *et al*., 2012). Sin embargo, se ha descrito la participación de ROS en distintos procesos de MCP que tienen lugar a lo largo del desarrollo de la planta o que son inducidos a causa de distintos tipos de estrés biótico o abiótico (Locato *et al*., 2016). El H_2O_2 está implicada por ejemplo en la formación del aerénquima de *A. thaliana* inducida por condiciones de hipoxia (Mühlenbock *et al*., 2007). También se ha visto que, durante la embriogénesis de microsporas de cebada, tras aplicar el estrés inductor por frío, existen altos niveles H_2O_2 (Rodríguez-Serrano *et al*., 2012). Sin embargo, a pesar del esfuerzo por esclarecer la forma en que ROS induce la muerte celular en las plantas, aún se trata de un tema en gran medida desconocido.

1.7.3 Cisteín proteasas implicadas en la muerte celular

Los eventos de muerte celular programada se llevan a cabo mediante una compleja ruta molecular mediada por proteasas específicas que juegan un papel fundamental a lo largo de todo el proceso. Estas proteasas pueden participar activamente en la degradación del material celular que tiene lugar en las últimas etapas de la MCP o estar implicadas en el inicio del proceso alterando la morfología, propiedades bioquímicas y fisiología de la célula. Las distintas proteasas se clasifican, según la base de datos de proteasas MEROPS, en seis grupos distintos en función de su dominio catalítico: serín proteasas, cisteín proteasas, treonín proteasas, aspártico proteasas, glutámico proteasas y metalo proteasas. Además, dentro de cada grupo se clasifican en clanes atendiendo a su estructura terciaria y en familias en función de su secuencia de aminoácidos (van der Hoorn, 2008).

En animales, la mayoría de los cambios morfológicos y bioquímicos ligados a episodios de muerte celular programada, están relacionados con la actividad de proteasas de tipo caspasa. Las caspasas son proteasas dependientes de cisteína pertenecientes a la subfamilia C14A del clan CD. Estas proteasas presentan un residuo de cisteína para su actividad proteolítica y son específicas del ácido aspártico (Asp),

actuando en la rotura de enlaces peptídicos de proteínas después de un residuo de Asp en la posición P1 (Cai *et al*., 2018).

A pesar de que no existen genes homólogos a las caspasas en organismos vegetales, en las últimas décadas se han detectado actividades similares a las de estas proteínas en plantas (Rocha *et al*., 2017).

El diseño de experimentos utilizando sustratos sintéticos e inhibidores específicos de caspasas han demostrado como los sustratos de estas proteasas experimentan cortes enzimáticos durante la MCP y como los inhibidores son capaces de bloquear la MCP en plantas (Bonneau *et al*., 2008; Rodríguez-Serrano *et al*., 2012; Hatsugai *et al*., 2015; Sueldo y van der Hoorn, 2017; Berenguer *et al*., 2020), apoyando así la hipótesis de que las plantas poseen proteasas con una actividad enzimática similar a las caspasas de organismos animales. Un ejemplo de ello es la actividad caspasa 3-*like*, detectada en numerosos procesos de MCP en plantas e inhibida con el inhibidor específico de caspasa 3 Ac-DEVD-CHO (N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-al) (Poręba *et al*., 2013)

Dentro de las proteasas de plantas asociadas a la actividad caspasa se encuentran las enzimas de procesamiento vacuolar (VPE, *vacuolar processing enzime*), el proteasoma, las saspasas y las fitaspasas. En las últimas décadas, se identificó otra familia de proteasas, las metacaspasas, clasificadas dentro del grupo de las cisteín proteasas como proteínas de la subfamilia C14B y del clan CD. Estas proteasas presentan una estructura terciaria similar a las caspasas, pero difieren de ellas en su especificidad por el sustrato y su mecanismo de activación (McLuskey y Mottram, 2015).

En plantas, las proteasas más abundantes con actividad proteolítica son las cisteín proteasas de tipo papaína (PLCPs, *Papain-like Cysteine Proteases*). Estas cisteín proteasas pertenecen a la subfamilia C1A del clan CA y son homólogas a las catepsinas de animales. En animales, las catepsinas están caracterizadas como proteínas lisosomales con un importante papel en autofagia y muerte celular (Turk y Stoka, 2007), donde participan de manera decisiva en la degradación de proteínas dentro de los autolisosomas tras la fusión de autofagosomas con la membrana lisosomal (Jung *et al*., 2015; Man y Kanneganti, 2016). Aunque en plantas aún no se ha demostrado si las PLCPs juegan un papel en la autofagia, si se han relacionado con procesos del desarrollo como la germinación de semillas (Grudkowska y Zagdańska, 2004), senescencia (Bhalerao *et*

al., 2003;Roberts *et al*., 2012; Díaz-Mendoza *et al*., 2014), muerte celular programada (Zhao *et al*., 2000; Cai *et al*., 2018) y eventos de proteólisis mediados por estrés abiótico (Rabbani *et al*., 2003; Velasco-Arroyo *et al*., 2016; Bárány *et al*., 2018) o biótico (Shindo *et al*., 2012); Misas-Villamil *et al*., 2016), entre otros.

El genoma de las plantas codifica para más de 800 proteasas, de entre las cuales más de 140 pertenecen al grupo de las cisteín proteasas, que a su vez están agrupadas dentro de 15 familias, en 5 clanes (Díaz-Mendoza *et al*., 2014) (Fig. 28). La subfamilia de las PLCPs ha sido clasificada en función de sus propiedades estructurales en 9 clases, que a su vez se agrupan en 4 tipos diferentes: tipo L, F, H o B, en base a su homología con catepsinas de humanos (Richau *et al*., 2012).

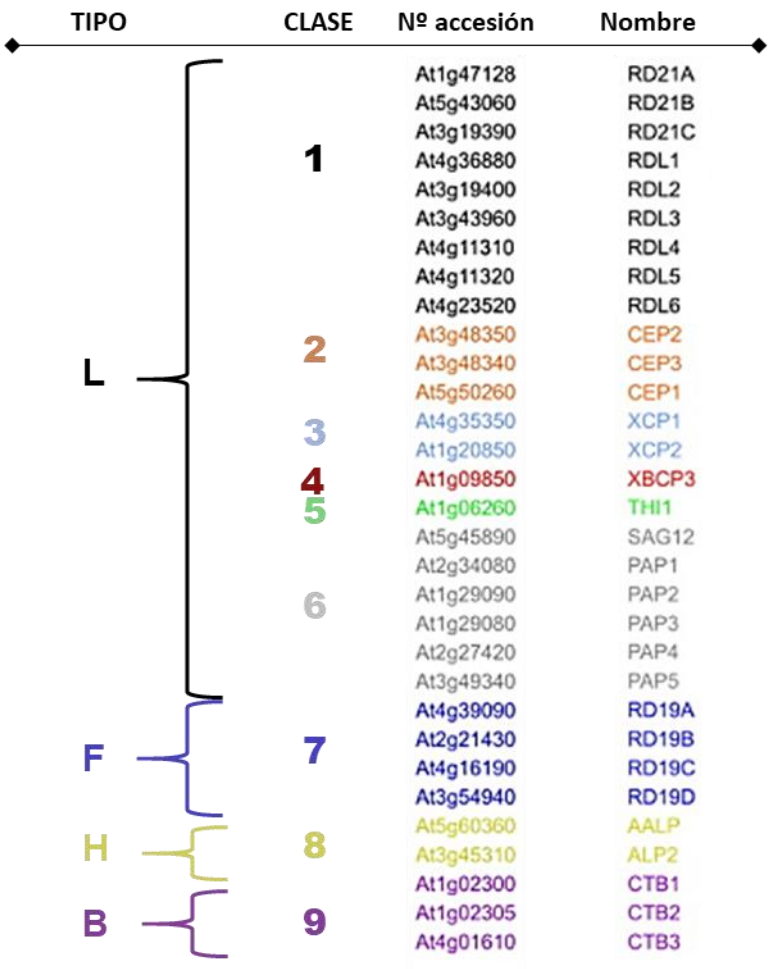


Figura 28. Clasificación de PLCPs en *Arabidopsis thaliana*. Fuente: modificado a partir de Richau *et al*., 2012.

Las PLCPs están relacionadas estructuralmente con la papaína, una proteasa con un papel clave de protección en la papaya frente a insectos herbívoros (Liu *et al*., 2018). La papaína fue la primera cisteín proteasa aislada y caracterizada de *Carica papaya* y también fue la primera cisteín proteasa cuya estructura se determinó utilizando técnicas de cristalografía de rayos X (Drenth *et al*., 1968). En su estructura, el dominio activo de la proteasa contiene la triada catalítica Cys-His-Asn. Al igual que otras enzimas proteolíticas, las PLCPs se sintetizan como precursores inactivos, los cuales presentan en este caso un peso molecular entre 40-50 kDa. Los precursores inactivos o zimógenos presentan en su estructura un predominio autoinhibidor para evitar la degradación no deseada de proteínas. Este predominio tiene la capacidad de bloquear el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima, además de participar en el plegamiento de la proteína y su localización subcelular. Tras un proceso proteolítico, el zimógeno se desprende del predominio y adquiere su forma activa madura, que en el caso de las PLCPs presenta un peso molecular de 22-35 kDa (Taylor *et al*., 1995; Grudkowska y Zagdańska, 2004; Liu *et al*., 2018) (Fig. 29). La actividad de las PLCPs también depende del pH y del equilibrio entre sus inhibidores y activadores endógenos (van der Hoorn *et al*., 2004).

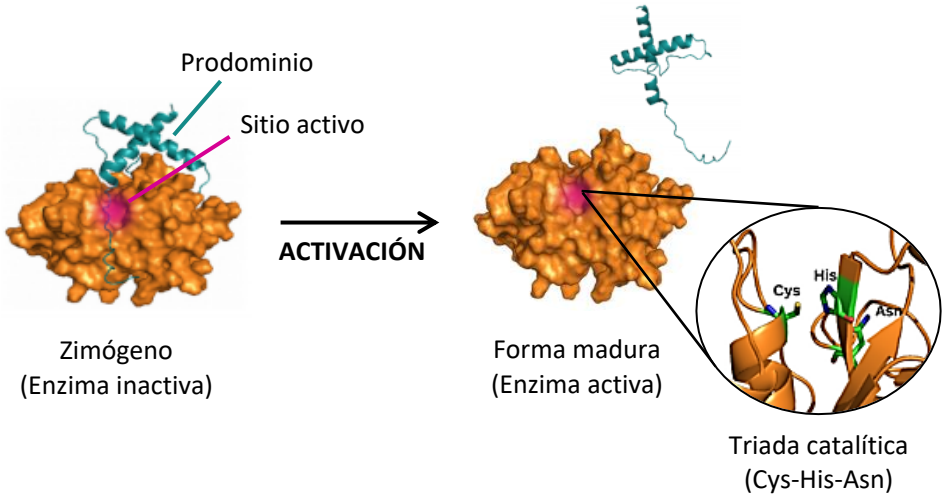


Figura 29. Modelo ilustrativo de la estructura de las PLCP antes y después de su activación proteolítica. Fuente: modificado de Verna *et al*., 2016.

En *Carica papaya* se han identificado 33 genes codificantes para PLCPs (Liu *et al*., 2018), una cifra muy similar a los 32 genes identificados en el genoma de *Arabidopsis thaliana* e inferior a los 45 genes descritos en *Oriza sativa* (Martinez y Diaz, 2008) o a los 41 identificados en *Hordeum vulgare* (Díaz-Mendoza *et al*., 2014).

Dentro de las 41 catepsinas descritas en cebada: 30 (HvPap4-11, HvPap13-18, HvPap21-23, HvPap25-29, HvPap33-38, HvPap40-41) de ellas son catepsinas de tipo L, 3 (HvPap1-3) pertenecen al tipo F, 1 (HvPap12) al tipo H, 3 (HvPap19-20 y HvPap30) al tipo B y otras 4 (HvPap24, HvPap31-32 y HvPap39) están aún sin clasificar (Díaz-Mendoza *et al*., 2014). De entre todas ellas, las que han mostrado una mayor actividad proteolítica en distintos estudios llevados a cabo en cebada (Díaz-Mendoza *et al*., 2014; Velasco-Arroyo *et al*., 2016; Havé *et al*., 2018) han sido HvPap1, HvPap6, HvPap12 y HvPap19.

Estudios recientes han demostrado la eficacia de inhibidores específicos de proteasas, como el E-64d, la leupeptina o Ac-DEVD-CHO, los cuales actúan alterando la actividad de estas enzimas y disminuyen el proceso de MCP (Swe y Sit, 2000; Moriyasu y Inoue, 2009; Rodríguez-Serrano *et al*., 2012; Ge *et al*., 2016; Sinha *et al*., 2016; Bárány *et al*., 2018; Pérez-Pérez *et al*., 2019), permitiendo un avance cada vez mayor en el conocimiento sobre la implicación de la actividad de proteasas específicas en eventos de MCP durante múltiples procesos del desarrollo de la planta.

OBJETIVOS

El proceso de embriogénesis somática *in vitro* es un ejemplo fascinante de totipotencia celular y una potente herramienta biotecnológica que permite la regeneración de plantas completas a partir de la reprogramación de distintas células somáticas, sin embargo, aún se desconocen muchos de los mecanismos que regulan este proceso, lo cual resulta clave para poder mejorar su eficiencia en especies de interés agronómico y forestal.

Por ello, el **objetivo principal** de esta tesis es analizar nuevos elementos reguladores con la finalidad de conocer su papel en el inicio y la progresión de la embriogénesis somática, centrando el estudio en las hormonas auxina y citoquinina, la remodelación de la pared celular, la autofagia y las proteasas de la familia PLCP, empleando como sistemas de estudio la embriogénesis de microsporas inducida por estrés en dos especies cultivadas, la hortícola *Brassica napus* (colza) y el cereal *Hordeum vulgare* (cebada), así como la embriogénesis somática de la especie forestal *Quercus suber* (alcornoque), con el propósito de identificar nuevas dianas moleculares y estrategias biotecnológicas con las que intervenir en la mejora del rendimiento de estos procesos. Los **objetivos específicos** son:

1. Caracterización de la dinámica de la auxina endógena, expresión de genes de biosíntesis y transporte, y su papel en el inicio y la progresión de la embriogénesis de microsporas.

2. Análisis comparativo de los patrones de expresión y localización de auxina endógena durante el desarrollo gametofítico y tras la reprogramación a embriogénesis.

3. Caracterización de la dinámica de la citoquinina endógena, expresión de genes de biosíntesis, señalización y degradación, y su papel en el inicio y la progresión de la embriogénesis de microsporas.

4. Evaluación de la remodelación de la pared celular operada por la metilesterificación de pectinas y las proteínas de arabinogalactano (AGPs), y su papel durante la embriogénesis somática y de microsporas.

5. Análisis del efecto de inhibidores de autofagia y proteasas sobre la muerte celular inducida por estrés y la eficiencia de reprogramación embriogénica de microsporas.

6. Determinación de la activación de autofagia y proteasas e identificación de cisteín proteasas de tipo papaína (PLCPs) en la muerte celular programada del tapetum durante el desarrollo del polen.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

3.1.1 *Brassica napus* L. cv. Topas

Se utilizaron semillas de *Brassica napus* de la variedad Topas (DH4079), las cuales se sembraron en macetas de 18 cm de diámetro x 15 cm de altura con un sustrato de turba y vermiculita en proporción 2:1. Las macetas se mantuvieron en cámaras de crecimiento a una temperatura de 18^{o}C, un 80% de humedad relativa y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. En aproximadamente 15 días se observaron las primeras plántulas y transcurridos dos meses desde la siembra se desarrollaron las primeras inflorescencias. Esta primera floración fue desechada por la irregularidad del desarrollo de sus yemas, favoreciéndose así una sincronía en el desarrollo y promoviendo la formación de yemas axilares. En este momento, las plantas se trasladaron a cámaras Sanyo de crecimiento controlado (MLR-351-H), manteniendo el mismo fotoperiodo (16h luz/8h oscuridad), un 60% de humedad relativa y una temperatura de 15^{o}C durante las horas de luz y 10^{o}C durante las horas de oscuridad. Las plantas volvieron a florecer en estas cámaras, produciendo semanalmente una floración útil con la que trabajar. Las condiciones de riego de las plantas fueron de 3 veces/semana en cualquiera de las etapas de crecimiento. Estas plantas dejaron de ser útiles para cultivo *in vitro* transcurridos 2 meses desde la primera floración, siendo en este momento intercambiadas por una nueva generación de plantas jóvenes siguiendo el ciclo de crecimiento ya mencionado. Las plantas más antiguas fueron desechadas o devueltas a las primeras cámaras de crecimiento para destinarlas a la producción se semillas. En este último caso, se mantuvo el riego de las plantas durante aproximadamente un mes más, sin cortar en ningún momento de las inflorescencias para así favorecer la polinización y el desarrollo de frutos. Transcurrido este tiempo, se interrumpió el riego y se dejaron secar las silicuas en la planta durante un periodo de 2-4 semanas. Posteriormente se procedió a la apertura de los frutos y recogida de las semillas, las cuales mantuvieron su viabilidad durante más de un año almacenadas a temperatura ambiente en ambiente seco. (Fig. 30).

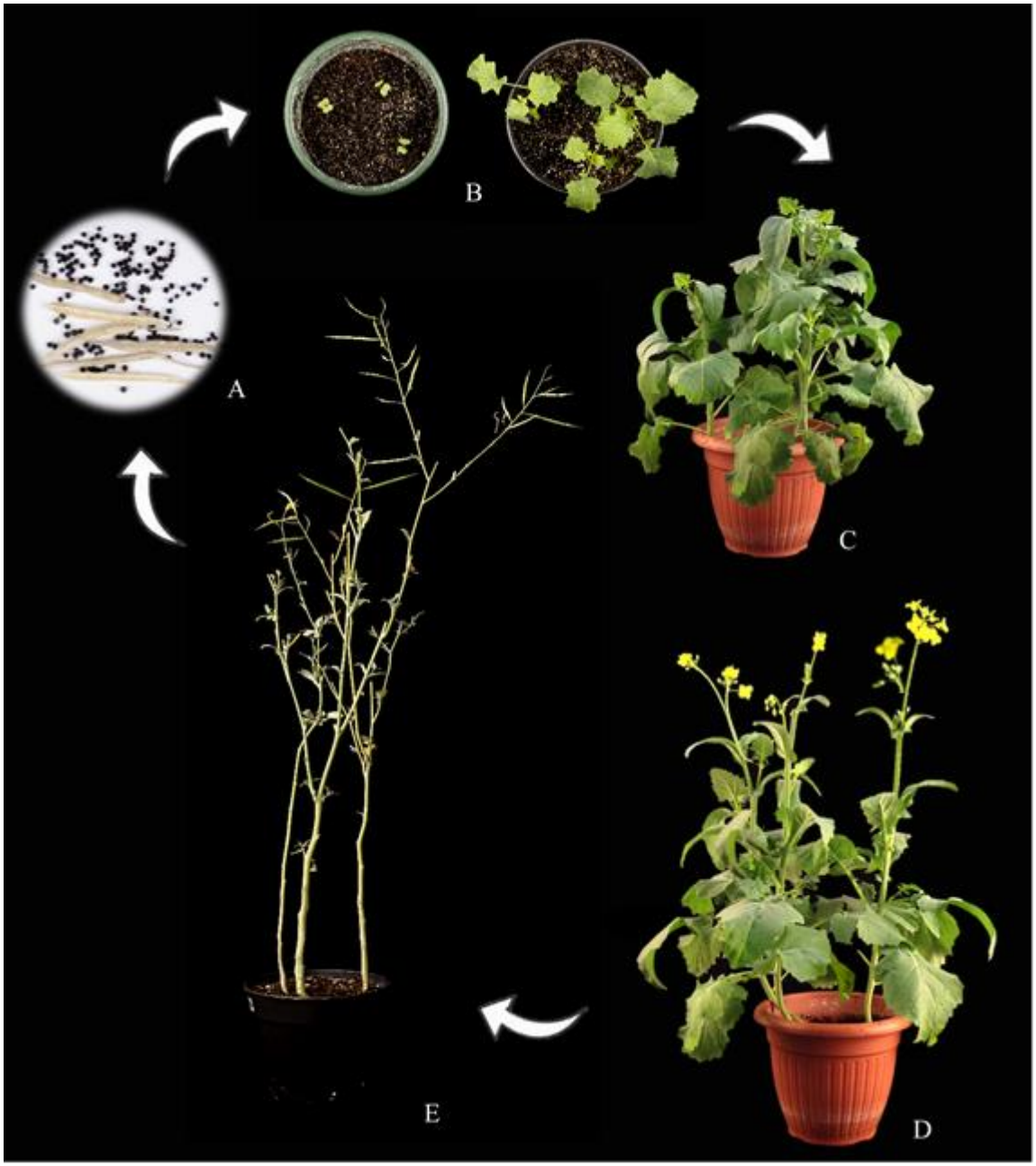


Figura 30. Ciclo de crecimiento de las plantas de *Brassica napus* L. cv. Topas. **(A)** Semillas y silicuas. **(B)** Plántulas germinadas. **(C)** Plantas adultas en la primera floración. **(D)** Plantas adultas a partir de la segunda floración. **(E)** Plantas destinadas a la producción de semillas.

3.1.2 *Hordeum vulgare* L. cv. Igri

Se utilizaron semillas de *H. vulgare* de la variedad Igri. Las semillas se sembraron en semilleros de germinación de 24 alveolos (6x4) de 4 cm de diámetro x 4 cm de altura a razón de una semilla por alveolo, utilizando un sustrato de turba, arena y vermiculita en proporción 2:1:1. Para una correcta germinación, desarrollo y floración, las semillas de cebada requieren pasar por un periodo de vernalización. La vernalización consistió

en mantener el semillero en una cámara fría a 4ºC y en condiciones de oscuridad durante 3-4 semanas, regándolo tan solo una vez con abundante agua en el momento de la siembra. Transcurrido este tiempo, el semillero se trasladó a una cámara de crecimiento con una temperatura de 18ºC, un 80% de humedad relativa y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, proporcionándole un riego moderado de 3 veces/semana. En aproximadamente 5 días se observaron las primeras plántulas. Tras un mes de crecimiento, se procedió a su trasplante en macetas de 18 cm de diámetro x 15 cm de altura con el mismo sustrato de turba, arena y vermiculita (2:1:1). Las macetas se trasladaron a una sala de invernadero para continuar su crecimiento a una temperatura controlada de 19ºC y un fotoperiodo de 12 horas de luz (10.000-16.000 lux) y 12 horas de oscuridad, donde se les proporcionó un riego abundante 3 veces/semana. Transcurridas de 8 a 10 semanas de crecimiento en el invernadero, empezaron a desarrollarse las primeras espigas. Desde este momento asistimos a una producción diaria de espigas, las cuales fueron recolectadas en distintas etapas del desarrollo en función de las necesidades experimentales. Estas plantas dejaron de ser útiles para cultivo *in vitro* transcurridos aproximadamente 2 meses desde la primera floración. A partir de este momento, las plantas se sustituyeron por una nueva generación de plantas jóvenes siguiendo el ciclo de crecimiento mencionado, y las plantas más antiguas fueron desechadas o destinadas a la producción se semillas. En este último caso, se mantuvo el riego de las plantas durante aproximadamente un mes más, sin cortar en ningún momento las inflorescencias con el fin favorecer la polinización y el desarrollo de frutos. Transcurrido este tiempo, se interrumpió el riego y se dejaron secar las espigas en la planta durante 4-6 semanas. Más tarde se procedió al desgranado de las espigas y recogida de las semillas. Las semillas se mantuvieron viables durante más de un año, almacenándose en frío a 4ºC. (Fig. 31).



Figura 31. Ciclo de crecimiento de las plantas de *Hordeum vulgare* L. cv. Igri. **(A)** Semillas. **(B)** Semillero a 4ºC. **(C)** Plántulas germinadas a 25ºC. **(D-F)** Plantas de crecimiento en el invernadero: **(D)** plántulas recién transplantadas, **(E)** plantas con producción de espigas y detalle de una espiga en estadio jóven, **(F)** plantas destinadas a la producción de semillas y detalle de una espiga en maduración.

3.1.3. Quercus suber L.

El material de partida para la embriogénesis somática de *Quercus suber* fueron embriones cigóticos inmaduros obtenidos de bellotas recogidas en campo.

La recogida del material se llevó a cabo entre los meses de septiembre-octubre, recolectándose bellotas inmaduras de árboles seleccionados en la localidad de El Pardo, Madrid. Se cortaron pequeñas ramitas que contenían las bellotas inmaduras, sin desprenderlas de la rama, manteniendo la base de las ramitas envueltas en papel húmedo, recubierto con papel de aluminio y condiciones de frío para evitar su deterioro. Una vez en el laboratorio, se almacenó a 4ºC y se procedió a extraer de las bellotas los embriones inmaduros para ponerlos en cultivo *in vitro* e inducir la embriogénesis somática. El material almacenado a 4ºC se pudo utilizar para el cultivo *in vitro* durante un máximo de 3-4 semanas.

3.2 CULTIVO *IN VITRO* DE MICROSPORAS AISLADAS DE *BRASSICA NAPUS* L.

3.2.1 Selección de yemas florales

Aproximadamente una semana después se procedió a cortar y descartar las inflorescencias de la primera floración de las plantas, se desarrolló la segunda floración, de la que se recogieron todas las yemas florales de las inflorescencias, asegurando en todo momento la humedad del material y su preservación en frío. En primer lugar, se llevó a cabo un análisis para establecer el tamaño de las yemas florales que contenían las microsporas en la fase óptima para la inducción de la embriogénesis: la fase de microspora vacuolada. Para ello se colocaron varias yemas florales de distinto tamaño en una placa Petri con papel húmedo y se mantuvo en hielo. Con ayuda de un calibre, se midieron rigurosamente aquellas yemas florales con un tamaño comprendido entre 1,4-4,5 mm (Fig. 32) (a intervalos de 0,05-0,2), tomando la medida desde el receptáculo hasta el ápice de la yema.

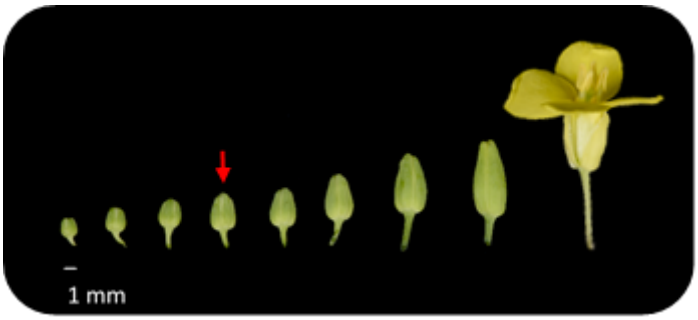


Figura 32. Yemas florales de *B. napus* en distintos estadios del desarrollo. La flecha roja señala la yema floral en estadio microspora vacuolada, seleccionado como material de partida para la embriogénesis de microsporas.

Una vez seleccionadas varias yemas con las distintas medidas del intervalo, se procedió al aplastado y tinción de sus anteras con una solución 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, *4',6-diamidino-2-phenylindole*), colorante fluorescente específico de DNA (Apartado 3.9.3). Esta tinción permitió visualizar el núcleo y deducir la fase de desarrollo de las distintas muestras, utilizando la luz ultravioleta (UV) de un microscopio óptico de fluorescencia Zeiss 68105. De esta manera se identificó la fase de desarrollo de las anteras de cada muestra, y se estableció una correlación entre el tamaño la yema floral y su estadio del desarrollo (Tabla 4).

Tabla 4. Correlación entre el tamaño de la yema floral y el estadio del desarrollo de la microspora y el polen de *B. napus*.

Tamaño de la yema (mm)	Estadio del desarrollo
1,2- 1,4	Tetrada
1,8-2,2	Microspora joven
3,25-3,35	Microspora vacuolada
3,8-4,0	Polen bicelular
> 4,2	Polen tricelular

Una vez establecido el criterio de selección de las yemas, para el cultivo de microsporas se seleccionaron únicamente las que presentaban un tamaño entre 3,25 y 3,35 mm.

3.2.2 Preparación del medio de cultivo NLN-13

Se utilizó el medio de cultivo NLN-13 (Lichter, 1982), un medio de cultivo líquido cuya composición se detalla en la tabla 5.

La preparación del medio se realizó a partir de preparados comerciales (Duchefa Biochemie), que consisten en una mezcla de sales basales (macro y micronutrientes), vitaminas y aminoácidos. Junto a estos componentes se añadieron las cantidades correspondientes de sacarosa (Merck) y del macronutriente nitrato de calcio ($Ca(NO_3)_2 \times 4H_2O$) (Merck), el cual no se encuentra en la mezcla comercial. Se disolvieron todos los componentes del medio de cultivo en agua Mili-Q, se ajustó el pH a 6,0 utilizando una

solución de hidróxido sódico (NaOH) 2M (Panreac), y se enrasó hasta un volumen de 1L con agua Mili-Q.

La esterilización del medio NLN-13 se realizó por filtración, utilizando la unidad *Sterifil Aseptic System and Holder* (Millipore) acoplada a una bomba de vacío (Boeco R-300). El medio de cultivo filtrado se almacenó en una botella de vidrio (Pyrex) estéril y se guardó a 4ºC hasta su utilización, manteniéndose posteriormente en hielo durante todo el proceso de cultivo *in vitro*. Es preferible preparar el medio de cultivo el mismo día en que vaya a utilizarse y no almacenarlo por más de una semana para así evitar que sufra oxidación, precipitación, evaporación o crecimiento microbiano.

Este medio de cultivo fue utilizado tanto para el aislamiento de microsporas como para la inducción embriogénica y posterior proliferación y maduración de los embriones. Durante el tiempo que duró el proceso de embriogénesis no fue necesario refrescar el cultivo con medio nuevo, ya que la elevada concentración de sacarosa en su composición asegura un aporte de carbono óptimo durante los 25-30 días que dura el cultivo *in vitro* de microsporas aisladas de *Brassica napus,* hasta la producción de embriones maduros.

Tabla 5. Composición del medio de cultivo NLN-13.

Macronutrientes (mg/L)		**Aminoácidos y carbohidratos (mg/L)**	
$Ca(NO_3)_2$ x $4H_2O$	500	Glutation	30
KH_2PO_4	125	L-Glutamina	800
KNO_3	125	L-Serina	100
$MgSO_4$	61	Sacarosa	130
Micronutrientes (mg/L)		**Vitaminas (mg/L)**	
$CoCl_2$ x $6H_2O$	0,025	Ácido fólico	0,5
$CuSO_4$ x $5H_2O$	0,025	Ácido nicotínico	5
H_3BO_3	10	Biotina	0,05
$MnSO_4$ x H_2O	18,95	Glicina	2
NaFe(III)-EDTA	36,70	Piridoxina HCl	0,5
Na_2MoO_4 x $2H_2O$	0,25	Tiamina HCl	0,5
$ZnSO_4$ x $7H_2O$	10		
pH 6.0			

3.2.3 Esterilización de las yemas florales, aislamiento de microsporas y puesta en cultivo

Para llevar a cabo el cultivo *in vitro* de microsporas aisladas se seleccionaron todas aquellas yemas florales que por tamaño se corresponden a la etapa de microspora vacuolada (estadio anterior a la primera mitosis de la microspora) (Fig. 33), previamente identificada con DAPI (Apartado 3.2.1). Se seleccionó esta etapa por ser la más sensible a la inducción embriogénica.

En todo momento, tanto la recogida como la selección de las yemas se llevaron a cabo en frío (trabajando en papel húmedo y placas Petri, sobre hielo) y en el menor tiempo posible, para evitar el deterioro del material vegetal.

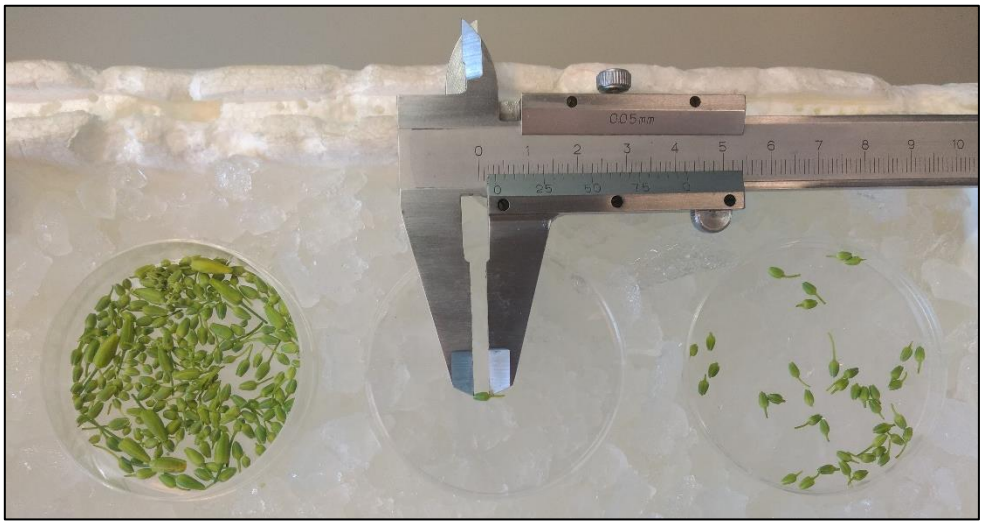


Figura 33. Selección de yemas florales de *Brassica napus* en estadio de microspora vacuolada.

Una vez seleccionadas las yemas florales, el resto del protocolo se realizó en una cabina de flujo laminar horizontal AH-100 (TELSTAR®) y se utilizó en todo momento material previamente autoclavado a 121ºC durante 15 min, para evitar contaminaciones. Siempre que fuera posible se trabajó con el material vegetal en frío, los utensilios pre-enfriados a -20ºC y los líquidos conservados a una temperatura de 4ºC, para así ralentizar los procesos de degradación celular.

Los pasos principales del cultivo están detallados en la figura 34. En primer lugar, se procedió a la esterilización del material seleccionado. Para ello, se introdujeron las yemas florales en un colador de té con ayuda de unas pinzas, y se sumergieron en una

solución de hipoclorito sódico al 2% (v/v) en agua destilada durante 20 minutos en constante agitación. Transcurrido este tiempo, se realizaron 4 lavados de 5 minutos cada uno con agua destilada estéril para eliminar los restos de lejía.

A continuación, se transfirieron los botones a un mortero de porcelana (Haldenwanger) pre-enfriado a -20ºC al que se añadió un volumen de 2-3 ml de medio de cultivo NLN-13 (Tabla 5) para proceder al disgregado de las yemas por presión manual con la mano del mortero. El disgregado debe ser lo suficientemente fuerte como para romper los tejidos externos de la yema y las paredes y resto de los tejidos de la antera, para liberar así las microsporas al medio. Como indicador de un correcto disgregado de la muestra, se debe observar una mezcla homogénea de tejidos de color verdoso al terminar. Es importante que la presión no sea excesivamente fuerte como para romper las microsporas.

Con el fin de aislar las microsporas del resto de tejidos, se transfirió el homogeneizado con ayuda de una pipeta Pasteur a una malla de nylon con un tamaño de poro de 45µm (PA 13XXX 100) (SEFAR NYTAL®) acoplada a un embudo de vidrio colocado sobre un tubo de 15ml (Falcon) estéril.

Es preferible separar las yemas florales en grupos de 15-20 para facilitar el disgregado, y al final añadir 2-3 ml más de medio al mortero para recoger cualquier resto del homogeneizado y filtrarlo por la malla. Al finalizar, la malla también se lavó con medio de cultivo, hasta alcanzar un volumen final de 14ml en el tubo, asegurando así que la mayoría de las microsporas queden recogidas en el tubo.

A continuación, se centrifugó el filtrado a 1.100 revoluciones por minuto (rpm) durante 3 min a 4ºC en una centrífuga basculante 5702 RH (Eppendorf). Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 14 ml de medio fresco, volviéndose a centrifugar en las mismas condiciones. Este procedimiento se repitió de 2 a 3 veces más para eliminar los restos de tejido somático, hasta observar un sobrenadante sin turbidez. En el último centrifugado se descartó el sobrenadante y se enrasó a un volumen final de 10 ml con medio NLN-13.

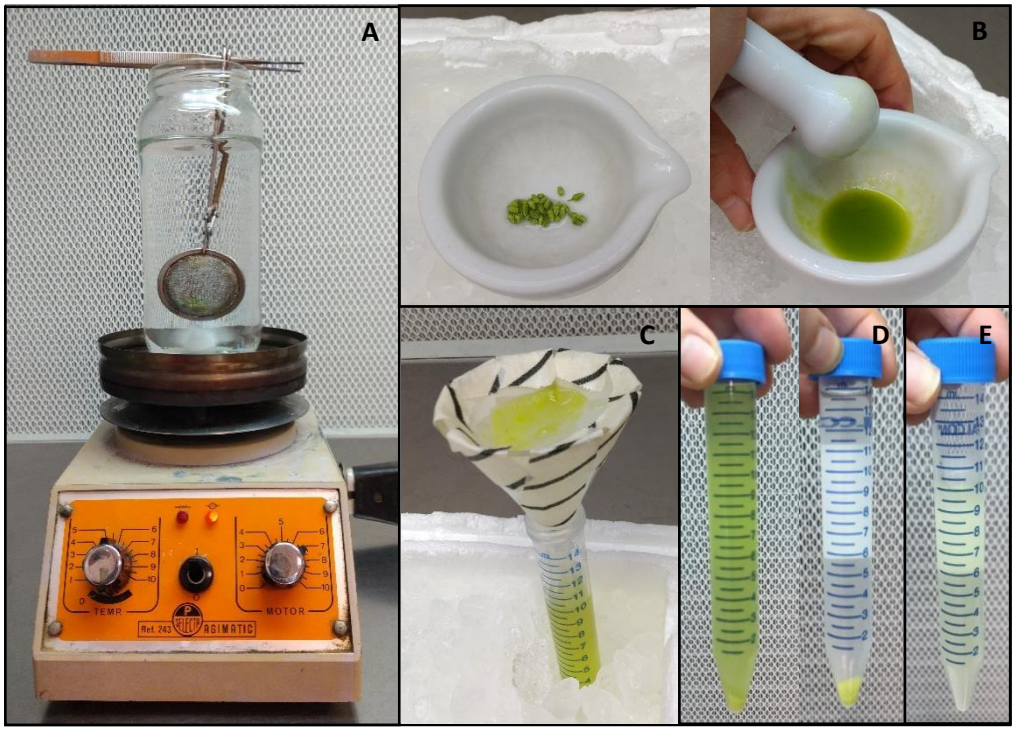


Figura 34. Cultivo *in vitro* de microsporas aisladas de *Brassica napus*. **(A)** Esterilización de yemas florares. **(B)** Machacado de las yemas floras en medio de cultivo NLN-13. **(C)** Filtrado del homogeneizado. **(D)** Suspensión de microsporas aisladas en medio de cultivo NLN-13 tras las centrifugaciones. **(E)** Tubo enrasado a 10 ml con medio NLN-13 para el recuento en la cámara Neubauer.

Para conocer la densidad de microsporas aisladas que contiene el filtrado, se procedió al conteo de microsporas en una cámara de recuento Blaubrand™ Neubauer. Para ello, se colocó un cubreobjetos y se añadió un volumen de 10 µl del filtrado a ambos lados de la cámara Neubauer. Tras el recuento celular en un microscopio óptico Leitz Laborlux 12, se calculó el volumen final de medio de cultivo NLN-13 que debía añadirse a nuestro filtrado para obtener una densidad celular de $1x10^4$ microsporas/ml, densidad óptima para el cultivo de microsporas aisladas en esta especie.

El cálculo del volumen final de medio de cultivo necesario se obtuvo aplicando la siguiente fórmula:

$$\mathbf{Ci \times Vi = Cf \times Vf}$$

Donde:

- Vf = volumen final de medio de cultivo que se necesita para una concentración Cf
- Cf = concentración celular óptima del cultivo ($1x10^4$ microsporas/ml)
- Vi = volumen inicial (10 ml)
- Ci = concentración celular obtenida en el recuento (microsporas/ml) en la cámara Neubauer

Ci= (nº microsporas/nº cuadrantes) x (1 cuadrante/ 0,0001 cm^3) x ($1cm^3$/ 1 ml)

Una vez calculado el volumen final de medio de cultivo NLN-13 que añadir a la suspensión celular, se plaqueó un volumen de 15ml de la suspensión de microsporas aisladas en cada placa Petri de 100 x 20 mm (Falcon) estéril. Las placas se sellaron con Parafilm M® (Sigma) y se mantuvieron en oscuridad a 32ºC (temperatura de estrés necesaria para la inducción embriogénica) en un incubador IN-55 (Memmert).

3.2.4 Seguimiento del cultivo

Una vez distribuido el cultivo en placas Petri a razón de 15ml/placa y mantenido en las condiciones óptimas de inducción embriogénica (32ºC y oscuridad), se llevó a cabo un seguimiento diario de las placas cultivadas utilizando una lupa binocular (Eliza Tokyo Optical Company), con el fin de detectar la respuesta de las microsporas al estrés inductor.

Transcurridos 4-7 días de cultivo, se pudo observar la presencia de proembriones, desarrollados a partir de las divisiones continuadas las microsporas reprogramadas. Los proembriones se distinguen de las microsporas por tener un mayor tamaño y un citoplasma más denso.

Las células continuaron dividiéndose rápidamente hasta formar embriones globulares. En este momento se trasladaron los cultivos a una cámara de cultivo *in vitro*, programada a una temperatura de 25ºC, donde se mantuvieron en oscuridad y agitación suave de 60 rpm sobre un agitador orbital (Elmi Skyline Shaker DOS-20L) hasta su etapa

final de desarrollo como embriones cotiledonares maduros. Existe cierta asincronía en el cultivo, llegando a coincidir distintas fases en la misma placa. Los distintos estadios del desarrollo en función del tiempo de cultivo trascurrido se detallan en la tabla 6.

Tabla 6. Estadios del desarrollo en función del tiempo transcurrido del cultivo *in vitro* de microsporas aisladas de *Brassica napus*.

ESTADIO DEL DESARROLLO	TIEMPO DE CULTIVO (días)
Microspora vacuolada aislada	0
Proembrión	4-7
Embrión globular	10-12
Embrión corazón/torpedo	> 15
Embrión cotiledonar	>22

3.2.5 Tratamientos farmacológicos en el cultivo *in vitro*

Se llevaron a cabo estudios funcionales mediante la aplicación de distintos tratamientos farmacológicos en el cultivo *in vitro* de microsporas aisladas de *Brassica napus*. El listado de compuestos ensayados, así como las distintas concentraciones testadas de cada uno de ellos, se detalla en la tabla 7.

Los compuestos se añadieron a las placas de cultivo después de haber distribuido en ellas la suspensión de microsporas aisladas en medio de cultivo. Inmediatamente después de añadir el volumen correspondiente de solución stock del compuesto, se procedió a realizar una agitación manual suave de 10-15 seg de la placa para asegurar una distribución homogénea en el cultivo.

Simultáneamente, se prepararon placas control en las que se sustituyó el compuesto por el mismo volumen del disolvente (H_2O, DMSO o etanol) empleado en la disolución del stock del tratamiento aplicado.

A continuación, se llevó a cabo un seguimiento de los cultivos y se evaluó el efecto del tratamiento tal y como se detalla en los apartados 3.6.1, 3.6.2 y 3.6.3.

Tabla 7. Tratamientos farmacológicos añadidos al cultivo *in vitro* de microsporas de *Brassica napus.*

Compuesto	Solución stock	Concentración					Referencia
L-Kinurenina	500 µM	4 µM		40 µM		100µM	Sigma-Aldrich
PI-55	1 mM	0,5 µM	1 µM	2,5 µM	5 µM	10 µM	Dr. Lukáš Spíchall
Catequina PP60	10 mg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	200 µg/ml	1 mg/ml	Sigma

3.2.6 Germinación y regeneración de plántulas

Una vez obtenidos los embriones a partir del cultivo *in vitro* de microsporas aisladas, se esperó hasta que éstos alcanzaron el estadio de embrión cotiledonar maduro para iniciar el protocolo de germinación y conocer así la capacidad de germinación de los embriones obtenidos, así como la regeneración y viabilidad de las plántulas derivadas de los mismos.

Para ello, se siguió el protocolo previamente descrito en el laboratorio (Prem *et al*., 2012). En primer lugar, se seleccionaron del cultivo embriones cotiledonares de entre 30 - 40 días que hubieran desarrollado por completo tanto los cotiledones como el hipocótilo (Fig. 35A). Estos embriones se lavaron en agua destilada estéril durante unos segundos, se secaron en un papel de filtro (Whatman) estéril y se transfirieron a una placa Petri de 10 cm (Falcon) con medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con sacarosa al 2% (p/v) (Merck) y 7 g/L de agar bacteriológico (p/v) (Conda) (Fig. 35B). Estas placas se mantuvieron en oscuridad a 18^{o}C durante aproximadamente dos semanas, tiempo en el que los embriones desarrollaron la radícula y pudieron traspasarse a tarros de vidrio con el mismo medio de cultivo. A partir de este momento, con la finalidad de activar la clorofila de los embriones germinados, los tarros se mantuvieron en una cámara de cultivo programada a 25^{o}C y con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Trascurridas 4 semanas pudo observarse la regeneración de plántulas completas, distinguiéndose en su estructura hojas, tallo y raíz (Fig. 35C). Una vez que las plantas alcanzaron un desarrollo foliar de entre 10-15 hojas fueron transferidas a un semillero de plástico con un sustrato de tierra: vermiculita en proporción 2:1. El semillero se mantuvo en una cámara de

crecimiento programada a una temperatura de 18ºC, un 80% de humedad relativa y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (Fig. 35C). Una vez que las plántulas adquirieron un tamaño suficiente, tras 2-3 semanas en el semillero, se trasplantaron en macetas de 18 cm de diámetro x 15 cm de altura y se mantuvieron en las mismas condiciones descritas en el apartado 3.1.1.

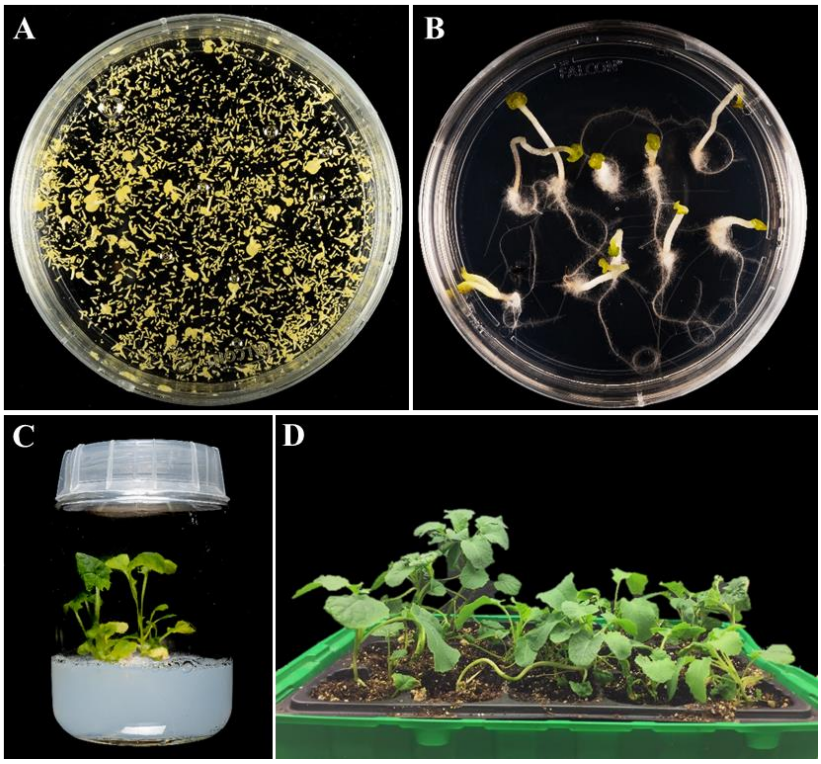


Figura 35. Germinación y regeneración de plántulas derivadas de microsporas de *Brassica napus* a partir de embriones cotiledonares maduros. **(A)** Panorámica de una placa Petri con embriones, transcurridos 30 días del cultivo *in vitro* de microsporas aisladas. **(B)** Germinación en placa de embriones cotiledonares maduros. **(C)** Plántulas de 4 semanas creciendo en potito. **(D)** Aclimatación de las plántulas en tierra, en cámara de crecimiento a una temperatura de 18ºC, un 80% de humedad relativa y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

3.3 CULTIVO *IN VITRO* DE MICROSPORAS AISLADAS DE *HORDEUM VULGARE* L.

3.3.1 Selección de espigas

En primer lugar, se llevó a cabo un análisis para establecer un criterio morfológico que nos permitiese seleccionar aquellas espigas que contenían las microsporas en la fase óptima para la inducción de la embriogénesis: la fase de microspora vacuolada. Para ello se colocaron varias espigas con las aristas de distinta longitud en una placa Petri con papel húmedo y se mantuvo en hielo. Con ayuda de una regla, se midieron

rigurosamente aquellas espigas con un tamaño de aristas (también denominadas barbas en esta especie) comprendido entre 0-3 cm de longitud (Fig. 36), a intervalos de 0,5 cm.

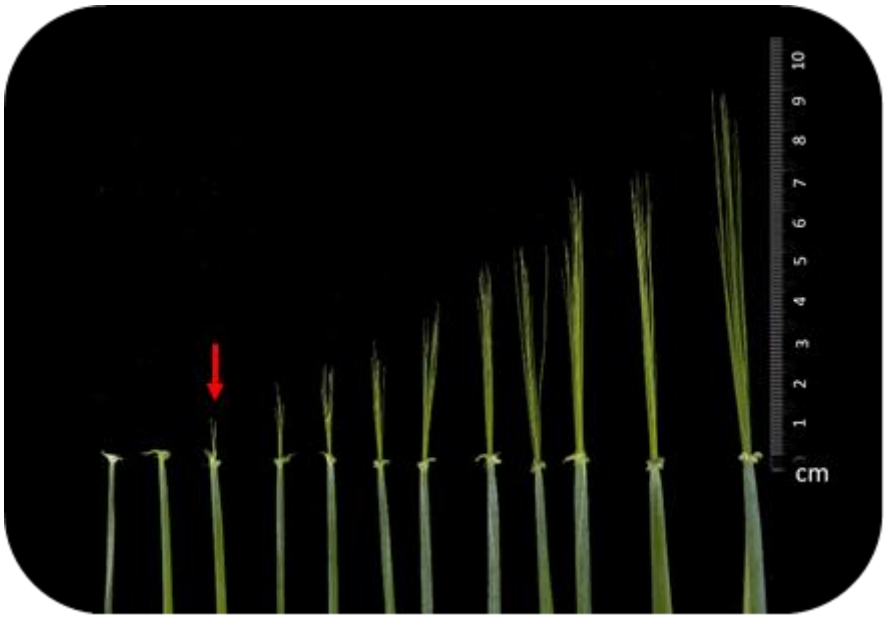


Figura 36. Espigas de *H. vulgare* en distintos estadios del desarrollo. La flecha roja señala el estadio seleccionado como material de partida para la embriogénesis de microsporas, donde se encuentra la mayor proporción de microsporas en estadio de microspora vacuolada.

Una vez seleccionadas varias espigas con las distintas medidas del intervalo, se procedió al aplastado y tinción de sus anteras con una solución de DAPI, colorante fluorescente específico de DNA (Apartado 3.9.3). Esta tinción permitió visualizar el visualizar el núcleo y deducir la fase de desarrollo de las distintas muestras utilizando la luz UV de un microscopio óptico de fluorescencia Zeiss 68105. De esta manera se identificó la fase de desarrollo de las anteras de cada muestra y se estableció una correlación entre la longitud de las aristas de la espiga y su estadio del desarrollo (Tabla 8).

Tabla 8. Correlación entre la longitud de las aristas de la espiga y el estadio del desarrollo de las microsporas y el polen de *H. vulgare.*

Tamaño de las aristas o barbas (cm)	Estadio del desarrollo
Sin aristas visibles	Célula madre
0,1-1,0	Microspora vacuolada
1,0-2,0	Polen bicelular
> 2,0	Polen tricelular

3.3.2 Esterilización de las espigas y tratamiento en frío

Para llevar a cabo el cultivo *in vitro* de microsporas aisladas se recogieron todas las espigas que, por longitud de las aristas, correspondían al estadio de microspora vacuolada, previamente identificado con DAPI (Apartado 3.3.1). Se seleccionó esta etapa por ser la más sensible a la inducción embriogénica.

Una vez recogidas las espigas, se envolvieron en su base con papel húmedo para evitar su deterioro, y se procedió a la esterilización del material (Fig. 37). En primer lugar, se abrieron las cañas, se limpiaron las espigas y se introdujeron en tubos de 50 ml (Falcon) perforados, a razón de 10-15 espigas por tubo. Los tubos se sumergieron en una solución de hipoclorito sódico al 5% (v/v) en agua destilada durante 20 minutos en constante agitación. A continuación, se realizaron 4 lavados de 5 minutos cada uno con agua destilada estéril, previamente enfriada a 4^{o}C, para eliminar los restos de lejía.

Seguidamente, se colocaron las espigas en placas Petri de 100 x 20 mm (Falcon) sobre un papel de filtro de grado 1 (Whatman) humedecido con agua destilada estéril, a razón de 10-15 espigas/ placa. Las placas se sellaron con Parafilm M® (Sigma) y se mantuvieron a 4^{o}C durante 21-24 días. Este tratamiento en frío actúa como estrés inductor de la embriogénesis en cebada.

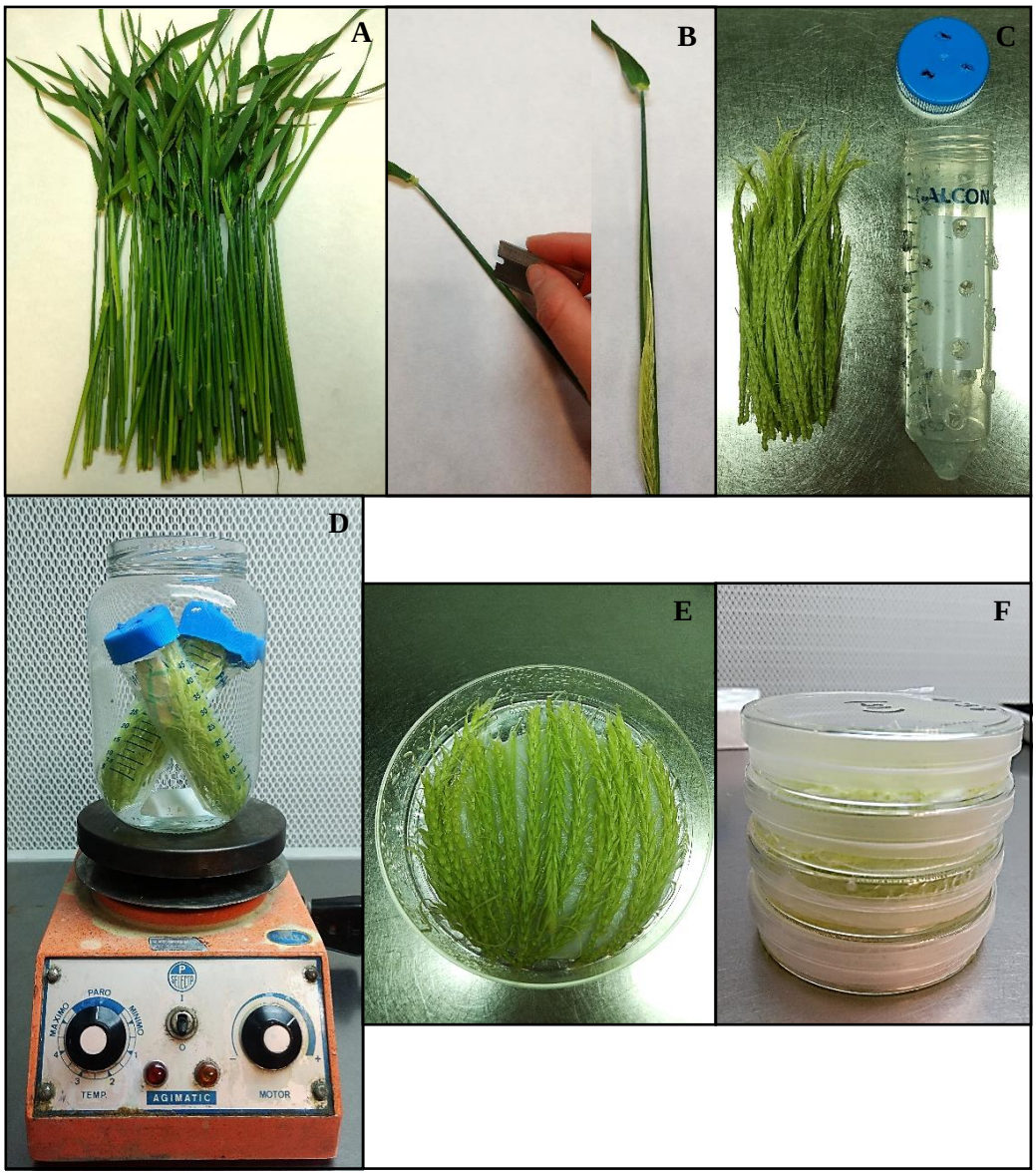


Figura 37. Selección de espigas de *Hordeum vulgare* en estadio de microspora vacuolada y tratamiento a 4ºC. **(A)** Espigas en estadio de microspora vacuolada. **(B)** Apertura de la caña para sacar la espiga. **(C)** Espigas limpias y tubo de 50 ml perforado. **(D)** Esterilización de las espigas. **(E)** Espigas esterilizadas y colocadas en placa Petri sobre papel Whatman húmedo. **(F)** Placas Petri selladas con parafilm, almacenadas a 4ºC.

3.3.3 Preparación del medio de cultivo KBP soluciones de maltosa y manitol

Se utilizó el medio de cultivo líquido KBP (Kumlehn *et al*., 2006), cuya composición se detalla en la tabla 9. También se utilizó una solución de maltosa 0,55 M y una solución de manitol 0,4 M, en agua destilada estéril.

El medio de cultivo KBP se elaboró a partir de soluciones stock previamente preparadas y almacenadas, con el fin de agilizar el proceso ya que son medios que

constan de un gran número de componentes. Se preparó un stock de macronutrientes, un stock de micronutrientes y un stock de vitaminas.

En un vaso de precipitado se añadió el volumen correspondiente del stock de macronutrientes, micronutrientes y vitaminas, y a continuación se añadió el myo-inositol (vitamina no incluida en el stock), la glutamina, el BAP (6-Bencilaminopurina) y la maltosa. Se enrasó el medio a un volumen final de 1L con agua destilada estéril y se ajustó el pH a 5,8. El medio de cultivo se esterilizó por filtración utilizando la unidad *Sterifil Aseptic System and Holder* (Millipore) acoplada a una bomba de vacío (Boeco R-300). El medio filtrado se almacenó en una botella de vidrio (Pyrex) estéril y se guardó a 4^{o}C hasta su utilización, por un máximo de 3 semanas.

Tabla 9. Composición del medio de cultivo KBP.

Macronutrientes (mg/L)		**Vitaminas (mg/L)**	
KNO_3	2022	Retinol	0,01
$CaCl_2$ x $2H_2O$	441	Tiamina-HCl	1
KH_2PO_4	340,2	Ácido nicotínico	1
$MgSO_4$ x $7H_2O$	246	Ribofavina	0,2
NH_4NO_3	80	Ca-Pantotenato	1
Micronutrientes (mg/L)		Ácido fólico	0,4
		Piridoxina HCl	1
NaFe(III)-EDTA	27,5	Cobalamina B12	0,02
$MnSO_4$ x $4H_2O$	11,2	Ácido ascórbico	2
H_3BO_3	3,1	Calciferol	0,01
$ZnSO_4$ x $7H_2O$	7,2	Biotina	0,01
$NaMoO_4$ x $2H_2O$	0,12	Cloruro de colina	1
$CuSO_4$ x $5H_2O$	0,025	Ácido p-aminobenzóico	0,02
$CoCl_2$ x $6H_2O$	0,024	Mio-inositol	100
KI	0,17		
Aminoácidos, hormonas y carbohidratos (mg/L)			
L-Glutamina	438		
BAP	0,9		
Maltosa- H_2O	90000		
pH 5.8			

3.3.4 Aislamiento de microsporas y puesta en cultivo

Para el cultivo de microsporas aisladas de cebada se utilizaron espigas previamente tratadas con una temperatura de 4ºC durante 21-24 días (Apartado 3.3.2). Se trabajó en una cabina de flujo laminar horizontal AH-100 (TELSTAR®) y se utilizó en todo momento material estéril. Siempre que fuera posible se trabajó con el material vegetal en frío (papel húmedo sobre hielo), los utensilios pre-enfriados a -20ºC y los líquidos a una temperatura de 4ºC, para así ralentizar los procesos de degradación celular.

Los pasos principales del cultivo están detallados en la figura 38. El primer paso del cultivo fue cortar las espigas en fragmentos de aproximadamente 1 cm, que se introdujeron en una batidora Waring Blender (Eberbach) con 20 ml de manitol 0,4 M para su disgregación. Para ello se programó la batidora en posición manual y se aplicaron 3 pulsos de 5 seg a baja intensidad. El material se disgregó en tandas de 10-15 espigas para asegurar un correcto triturado. A continuación, se filtró el homogeneizado a través de una malla de nylon de 100 µm de tamaño de poro (Scharlab) anclada a una estructura de plástico que hacía las veces de embudo que estaba a su vez acoplada a un vaso de precipitado de 200 ml (Pyrex). El homogeneizado del vaso se transfirió a tubos de 50 ml (Falcon), utilizándose tantos tubos como fuese necesario para recoger todo el volumen. Al finalizar, se lavó el filtro con 10 ml más de manitol 0,4 M para arrastrar cualquier resto de material, y se centrifugaron los tubos en una centrífuga basculante 5702 RH (Eppendorf) a 800 rpm durante 10 min a 4ºC. Se eliminó el sobrenadante de todos los tubos, y se resuspendieron todos los precipitados en manitol 0,4 M para traspasarlos a un único tubo de 50 ml (Falcon) con el fin de agilizar proceso. Se volvió a centrifugar este tubo a 800 rpm durante 10 min a 4ºC y se descartó el sobrenadante. Con el objetivo de aislar las microsporas vacuoladas del resto de tejidos de la espiga (que en este momento se encuentran mezclados en el precipitado), se realizó un gradiente con el precipitado, la solución de manitol 0,4 M y una solución de maltosa 0,55 M. Para ello se añadieron 4 ml de maltosa 0,55 M, se resuspendió el precipitado y se traspasó a un tubo de 15 ml (Falcon). Si el material de partida sobrepasa las 30 espigas, se pueden añadir 8 ml de maltosa y dividir el volumen en dos tubos para no saturar el gradiente que se obtiene

más adelante. Cuidadosamente, se añadieron 1,5 ml de manitol 0,4 M en la parte superior del volumen del tubo y se centrifugó a 800 rpm durante 10 min a 4ºC.

Al finalizar la centrifugación, se obtiene un gradiente del que se recoge la interfase (también denominado "anillo") (Fig. 38F), correspondiente al manitol en el que han quedado atrapadas las microsporas viables en estadio de microspora vacuolada debido a la flotabilidad que les otorga la vacuola. Esta fase del sobrenadante se recogió en un nuevo tubo de 15 ml (Falcon) al que se añadió manitol 0,4 M hasta alcanzar un volumen de 10 ml. Se centrifugó a 800 rpm durante 10 min a 4ºC y se descartó el sobrenadante con el fin de eliminar cualquier resto de maltosa. Se volvió a añadir manitol 0,4 M hasta alcanzar un volumen de 10 ml, se mezcló hasta obtener una solución homogénea y se procedió al recuento del número de células en una cámara de recuento Blaubrand™ Neubauer. Para ello, se colocó un cubreobjetos sobre cámara y se pipetearon dos muestras de 10 µl del homogeneizado, una a cada lado de la cámara Neubauer. Tras el recuento celular en un microscopio óptico Leitz Laborlux 12, se calculó el volumen final de medio de cultivo KPB que debía añadirse al homogeneizado para obtener una densidad celular de 1,1 x10^5 microsporas/ml, densidad óptima para el cultivo de microsporas aisladas en esta especie.

El cálculo del volumen final de medio de cultivo se obtuvo aplicando la siguiente fórmula:

$$\mathbf{Ci \times Vi = Cf \times Vf}$$

Donde:

- Vf = volumen final de medio de cultivo que se necesita para una concentración Cf
- Cf = concentración celular óptima del cultivo (1,1 x10^5 microsporas/ml)
- Vi = volumen inicial (10 ml)
- Ci = concentración celular obtenida en el recuento (microsporas/ml) en la cámara Neubauer

Ci= (nº microsporas/nº cuadrantes) x (1 cuadrante/ 0,0001 cm^3) x (1cm^3/ 1 ml)

Una vez calculado el volumen final de medio de cultivo KBP que añadir nuestra suspensión celular, se plaqueó un volumen de 1ml de la suspensión de microsporas en medio de cultivo en placa Petri de 60 x 10 cm (Falcon) estéril. Las placas se sellaron con Parafilm M® (Sigma) y se mantuvieron en oscuridad en una cámara de cultivo programada a 25ºC (temperatura óptima para la inducción embriogénica).

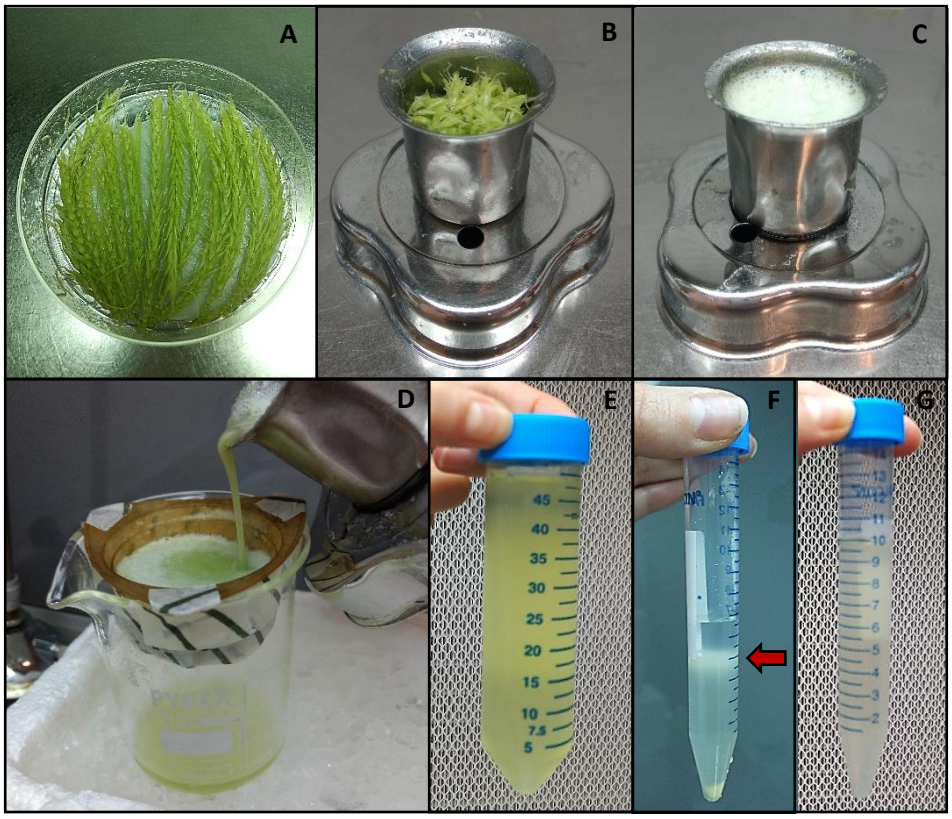


Figura 38. Cultivo *in vitro* de microsporas aisladas de *Hordeum vulgare*. **(A)** Espigas tratadas a 4ºC. **(B)** Fragmentos de espigas de 1 cm dentro de la batidora. **(C)** Homogeneizado obtenido tras el triturado. **(D)** Filtrado del homogeneizado. **(E)** Recogida del homogeneizado en un tubo de 50 ml. **(F)** Tubo de 15 ml con el gradiente de maltosa y manitol tras la centrifugación, en el que se diferencia la interfase correspondiente a las microsporas aisladas en manitol ("anillo"). **(G)** Suspensión de microsporas aisladas en 10 ml de manitol 0.4 M para el recuento de células en la cámara Neubauer.

3.3.5 Seguimiento del cultivo

Se llevó a cabo un seguimiento de las placas cultivadas utilizando una lupa binocular (Eliza Tokyo Optical Company) con el fin de detectar la respuesta de las microsporas al estrés inductor.

Transcurridos 4-7 días de cultivo, se pudo observar la presencia de proembriones, desarrollados a partir de las divisiones continuadas de las microsporas reprogramadas. Los proembriones se distinguen por presentar un tamaño mayor y un citoplasma más denso que las microsporas aisladas.

Las células continuaron dividiéndose rápidamente hasta formar embriones globulares, transicionales, escutelares y finalmente embriones coleoptilares maduros.

Los cultivos son bastante asincrónicos y coinciden distintas fases en la placa al mismo tiempo. Los distintos estadios del desarrollo en función del tiempo de cultivo trascurrido se detallan en la tabla 10.

Tabla 10. Estadios del desarrollo en función del tiempo transcurrido del cultivo *in vitro* de microsporas aisladas de *Hordeum vulgare*.

ESTADIO DEL DESARROLLO	TIEMPO DE CULTIVO (días)
Microspora vacuolada aislada	0
Proembrión	4-7
Embrión globular	8-10
Embrión transicional/escutelar	11-20
Embrión coleoptilar	>20

3.3.6 Tratamientos farmacológicos en el cultivo *in vitro*

Se llevaron a cabo estudios funcionales mediante la aplicación de distintos tratamientos farmacológicos en el cultivo *in vitro* de microsporas aisladas de *Hordeum vulgare*. El listado de compuestos ensayados, así como las distintas concentraciones testadas de cada uno de ellos, se detallan en la tabla 11.

Los compuestos se añadieron a las placas de cultivo tras haber distribuido en ellas la suspensión de microsporas aisladas en medio de cultivo a razón de 1 ml/ placa. Inmediatamente después de añadir el volumen correspondiente de solución stock del compuesto, se procedió a realizar una agitación manual suave de 10-15 seg de la placa para asegurar su distribución homogénea en el cultivo.

Simultáneamente se prepararon placas control en las que se sustituyó el compuesto por el mismo volumen del disolvente (H_2O, DMSO o etanol) empleado en la disolución del stock del tratamiento aplicado.

A continuación, se llevó a cabo un seguimiento de los cultivos y se evaluó el efecto del tratamiento tal y como se detalla en los apartados 3.6.1, 3.6.2 y 3.6.3.

Tabla 11. Tratamientos farmacológicos añadidos al cultivo *in vitro* de microsporas aisladas de *Hordeum vulgare*.

Compuesto	Solución stock	Concentración			Referencia
L-Kinurenina	500 µM	40 µM	100µM		Sigma-Aldrich
NPA	100 µM	3 µM	10 µM		Duchefa
Concanamicina A	50 µM	0,1 µM	0,5 µM	1 µM	Sigma
Ac-DEVD-CHO	10 mM	5 µM	10 µM	20 µM	Sigma
E-64d	1 mM	5 µM	10 µM		Sigma
Leupeptina	10 mM	1 µM	2,5 µM		Bachem
$MnCl_2$	0.8 M	500 µM	1 mM		Merck

3.4 CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *QUERCUS SUBER* L.

3.4.1 Recogida de material en campo

Para la recogida de las bellotas inmaduras de alcornoque, se organizaron varias salidas de campo a la localidad de El Pardo (Madrid). La recolección se programó entre los meses de septiembre-octubre, adaptando las salidas al momento de formación de los frutos de cada año y con suficiente anticipación a la maduración de los mismos para poder recoger las bellotas en el estadio del desarrollo deseado.

Tras la recogida en campo, en el laboratorio se seleccionaron de forma rigurosa las bellotas con un tamaño en torno a 1 cm de diámetro y de color verde, en base a los criterios descritos previamente para la selección de bellotas que contienen embriones cigóticos en estadio cotiledonar temprano (Pintos, 2005), estadio con mayor capacidad de respuesta a la inducción embriogénica en esta especie (Fig. 39).



Figura 39. Bellotas de *Q. suber* en distintos estadios del desarrollo. Las flechas rojas señalan el estadio seleccionado como material de partida para la embriogénesis somática. Barra: 1 cm.

3.4.2 Preparación de medios de cultivo de inducción y proliferación

Los medios de cultivo se elaboraron a partir de soluciones stock previamente preparadas y almacenadas con el fin de agilizar el proceso, ya que son medios que constan de un gran número de componentes. Los distintos componentes se agruparon en las categorías de Macronutrientes de Sommer, Vitaminas MS (Murashige & Skoog) y Micronutrientes MS (Tabla 12).

Tabla 12. Composición de macronutrientes, micronutrientes y vitaminas utilizados en los medios de cultivo inducción y proliferación de embriones cigóticos inmaduros de *Quercus suber*.

Macronutrientes de Sommer (mg/L)		Micronutrientes de MS (mg/L)		Vitaminas de MS (mg/L)	
KNO_3	1000	Na_2EDTA	37,5	Mioinositol	100
KCl	300	$FeSO_4 \times 7H_20$	27,8	Ác. Nicotínico	5
$MgSO_4 \times 7H_2O$	250	$MnSO_4 \times H_2O$	16,9	Piridoxina HCl	5
$SO_4(NH_4)_2$	200	$SO_4Zn \times 7H_2O$	8,6	Ác. Ascórbico	2
$CaCl_2 \times 2H_2O$	150	BO_3H_3	6,2	Glicina	2
$NaH_2PO_4 \times 2H_2O$	129,5	$CoCl_2 \times 6H_2O$	0,025	Tiamina HCl	1
		Kl	0,83		
		$CuSO_4 \times 5H_2O$	0,025		
		$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	0,25		

Ambos medios de cultivo se prepararon en un matraz o botella de vidrio (Pyrex), añadiendo las cantidades correspondientes de cada componente (Tabla 13). Una vez incorporados todos los componentes en el matraz, se añadió algo menos de 1L de agua Mili-Q y se puso en agitación hasta la completa disolución de todos los compuestos. A continuación, se ajustó el pH a 5,6 con una solución de NaOH 2M (Merck), se añadió el

agar y se enrasó con agua Mili-Q hasta un volumen final de 975 ml (volumen final de 1L menos 25 ml de la solución de glutamina en agua Mili-Q que se añadiría más adelante). Los medios se esterilizaron en un autoclave a 121ºC durante 15 min. En el medio ya autoclavado y atemperado, se añadió la glutamina por filtración utilizando una jeringuilla estéril acoplada a un filtro Minisart® Syringe Filters con un tamaño de poro de 0,22 µm (Sartorius). El medio se agitó y se distribuyó en placas Petri de 100 x 20 mm (Falcon) a razón de 15ml/ placa. Una vez solidificado el medio, se sellaron con film trasparente y se almacenaron a 4ºC hasta su uso.

Tabla 13. Composición de los medios de cultivo para la inducción y proliferación de embriones cigóticos inmaduros de *Quercus suber*.

Medio de inducción	Medio de proliferación
Macronutrientes de Sommer (Ref. Tabla 12)	
Micronutrientes de MS (Ref. Tabla 12)	
Vitaminas de MS (Ref. Tabla 12)	
Sacarosa (30 g/L)	
Glutamina (0,5 g/L)	
Agar bacteriológico (8 g/L)	
2,4-D (0,5 mg/L) (Sigma)	
pH 5.6	

3.4.3 Selección de bellotas en estadio inmaduro y esterilización

De todos los frutos recogidos en el campo, se seleccionaron con más precisión las bellotas inmaduras del tamaño deseado, de las que se eliminó la cúpula y de parte del tejido somático, con cuidado de no dañar el embrión que se encuentra en el interior.
A partir de este momento se trabajó en una cabina de flujo laminar horizontal AH-100 (TELSTAR®) y se utilizó material previamente autoclavado a 121ºC durante 15 min, para evitar contaminaciones. Siempre que fue posible se trabajó con el material vegetal en frío (en papel húmedo sobre hielo) y los líquidos pre-enfriados a 4ºC, con el fin de ralentizar los procesos de degradación celular.

Puesto que el material de partida procede de condiciones no controladas en cuanto a plagas, enfermedades u otros contaminantes, se requiere un proceso invasivo

de asepsia que asegure el desarrollo del cultivo *in vitro* de los embriones cigóticos inmaduros sin contaminación. Para ello se colocaron las bellotas en un colador de té, el cual se introdujo en un recipiente estéril con una solución de etanol al 70% en agua destilada estéril durante 60 segundos, en agitación. Transcurrido este tiempo, se descartó la solución alcohólica y se añadió una solución de hipoclorito sódico al 2% (v/v) en agua destilada estéril con un 1% de Tween-20 (Sigma), durante 20 minutos y manteniendo la agitación. A continuación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con agua destilada estéril previamente enfriada a 4^{o}C, para eliminar los restos de lejía.

Tras el proceso de esterilización se depositaron las bellotas en una placa Petri estéril de 100 x 20 mm (Falcon) y, una por una, con ayuda de pinzas y un bisturí, se les extrajo el embrión con mucho cuidado de no dañarlo en ningún momento para evitar la pérdida de viabilidad.

3.4.4 Puesta en cultivo e inducción embriogénica

Una vez extraídos los embriones en condiciones de esterilidad, se colocaron inmediatamente en placas Petri de 100 x 20 mm (Falcon) con medio de cultivo de inducción (Tabla 13), dejando una separación de unos 2 cm entre embriones. Las placas se sellaron con Parafilm M® (Sigma) y se mantuvieron en una cámara de cultivo programada a una temperatura de 25^{o}C y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Este medio de cultivo contiene el regulador del crecimiento 2,4-D, (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) que favorece la inducción, y el aminoácido glutamina que favorece la multiplicación.

Tras la puesta en cultivo de los embriones cigóticos inmaduros en medio de inducción, se llevó a cabo un seguimiento semanal de las placas utilizando una lupa binocular (Eliza Tokyo Optical Company), con el fin de detectar los primeros indicios de la reprogramación a embriogénesis.

En aproximadamente un mes, algunas células del embrión cigótico inmaduro ya se habían reprogramado hacia la ruta embriogénica, pudiendo observarse sobre el embrión cigótico la aparición de pequeñas masas de color blanco-amarillento que

corresponden con proembriones y masas embriogénicas que más tarde darán lugar a la formación de los embriones.

3.4.5 Traspaso del material inducido a condiciones de proliferación

Tras la inducción y detección del inicio del proceso de embriogénesis somática indirecta, las masas proembriogénicas fueron transferidas a placas Petri de 100 x 20 mm (Falcon) con medio de proliferación (Tabla 13). Estas placas se siguieron manteniendo a una temperatura de 25ºC, pero esta vez en condiciones de oscuridad. El medio de proliferación, al igual que el de inducción, también contiene glutamina para fomentar la multiplicación de células embriogénicas, pero se ha eliminado el componente 2,4-D para favorecer la diferenciación embriogénica.

3.4.6 Seguimiento del cultivo, multiplicación y embriogénesis somática recurrente

Una vez colocados los explantos iniciales con las masas proembriogénicas en el medio de proliferación, continuó la reprogramación tardía de algunas células, y se inició la diferenciación de embriones globulares, corazón, torpedo y cotiledonar. A su vez, las masas proembriogénicas se multiplicaron, y también se observó cómo sobre algunos embriones se desarrollaron masas embriogénicas proliferativas, que más tarde dieron lugar a la diferenciación de nuevos embriones (embriogénesis secundaria o recurrente). Trascurrido un mes de cultivo, el material se siguió manteniendo en medio de proliferación y embriogénesis recurrente, mediante refrescado periódico del medio. Esta rutina consistió en traspasar mensualmente tanto los embriones diferenciados como las masas embriogénicas a placas con medio de cultivo de proliferación fresco. Los embriones cigóticos inmaduros que se mantenían con buen aspecto también se cambiaron a medio fresco durante los primeros 2-3 meses, hasta que se dejó de observar la producción de nuevos embriones y se desecharon. Durante todo este tiempo, los cultivos permanecieron en una cámara de crecimiento a 25ºC y en oscuridad.

3.4.7 Tratamientos farmacológicos en el cultivo *in vitro*

Se llevaron a cabo ensayos funcionales en los cultivos *in vitro* de embriogénesis somática de *Q. suber*, mediante la aplicación de distintos tratamientos farmacológicos.

El listado de compuestos ensayados, así como las distintas concentraciones testadas de cada uno de ellos se detalla en la tabla 14. Los compuestos se añadieron al medio de cultivo de proliferación siguiendo diferentes metodologías en función de las características del compuesto testado.

El compuesto catequina PP60 se añadió al medio de cultivo de proliferación a la vez que el resto de los componentes, se esterilizó en un autoclave a 121ºC durante 15 min y se distribuyó en placas Petri de 100 x 20 mm (Falcon) a razón de 15ml/ placa.

Los reactivos Yariv (β-D-Glucosyl-Yariv y β-D-Mannosyl-Yariv) se añadieron en el medio de cultivo de proliferación después de ser autoclavado a 121ºC durante 15 min. Debido a que los reactivos Yariv son compuestos termosensibles, una vez autoclavado el medio, se atemperó a 50-65ºC y a continuación se añadió el tratamiento por filtración con una jeringuilla estéril acoplada a un filtro Minisart® Syringe Filters con un tamaño de poro de 0,22 µm (Sartorius). Se agitó el recipiente para lograr una completa homogenización del tratamiento en el medio de cultivo y se distribuyó en placas Petri de 60 x 15 mm (Falcon) a razón de 6ml/ placa.
Simultáneamente se prepararon placas control con medio de proliferación en el que se sustituyó el volumen de solución stock del compuesto por el mismo volumen del disolvente (H_2O o DMSO) empleado en la preparación de la solución stock del tratamiento correspondiente.

Las placas de cultivo se dejaron gelificar, se sellaron con Parafilm M® (Sigma) y se guardaron a 4ºC hasta el momento de su uso.

El siguiente paso fue atemperar las placas control y las placas con el tratamiento a 25ºC antes de introducir en ellas las estructuras embriogénicas. 25ºC es la temperatura a la que se encuentra el material en cultivo, de este modo los embriones no sufren el cambio brusco de temperatura al traspasarlos de una placa a otra.

A continuación, se seleccionaron masas embriogénicas en el mismo estadio del desarrollo y se colocaron de forma equidistante a razón de 4-6 masas/ placa. Se rotuló la placa con algún distintivo al lado de cada masa, para facilitar su seguimiento a lo largo del ensayo, y se mantuvieron a las mismas condiciones que el resto, a una temperatura

de 25ºC y en oscuridad. A continuación, se llevó a cabo un seguimiento de los cultivos y se evaluó el efecto del tratamiento tal y como se detalla en el apartado 3.6.4.

Tabla 14. Tratamientos farmacológicos añadidos al cultivo *in vitro* de embriones cigóticos inmaduros de *Quercus suber*.

Compuesto	Solución stock	Concentración final en el cultivo	Referencia comercial
Catequina PP60	10 mg/ml	1,5 mg/ml	Biosupplies
β-D-Glucosyl-Yariv	0,15 M	300 µg/ml	Signa-Aldrich
β-D-Mannosyl-Yariv	0,15 M	300 µg/ml	Signa-Aldrich

3.5 COMPUESTOS INHIBIDORES ENSAYADOS EN LOS CULTIVOS *IN VITRO*

3.5.1 Inhibidores de auxinas

La **L-Kinurenina** (Sigma) (Fig. 40) es un compuesto inhibidor de la biosíntesis de auxina. Se trata de una molécula de pequeño tamaño con una estructura muy similar al L-triptófano. La L-Kinurenina interviene en la ruta de biosíntesis del ácido indol-3-pirúvico dependiente de triptófano, actuando como sustrato alternativo de TAA1/TAR e inhibiendo de forma competitiva y selectiva la actividad de estas enzimas, bloqueando por tanto la biosíntesis de ácido indol-3-acético (IAA, Indole-3-acetic acid) (He *et al*., 2011).

Se preparó una solución stock de L-kinurenina 500 µM en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma), que se mantuvo a -20ºC hasta el momento de su uso.

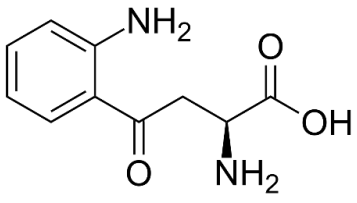


Figura 40. Estructura molecular del compuesto L-Kinurenina.

El **NPA** (*N-1-naphthylphthalamic acid* o ácido N-1-naftiltalámico) (Duchefa) (Fig. 41) es un compuesto que inhibe de forma no competitiva el transporte polar de auxina (PAT*, Polar Auxin Transport*). El NPA actúa inhibiendo el flujo de auxina entre células, al interaccionar con las proteínas transportadoras PIN (Tan, 2021).

Se preparó una solución stock de NPA a concentración 100 µM en etanol absoluto (Merck), que se mantuvo a -20ºC hasta el momento de su uso.

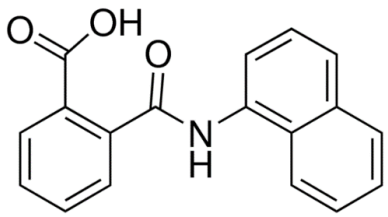


Figura 41. Estructura molecular del compuesto NPA (ácido N-1-naftiltalámico).

3.5.2 Inhibidores de citoquininas

El **PI-55** (6-(2-hidroxi-3-metillbencilamino) purina) fue proporcionado por el grupo de "Reguladores del crecimiento" dirigido por el Dr. Lukáš Spíchal en el *Institute of Experimental Botany, AS CR & Palacký University*, en Olomouc (República Checa) (Fig. 42) es un compuesto inhibidor de la ruta de las citoquininas. Se trata de un compuesto muy similar a la citoquinina 6-bencilaminopurina, pero con propiedades antagónicas. El PI-55 actúa inhibiendo de forma competitiva la unión del ligando natural *trans*-zeatina a los receptores de citoquinina HKs, más específicamente HK4 (Spíchal *et al*., 2009).

Se preparó una solución stock de PI-55 1 mM en (DMSO) (Sigma), que se mantuvo a -20ºC hasta el momento de su uso.

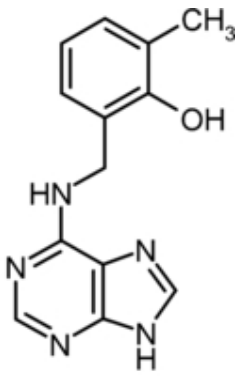


Figura 42. Estructura molecular del compuesto PI-55 (6-(2-hidroxi-3-metillbencilamino) purina).

3.5.3 Inhibidores de proteínas de arabinogalactano

El reactivo **β-D-Glucossyl-Yariv** (Biosupplies) (Fig. 43) es un agente bloqueante de las proteínas de arabinogalactano (AGPs). Como control del experimento se utilizó el reactivo **β-D-Mannosyl-Yariv** (Biosupplies) el cual tiene una estructura molecular similar pero no interacciona con AGPs (Borderies *et al*., 2004) (Yariv *et al*., 1962; Yariv *et al*., 1967).

Se preparó una solución stock de β-D-Gluc-Yariv o β-D-Man-Yariv a una concentración de 2 mg/ml en una solución 0,15 M de cloruro sódico (NaCl) en agua destilada estéril, que se mantuvo a 4ºC hasta el momento de su uso.

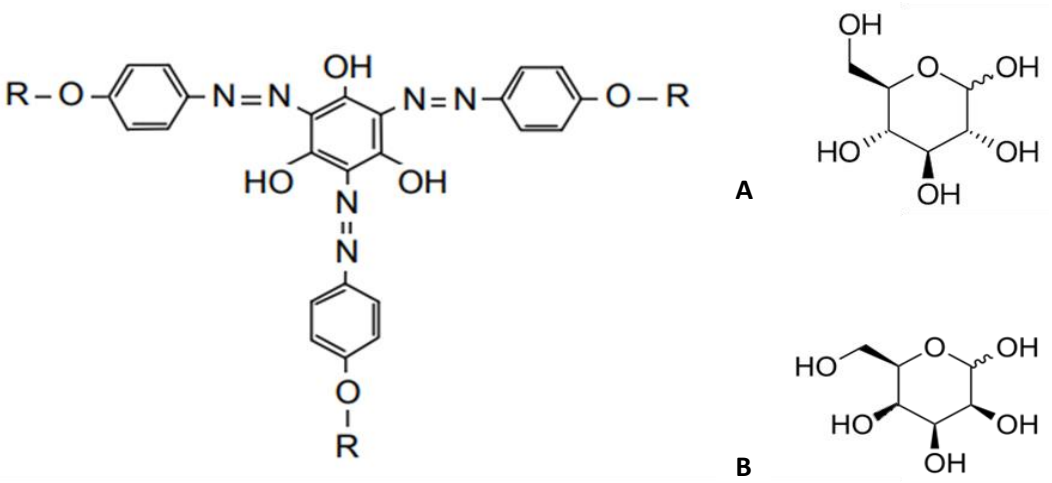


Figura 43. Estructura molecular de los reactivos Yariv. **(A)** R = β-D-Gluc-Yariv (*β-D-Glucosyl-Yariv phenylglucoside reagent*). **(B)** β-D-Man-Yariv (*β-D-Mannosyl-Yariv phenylglucoside reagent*).

3.5.4 Inhibidores de pectinmetilesterasas

La **catequina PP60** (*Catequina Polyphenon 60*) (Sigma-Aldrich) (Fig. 44) es un compuesto obtenido a partir de extractos de té verde, que actúa como inhibidor de la actividad pectinmetilesterasa (PME) (Lewis *et al*., 2008).

Se preparó una solución stock de catequina PP60 a una concentración 10 mg/ml en agua destilada estéril, que se mantuvo a 4ºC hasta el momento de su uso.

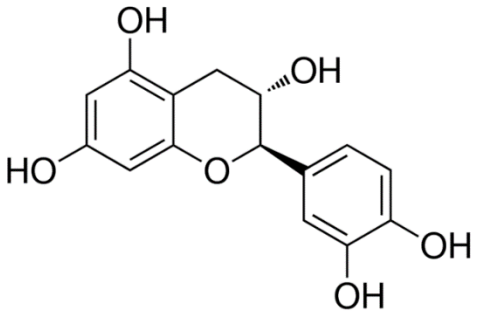


Figura 44. Estructura molecular del compuesto catequina PP60 (*Catequina Polyphenon 60*).

3.5.5 Inhibidores de autofagia, proteasas y ROS

El **cloruro de manganeso tetrahidratado ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)** (Merck) (Fig. 45) es un compuesto capaz de eliminar las especies reactivas de oxígeno (ROS*, reactive oxigen species*), reaccionando específicamente con los aniones superóxido (O_2^-) (Rodríguez-Serrano *et al*., 2012).

Se preparó una solución stock de $MnCl_2$ 0,8 M en agua destilada estéril, que se mantuvo a 4ºC hasta el momento de su uso.

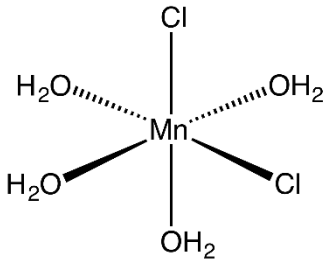


Figura 45. Estructura molecular del compuesto $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (cloruro de manganeso tetrahidratado).

El **Ac-DEVD-CHO** (N-Acetil-Aspartato-Glutamato-Valina-Aspartato-aldehído) (Sigma) (Fig. 46) es un compuesto que actúa como inhibidor específico de la proteasa Caspasa-3, bloqueando su actividad. Este tetrapéptido presenta en su estructura la secuencia de aminoácidos específica sobre la que actúa la enzima Caspasa-3, lo que le convierte en un inhibidor competitivo (Poręba *et al*., 2013).

Se preparó una solución stock de Ac-DEVD-CHO 10 mM en DMSO (Sigma), que se mantuvo a 4ºC hasta el momento de su uso.

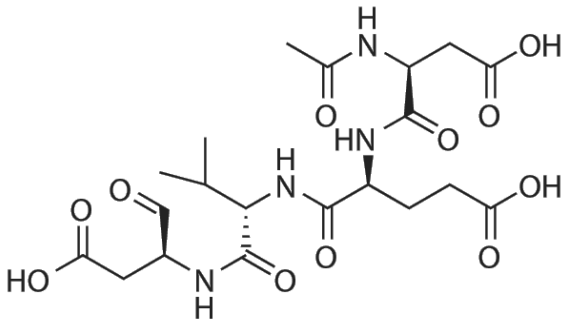


Figura 46. Estructura molecular del compuesto Ac-DEVD-CHO (N-Acetil-Aspartato-Glutamato-Valina-Aspartato-aldehído).

La **concanamicina A** (Sigma) (Fig. 47) es un compuesto capaz de inhibir de forma específica la actividad H^+-ATPasa vacuolar (V-ATPasa). Al bloquear el transporte de protones, se incrementa el pH vacuolar de la célula, lo que inactiva la actividad de las enzimas hidrolíticas ácidas e inhibe el flujo autofágico, impidiendo la degradación del cargo autofágico (autofagosomas) (Matsuoka *et al*., 1997).

Se preparó una solución stock de concanamicina A a una concentración 50 µM en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma), que almacenó a -20ºC hasta el momento de su uso.

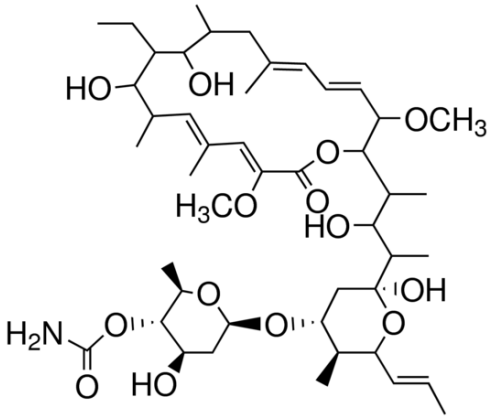


Figura 47. Estructura molecular del compuesto concanamicina A (*Z,5E,7R,8R,9S,10S,11R,13E,15E,17S,18R)-18-[(1S,2R,3S)-3-[(2R,4R,5S,6R)-4-[[4-O-(Aminocarbonyl)-2,6-dideoxy-β-D-arabino-hexopyranosyl]oxy]tetrahydro-2-hydroxy-5-methyl-6-(1E)-1-propenyl-2H-pyran-2-yl]-2-hydroxy-1-methylbutyl]-9-ethyl-8,10-dihydroxy-3,17-dimethoxy-5,7,11,13-tetramethyloxacyclooctadeca-3,5,13,15-tetraen-2-one*).

La **leupeptina** (N- acetil- L- leucil- L- leucil- L -argininal hemisulfato) (Bachem) (Fig. 48) es un compuesto que inhibe de forma competitiva y reversible la actividad proteolítica de serín, cisteín y treonín proteasas (Moriyasu e Inoue, 2008).

Se preparó una solución stock de leupeptina a una concentración 10 mM en agua destilada estéril y se almacenó a -20^{o}C hasta el momento de su uso.

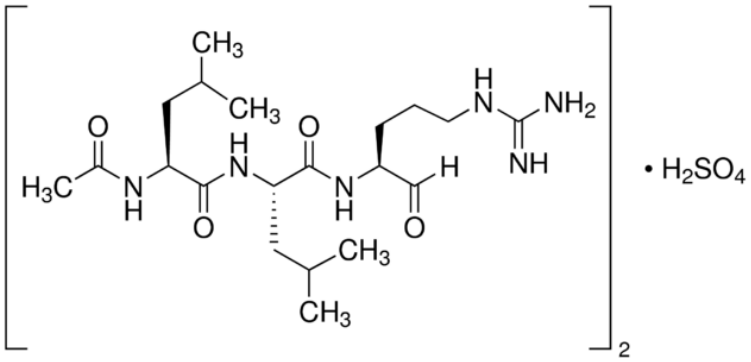


Figura 48. Estructura molecular del compuesto leupeptina (N- acetil- L- leucil- L- leucil- L -argininal hemisulfato).

El **E-64d** (Sigma) (Fig. 49) es un compuesto que actúa como inhibidor irreversible selectivo de cisteín proteasas, inhibiendo por tanto la degradación los autofagosomas en el interior de las vacuolas (autofagosomas) (Moriyasu e Inoue, 2008).

Se preparó una solución stock de E-64d a una concentración 1 mM en agua destilada estéril y se almacenó a -20ºC hasta el momento de su uso.

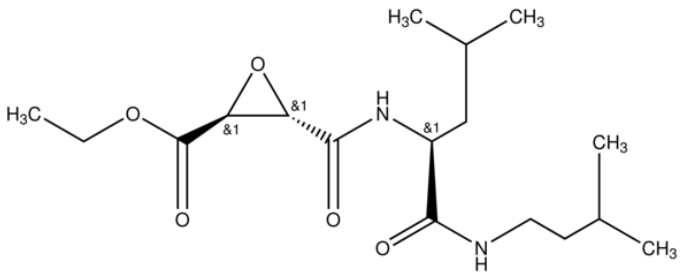


Figura 49. Estructura molecular del compuesto E-64d ((2S, 3S)-trans-epoxisuccinil-L-leucil-amido-3-metillbutano etil ester).

3.6 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS CON INHIBIDORES

Se evaluó el efecto de los tratamientos farmacológicos sobre el desarrollo embriogénico de los cultivos, utilizando para ello distintas metodologías en base a las características y requerimientos de cada tipo de cultivo para las distintas especies vegetales.

3.6.1 Cuantificación de proembriones en el cultivo *in vitro* de microsporas aisladas

Se llevó a cabo una cuantificación porcentual del número de proembriones formados en el cultivo al cabo de 6 días, tomando este dato como valor indicativo de la respuesta embriogénica del cultivo, ya que los proembriones son considerados el primer signo morfológico del inicio de la embriogénesis. Esta metodología se aplicó tanto a los cultivos de microsporas aisladas de *H.vulgare* como de *B.napus*.

El procedimiento consistió en fotografiar cada una de las placas de cultivo, utilizando un estereomicroscopio de Leica MZ16F con una cámara Leica DFC490 acoplada en el caso de los cultivos de microsporas aisladas de *Brassica napus,* y un microscopio invertido de Leica DMI6000B con una cámara Orca-Flash 4.0 LT Digital CMOS acoplada, para los cultivos de microsporas aisladas de *Hordeum vulgare*. La selección de distintos aparatos para fotografiar los cultivos se debe a la necesidad de un mayor aumento para discernir entre estructuras en el caso de la cebada y al

requerimiento de un área mayor por fotografía en el caso de los cultivos de colza por tener menor densidad celular.

Antes de fotografiar los cultivos, se procedió a una agitación manual ligera de cada placa durante 10 segundos para asegurar una distribución homogénea de las estructuras en el medio de cultivo y acto seguido se tomaron alrededor de 30-50 fotografías de cada placa, hasta cubrir todo el área de cultivo. Las imágenes fueron analizadas en un ordenador, utilizando la herramienta de recuento del programa informático Adobe Photoshop CS5.1. Para la recogida de datos se contó un mínimo de 1000 estructuras por placa, distinguiéndose en el recuento entre microsporas vacuoladas (células que no respondieron al estrés inductor) y proembriones (estructuras embriogénicas formadas a partir de microsporas reprogramadas), siendo estas últimas estructuras de mayor tamaño y mayor densidad citoplásmica.

El porcentaje de proembriones en cada placa se calculó dividiendo el número total de proembriones observados entre el total de estructuras presentes en el cultivo (microsporas vacuoladas + proembriones). Este dato nos permitió conocer el porcentaje de inducción *in vitro* de microsporas aisladas y evaluar el efecto de los tratamientos sobre este parámetro en comparación con las placas control. Para el análisis estadístico se utilizó el valor promedio del porcentaje de proembriones en cultivos control y tratados, procedentes de un mínimo de tres repeticiones y tres réplicas biológicas.

3.6.2 Cuantificación de embriones maduros en el cultivo *in vitro* de microsporas aisladas

También se evaluó el efecto de los tratamientos sobre el desarrollo y producción de embriones mediante la cuantificación de embriones cotiledonares (*B. napus*) o coleoptilares (*H. vulgare*) formados al cabo de 30 días.

Trascurridos 30 días de cultivo, se tomaron fotografías de las placas (una fotografía por placa, abarcando el total de su área) con una cámara Nikon D810 con objetivo Micro-Nikkor 60 mm F2.8 (Réflex). A partir de estas fotografías se procedió al recuento del total de embriones cotiledonares/placa utilizando el programa Adobe Photoshop CS5.1 en los cultivos de *B. napus* y el programa Image-J en los cultivos de *H. vulgare*. Para el análisis estadístico se utilizó el valor promedio de embriones cotiledonares o coleoptilares

(según la especie) en cultivos control y tratados, procedentes de un mínimo de tres repeticiones y tres réplicas biológicas.

3.6.3 Cuantificación de muerte celular en el cultivo *in vitro* de microsporas aisladas

La cuantificación de muerte celular en los cultivos *in vitro* de microsporas se llevó a cabo utilizando una tinción de azul de Evans. El azul de Evans es un colorante impermeable capaz de penetrar exclusivamente en las células que tienen dañada su pared, tiñéndolas de azul. De esta manera, se pudieron llevar a cabo ensayos de viabilidad mediante el contaje de células muertas (teñidas) *vs* células vivas (sin teñir).
Para este ensayo se tomaron muestras de 1 ml de cultivo en estadio de proembrión (6 días). El volumen de muestra se añadió a un tubo 1,5 ml (Eppendorf) y se centrifugó a 3.000 rpm en una centrífuga basculante 5702 RH (Eppendorf) durante 5 min a 4ºC. Seguidamente se decantó el sobrenadante y se incubó el precipitado en una solución de azul de Evans (Sigma) al 0,25% (p/v) en agua destilada durante 45 min en muestras de *B. napus* y durante 30 min en muestras de *H. vulgare*, en ambos casos manteniendo los tubos a 4ºC.

Transcurrido el tiempo de incubación, para eliminar el colorante, se centrifugaron las muestras a 3.000 rpm durante 3 min a 4ºC y se eliminó el sobrenadante. A continuación, se añadió agua destilada al precipitado, se resuspendió con una micropipeta y se centrifugó de nuevo a 3.000 rpm durante 3 min. Este último paso de lavado se repitió 2-3 veces hasta observar un sobrenadante traslúcido, sin restos de tinción. Tras el último lavado, se resuspendió el precipitado en 10 µl de agua destilada y se añadió el total del volumen sobre un portaobjetos. La preparación se montó con un cubreobjetos y se selló con laca de uñas. A continuación, se procedió al contaje de células muertas y vivas utilizando el campo claro de un microscopio óptico Leitz Laborlux 12 acoplado a una cámara USB 2.0 uEye SE (IDS Imaging Development Systems GmbH). Se contaron todas las células de cada preparación para obtener el porcentaje de muerte celular, dividiendo las células teñidas entre el total de células contadas. También se tomaron fotografías de las diferentes preparaciones para ilustrar el evento de muerte celular.

Para el análisis estadístico se utilizó el valor promedio de células muertas en cultivos control y tratados, procedentes de un mínimo de tres repeticiones y tres réplicas biológicas.

3.6.4 Cuantificación de embriones somáticos en cultivo *in vitro* de *Q. suber*

En el caso del cultivo *in vitro* en medio sólido de embriones somáticos de *Q. suber*, se evaluó el efecto de los tratamientos en el proceso de diferenciación, transcurridos 30 días tras la siembra de las masas embriogénicas.

Se tomaron fotografías de las placas en el día 0 de cultivo (inmediatamente después de poner en cultivo las masas embriogénicas) y transcurridos 30 días, utilizando una cámara Nikon D810 con objetivo Micro-Nikkor 60 mm F2.8 (Réflex). Se utilizó el programa Adobe Photoshop CS5.1 para cuantificar el número de embriones diferenciados en cada masa, cuantificándose estructuras de embriones en fase de corazón, torpedo y cotiledonar. Para el análisis estadístico se utilizó el valor promedio de embriones diferenciados a los 30 días en cultivos control y tratados, procedentes de un mínimo de tres repeticiones y tres réplicas biológicas.

3.7 RECOGIDA DE MUESTRAS PARA ESTUDIOS CELULARES Y MOLECULARES

Se recogieron muestras de distintas fases del desarrollo embriogénico de los cultivos *in vitro* de microsporas aisladas de *B. napus* y *H. vulgare*, así como de las distintas etapas del desarrollo de las microsporas y el polen de ambas especies. También se recogieron muestras de las distintas etapas de embriogénesis somática de *Q. suber*. Si las muestras se iban a destinar a estudios celulares, se procedía a fijarlas y a almacenarlas a 4^{o}C hasta su uso. Si las muestras se iban a destinar a estudios moleculares, se almacenaban congeladas a -80^{o}C.

3.7.1 Recogida de muestras de cultivos de microsporas aisladas en medio líquido

Para la recogida de muestras de los cultivos de microsporas aisladas en medio líquido (tanto de *B. napus* como de *H. vulgare*), se procedió al trasvase de las placas Petri de interés en tubos de 50 ml (Falcon). Estos tubos se centrifugaron a 2.000 rpm durante 5 min a 4^{o}C en una centrífuga basculante 5702 RH (Eppendorf). Seguidamente, se

eliminó la mayor parte del sobrenadante con una pipeta Pasteur, dejando un volumen de 1,5 ml para resuspender el precipitado y traspasarlo a un eppendorf de 1,5 ml. Este eppendorf se volvió a centrifugar a 1.500 rpm durante 3 min a 4ºC. Finalmente se eliminó por completo el sobrenadante y se procedió a la fijación del material (Apartado 3.8.1) en caso de destinarse a estudios celulares, o su congelación en nitrógeno líquido y almacenamiento a -80ºC en caso de ser utilizado en estudios moleculares o proteómicos.

3.7.2 Recogida de muestras de anteras en distintos estadios del desarrollo

Se seleccionaron yemas florales de (*B. napus*) y espigas (*H. vulgare*) en distintos estadios del desarrollo (Tablas 4 y 8, respectivamente). La recogida de este material se llevó a cabo mediante la apertura manual de las yemas o flores de la espiga con ayuda de unas pinzas y un bisturí, trabajando en frío en todo momento. Las anteras extraídas se fueron almacenando en un tubo de 1,5 ml (Eppendorf) con solución fijadora (Apartado 3.8.1) en el caso de destinarse a estudios celulares, o se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido tras la apertura de cada yema o flor para evitar la degradación del material destinado a estudios moleculares. Estas últimas muestras se almacenaron a -80ºC hasta ser requeridas para los análisis.

3.7.3 Recogida de muestras de cultivos de embriogénesis somática en medio sólido

Se seleccionaron embriones somáticos de *Q. suber* en un determinado estadio embriogénico. Estos cultivos no siguen una sincronía como ocurre en el caso de los cultivos en medio líquido de microsporas aisladas, por ello en ocasiones es necesario recoger el material de distintas placas con el fin de obtener una cantidad de material suficiente para los análisis. Después de extraer los embriones de interés, las placas se volvieron a sellar con Parafilm M® (Sigma) y continuaron cultivándose bajo las mismas condiciones. Los embriones seleccionados se separaron cuidadosamente del resto de estructuras con ayuda de unas pinzas de punta redonda y un bisturí, procurando eliminar cualquier resto de medio de cultivo que tuvieran adherido. El material seleccionado se introdujo en tubos eppendorf de 1,5 ml estériles para su inmediata congelación en nitrógeno líquido y posterior almacenamiento a -80ºC en caso de

destinarse a estudios moleculares, o se fijó siguiendo los pasos del apartado 3.8.1 para utilizarlo en estudios celulares.

3.8 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA MICROSCOPÍA ÓPTICA

3.8.1 Fijación

Con el fin de preservar tanto la estructura celular y tisular como la reactividad bioquímica de las muestras para posteriores ensayos citoquímicos y de inmunofluorescencia, se llevó a cabo un proceso de fijación. La fijación consiste en la inmovilización y estabilización de los componentes y estructuras celulares mediante la penetración, a través de la fase acuosa de las células, de determinados productos químicos llamados fijadores. El objetivo de la fijación es inactivar el metabolismo celular, inactivar enzimas lisosómicas y mantener las estructuras, conservando así la morfología celular lo más parecida posible al estado vivo.

El fijador utilizado en este estudio fue paraformaldehído (PF), un fijador muy penetrante clasificado como fijador químico, que establece uniones covalentes entre las moléculas del tejido. Se utilizó una solución de PF al 4% (p/v) en tampón fosfato salino (PBS: *Phosphate Buffered Saline*) 1X (fosfato-K 20 mM pH 6,8 y NaCl 150 mM) preparada a partir de PF en polvo (Merck), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Las muestras se introdujeron en un tubo de 1,5 ml (Eppendorf) con PF 4% y se colocaron con la tapa abierta en un desecador (Globe Scientific Inc.) acoplado a una bomba de vacío (Boeco R-300), donde se desgasificaron a 40 kPa de presión durante 1-2 minutos para favorecer la penetración del fijador. Es importante asegurarse de que las muestras quedan completamente sumergidas en el fijador, y no contienen aire en la estructura. Acto seguido, se guardaron a 4^{o}C durante 18-24h para completar la fijación. Transcurrido este tiempo, las muestras se lavaron 3 veces con PBS 1X durante 10 min y se conservaron en PF al 0,1% (p/v) en tampón PBS 1X para evitar que revierta la fijación. En este estado, las muestras se pueden almacenar sin deteriorarse varias semanas hasta que se continúe con su procesamiento.

3.8.2 Pre-inclusión en gelatina de las células y estructuras en suspensión

Solo en el caso de muestras procedentes de cultivo de microsporas aisladas en fases previas al embrión cotiledonar o coleoptilar, se procedió a su inclusión en gelatina (Honeywell Riedel-de Haen®) al 15% (p/v) en tampón PBS 1X, con el fin de facilitar su manipulación en los siguientes pasos del procesamiento.

El material almacenado en PF 0,1%, se centrifugó en una centrífuga basculante 5702 RH (Eppendorf) a 3.000 rpm durante 5 min a 4ºC. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en un volumen de 100-150 µl de gelatina al 15% (p/v) en tampón PBS 1X, previamente calentada a 37ºC para aumentar su fluidez. A continuación, y con rapidez para evitar la solidificación de la gelatina, se volvió a centrifugar la muestra a 3.000 rpm durante 5 min a 37ºC. Al terminar, se dejó solidificar en hielo durante unos minutos para evitar la resuspensión de la muestra. Una vez solidificada la gelatina, se añadieron 50 µl de PBS 1X (para evitar la desecación de la muestra) y 50 µl de PF al 4% (para asegurar el endurecimiento de la gelatina). Las muestras se almacenaron durante 24h a 4ºC para asegurar una correcta gelificación y posteriormente se desmoldaron con ayuda de un palillo. Se seccionó la capa de gelatina sobrante (sin muestra) de la parte superior utilizando una cuchilla de un solo filo (RB-009), y se procedió a hacer secciones de la zona de la muestra en pequeños fragmentos de unos 3 mm. Estos fragmentos se almacenaron en PF al 0,1% a 4ºC hasta que se continuó con su procesamiento, manipulándolos como muestras procedentes de tejidos y pudiéndose preservar durante varias semanas en estas condiciones.

3.8.3 Inclusión en resina

3.8.3.a Deshidratación

Se cogieron las muestras almacenadas en PF al 0,1% y se lavaron con PBS 1X durante 5 min, en hielo. Este proceso de lavado se repitió 3 veces para asegurar la completa eliminación del exceso de fijador. Acto seguido, se inició el proceso de deshidratación mediante la incubación secuencial de las muestras en series de acetona (Merck) de concentración creciente (30%, 50%, 70%, 90% y 100%) (v/v) en PBS 1X, a 4ºC (Tabla 15). La incubación en la solución de acetona al 100% se hizo por triplicado.

Tabla 15. Deshidrataciones en acetona.

Concentración de acetona	Tiempo de incubación
Acetona 30%	1 h
Acetona 50%	1 h
Acetona 70%	*overnight*
Acetona 90%	1h
Acetona 100%	1h (x3)

3.8.3.b Infiltración

Una vez finalizada la última deshidratación en acetona al 100%, se procedió a la infiltración de las muestras en Historesin Plus (Technovit® 8.100), una resina de naturaleza hidrofílica que resulta muy útil en estudios generales de microscopía óptica. La solución de infiltración se preparó en un recipiente de vidrio ámbar (para evitar su degradación por efecto de la luz), disolviendo 60 mg de *Hardener I* en 10 ml de *Basic solution*, siguiendo las instrucciones del kit. Una vez preparada, esta solución puede guardarse hasta un máximo de una semana manteniéndose a 4ºC.

Se eliminó por completo cualquier resto de acetona al 100% y se añadió 1 ml de solución de infiltración a las muestras, las cuales se incubaron en un agitador rotativo de tipo noria durante 48h a 4ºC.

3.8.3.c Polimerización

Una vez finalizado el tiempo de incubación en la solución de infiltración, ésta fue sustituida por la solución de polimerización. La solución de polimerización se preparó mezclando 160 µl de *Hardener II* en 3 ml de solución de infiltración, siguiendo las instrucciones del kit. Esta solución debe prepararse en el instante preciso en que se vaya a utilizar, ya que polimeriza muy rápido, quedando inservible para el procesamiento de las muestras.

La polimerización de las muestras se llevó a cabo sobre una gradilla (Reichert-Jung) adaptada a cápsulas de gelatina (Agar Scientific) y acoplada a un transilumidador (Reichert-Jung), lo cual facilitó la visualización de la muestra durante el proceso.

En primer lugar, se seleccionó el tamaño de las cápsulas de gelatina en función del tamaño de la muestra (tamaño núm. 1-4). Se colocaron las cápsulas en la gradilla con la tapa superpuesta, con el fin de evitar la entrada partículas del ambiente y a la vez agilizar el proceso de colocación de la muestra. El procedimiento debe ser rápido, ya que este sistema de polimerización es sensible al oxígeno. El siguiente paso fue eliminar por completo la solución de infiltración de las muestras e incubarlas en 500 µl de solución de inclusión durante 1 min a temperatura ambiente. En ese tiempo se abrieron las cápsulas y se añadió en cada una de ellas una gota de solución de inclusión con una pipeta Pasteur. Con esto se evita que se formen cámaras de aire entre la cápsula y la muestra. A continuación, se sacó la muestra del eppendorf con ayuda de un palillo, y se colocó en el fondo de la cápsula. Tras colocar la muestra y asegurándonos de que permanezca en la posición y orientación deseadas, se terminó de rellenar la cápsula con la solución de inclusión y se colocó la tapa. Las muestras se dejaron polimerizar en la gradilla durante 24 h a 4^{o}C y protegidas de la luz.

3.8.4 Obtención de cortes semifinos en ultramicrotomo

A partir de las cápsulas de resina polimerizada con las muestras, se obtuvieron cortes semifinos de 2 µm utilizando un ultramicrotomo (LKB Ultratome III). Los cortes se realizaron con una cuchilla de vidrio (Taab Superglass) previamente tallada en un equipo *knifemaker* (LKB Bromma). El procedimiento para la obtención de cortes semifinos comienza con la colocación de la cápsula en el cabezal, el cual está acoplado a un brazo móvil que sitúa la muestra en una posición enfrentada con la cuchilla de vidrio, previamente colocada en el soporte correspondiente. El corte se realiza mediante el avance manual (utilizando la rueda del macrométrico) de la cápsula hacia la cuchilla y la consiguiente bajada del brazo que contiene la muestra. Es importante que tanto la cuchilla como la muestra estén fuertemente sujetas a su soporte para evitar la vibración durante el corte, lo que produciría cortes de grosor irregular inservibles para los estudios de microscopía. Antes de obtener el corte, debemos asegurarnos de que la muestra esté

orientada en la posición que nos interesa y que el filo de la cuchilla sea recto (reflejándose en la cápsula como una línea horizontal) y sin muescas que dañen el bloque y estropeen el corte.

Los primeros cortes del bloque corresponden a la capa de resina sin muestra, y son desechados. Una vez alcanzada la región de interés de la muestra, se recogieron los cortes con ayuda de unas pinzas y se depositaron sobre una gota de agua destilada (20-200 µl según el tamaño del corte) en un portaobjetos. Es muy importante que el corte quede perfectamente estirado, sin arrugas y sin pliegues en la zona de la muestra. Los cortes se dejaron secar a temperatura ambiente y protegidos del polvo durante un mínimo de 24h, para asegurar su adhesión al portaobjetos antes de realizar sobre ellos ninguna tinción. Los cortes obtenidos pueden almacenarse en estas condiciones durante varios meses hasta su uso.

3.9 TINCIONES CITOQUÍMICAS

Se llevaron a cabo distintas tinciones histoquímicas sobre cortes semifinos de 2 µm (Apartado 3.8.4) de las diferentes muestras incluidas en resina Technovit 8100.

3.9.1 Citoquímica con azul de toluidina

El azul de toluidina es un colorante catiónico que tiñe estructuras basófilas, como por ejemplo la cromatina. Se puede comportar como colorante ortocromático (tiñendo de color azul) o metacromático (tiñendo de color violeta-rojizo), dependiendo del pH y de la naturaleza química del tejido. Esta tinción nos permite diferenciar con claridad las distintas estructuras celulares y tisulares de la muestra.

Se preparó una solución de azul de toluidina (Merck) al 1% (p/v) en agua destilada y se filtró a través de un filtro Minisart® Syringe Filters de tamaño 0,22 µm (Sartorius) acoplado a una jeringuilla. Esta solución puede conservarse a temperatura ambiente durante varios meses, pasado un mes conviene volver a agitarla y filtrarla.

Los cortes semifinos seleccionados se tiñeron cubriéndolos por completo con esta solución durante 1-2 minutos a temperatura ambiente, según la intensidad de coloración deseada. A continuación, se lavaron varias veces con agua destilada

utilizando una pipeta Pasteur, hasta retirar por completo el exceso de colorante, y se dejaron secar protegidos del polvo. Seguidamente, se procedió a su montaje con un cubreobjetos y Eukit (Apartado 3.9.4.a).

Una vez finalizado el montaje y trascurrido el tiempo de secado del mismo, se observaron las muestras utilizando el campo claro de un microscopio óptico Leitz Laborlux 12 acoplado a una cámara USB 2.0 uEye SE (IDS Imaging Development Systems GmbH).

3.9.2 Citoquímica con yodo/yoduro potásico

La tinción citoquímica con yodo/yoduro potásico (I_2/KI) se utilizó para detectar la presencia de moléculas de almidón en la muestra. Este reactivo penetra en la molécula de almidón tiñéndola de color negro-púrpura si se trata de un depósito de almidón de gran tamaño o de un tono granate-rojizo si se trata de un depósito pequeño.
La solución de I_2+KI se preparó disolviendo 0,2 g de I (Probus) y 2 g de KI (Merck) en 100 ml de agua destilada. La solución se filtró a través de un filtro Minisart® Syringe Filters de tamaño 0,22 µm (Sartorius) acoplado a una jeringuilla. Esta solución puede conservarse a temperatura ambiente durante varios meses, pasado un mes conviene volver a agitarla y filtrarla.

Los cortes semifinos seleccionados se tiñeron cubriéndolos por completo con esta solución durante 5-15 minutos a temperatura ambiente, según el tipo de material y la intensidad de coloración deseada. A continuación, se lavaron varias veces con agua destilada hasta retirar por completo el exceso de colorante, y se dejaron secar protegidos del polvo. Seguidamente, se procedió a su montaje con Eukit (Apartado 3.9.4.a).

Las muestras se observaron utilizando el campo claro de un microscopio óptico Leitz Laborlux 12 acoplado a una cámara USB 2.0 uEye SE (IDS Imaging Development Systems GmbH).

3.9.3 Citoquímica con DAPI

El DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol) es un colorante fluorescente que tiñe específicamente las moléculas de DNA. Se trata de una molécula intercalante que se une fuertemente a las regiones de la secuencia de DNA enriquecidas en los nucleótidos adenina y timina.

La solución de DAPI se preparó a partir de una solución stock comercial (Serva), ajustándola a una concentración final de 10 µg/ml en agua destilada, a la que se añadió un 1% (v/v) de Tritón X-100 (Sigma) para facilitar la penetración del colorante en los tejidos de la muestra. Esta solución puede conservarse a 4ºC y protegida de la luz durante varios meses.

Los cortes semifinos seleccionados se tiñeron cubriéndolos por completo con esta solución durante 5 minutos a temperatura ambiente y en completa oscuridad. Transcurrido este tiempo, se eliminó el excedente de solución con ayuda de una micropipeta. Sin dejar que el corte se secara por completo, se procedió a su montaje con un cubreobjetos y Mowiol (Apartado 3.9.4.b).

Puesto que el DAPI tiene su máximo de excitación a una longitud de onda de 358 nm (rango del UV) y su máximo de emisión a 461 nm (rango del azul en el visible), la observación de las preparaciones se llevó a cabo utilizando el filtro ultravioleta de un microscopio de fluorescencia (Zeiss 68105) con una cámara Leica DFC42 C (Leica Microsystems) acoplada, para la adquisición de imágenes. Las muestras se almacenaron a 4ºC y en oscuridad durante varios meses.

3.9.4 Montaje de las preparaciones

Una vez realizada la tinción correspondiente sobre los cortes semifinos, se procedió a su montaje con Eukitt o Moviol dependiendo de la citoquímica empleada.

3.9.4.a Montaje con Eukit

El Eukitt (Kindler Gmbh & Co) es un medio de montaje permanente de secado rápido (5-15 min), muy utilizado en preparaciones histológicas por su fluidez y su índice de refracción. El montaje con Eukitt permite visualizar una imagen más contrastada

después de la tinción, lo que ayuda a un mejor enfoque de la muestra y a una mayor calidad y rapidez del análisis. Una vez montadas con Eukitt, las muestras pueden almacenarse durante varios años sin agrietarse ni decolorarse.

Este fue el medio de montaje utilizado para los cortes semifinos tras la tinción citoquímica con azul de toluidina (Apartado 3. 9.1) o yodo/yoduro potásico (Apartado 3.9.2).

Tras asegurarnos de que el corte estaba totalmente seco, se procedió a su montaje con Eukitt. Para ello se extendió una cantidad abundante del medio de montaje sobre una de las caras de un cubreobjetos, que se colocó rápidamente sobre el corte. Con ayuda de un palillo se presionó cuidadosamente el cubreobjetos para asegurar la distribución homogénea del Eukitt sobre el corte, eliminando cualquier burbuja de aire que perjudique la posterior visualización de la muestra. Una vez seco el medio de montaje, se procedió a la observación de las muestras y a su almacenamiento a temperatura ambiente protegidas del polvo.

3.9.4.b Montaje con Mowiol

El Mowiol® 4-88 (Sigma-Aldrich) es un medio de montaje semipermanente miscible en agua, que permite conservar la fluorescencia. Estas preparaciones se realizaron para las tinciones con DAPI e inmunofluorescencia.

Tras retirar el exceso de la tinción con DAPI (Apartado 3.9.3) y antes de que el corte se secara por completo, se procedió a su montaje con Mowiol. Para ello se extendió una fina capa del medio de montaje sobre una de las caras de un cubreobjetos, ayudándonos de un palillo. Se colocó el cubreobjetos sobre el corte y con ayuda de un nuevo palillo se presionó cuidadosamente el cubreobjetos para asegurar la distribución homogénea del Mowiol sobre la muestra, evitando la formación de cámaras de aire que pueden dañar la preservación del corte y la correcta visualización de la muestra en el microscopio. Por último, se selló el cubreobjetos con laca de uñas para evitar la entrada de aire en la preparación y así poder conservarse a 4^{o}C y en oscuridad durante varias semanas.

3.10 INMUNOFLUORESCENCIA Y ANÁLISIS EN MICROSCOPÍA CONFOCAL

3.10.1 Recubrimiento de portaobjetos con APTES

El recubrimiento o silanización de portaobjetos con APTES es una técnica muy utilizada en inmunofluorescencia para aumentar la adhesión de los cortes semifinos a la superficie del portaobjetos y disminuir así el riesgo de que éstos se despeguen en alguno de los numerosos pasos del ensayo de inmunofluorescencia.

El APTES ((3-aminopropil) trietoxi-silano) es un compuesto capaz de activar la superficie del portaobjetos, modificando sus propiedades químicas a base de fijar en él organosilanos funcionales. Esta modificación aumenta la fuerza de adhesión del corte a la superficie, formando atracciones electrostáticas entre el corte (con carga negativa) y los radicales positivos del silano, que forma una fina película adherida al vidrio.

Se recubrieron portaobjetos multipocillo previamente lavados con detergente neutro y agua destilada, siguiendo el protocolo descrito por Rentrop *et al*. (1986). Los portaobjetos, una vez limpios, se dejaron secar a temperatura ambiente y se introdujeron de manera secuencial en jarras coplin de vidrio (Glaswerk Wertheim) con distintas soluciones (Fig. 50).

Primero se sumergieron en una solución de APTES (Sigma) al 2% (v/v) en acetona pura (Merck) durante 3 minutos. A continuación, se mantuvieron durante 2 minutos en acetona pura, repitiendo este paso dos veces usando jarras distintas. Finalmente se procedió a sumergir los portaobjetos dos veces en agua destilada durante 3 minutos para eliminar cualquier resto de las disoluciones anteriores. El último paso fue dejarlos

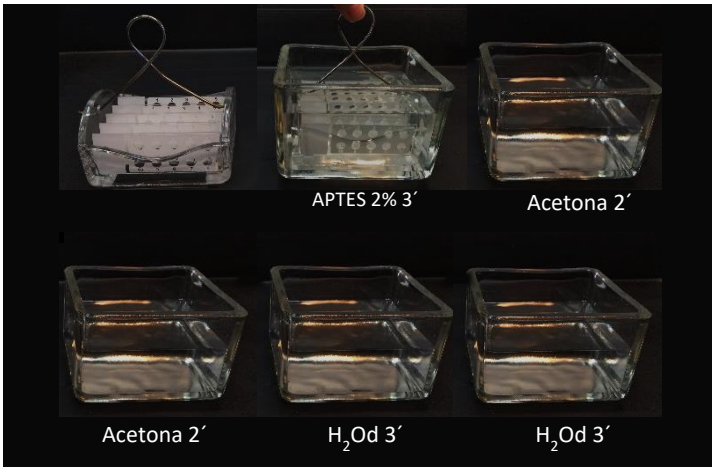


Figura 50. Recubrimiento de portaobjetos multipocillo con APTES.

secar a temperatura ambiente protegidos del polvo. Una vez secos se guardaron en cajas de plástico con separadores, para evitar el rozamiento entre ellos.

3.10.2 Inmunofluorescencia

Para los ensayos de inmunofluorescencia se utilizaron cortes semifinos de 2 µm de grosor, dispuestos sobre portaobjetos multipocillo recubiertos con APTES (Apartado 3.10.1). En cada pocillo de depositó un único corte para evitar el solapamiento de los mismos, lo cual arruinaría el ensayo. En el caso de disponer de poco volumen de anticuerpo o de trabajar con un anticuerpo de precio muy elevado, se colocaron dos cortes en un mismo pocillo siempre asegurando la distancia entre ellos.

El primer paso de esta técnica consistió en el lavado e hidratación de los cortes con PBS 1X, 3 veces durante 5 min. Para retirar el volumen de los pocillos tras la incubación con las distintas soluciones se utilizó una punta de pipeta acoplada a una bomba de vacío (Boeco R-300). Es importante que el corte permanezca hidratado en todo momento durante el experimento para favorecer la reacción antígeno-anticuerpo (Fig. 51). El volumen añadido a cada pocillo, de cualquiera de los reactivos, debe cubrir perfectamente el corte (15-20 µl). Tras retirar el PBS, el siguiente pasó consistió en bloquear las uniones inespecíficas con albúmina de suero bobino (BSA, *Bovine Serum Albumin*) al 5% (p/v) en tampón PBS 1X durante 10 min. A continuación, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario a temperatura ambiente (RT) durante 1h en cámara húmeda. La lista de anticuerpos utilizados y su concentración para el ensayo está detallada en la tabla 16. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron de 3 a 5 lavados de 5 minutos con PBS 1X para eliminar los restos de anticuerpo primario que no se haya unido a los epítopos de la muestra. Seguidamente, se incubaron los cortes con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 17) durante 45 minutos en cámara húmeda y en oscuridad. A partir de este momento se trabajó en oscuridad para evitar la pérdida de fluorescencia del fluoróforo conjugado con el anticuerpo secundario. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron un mínimo de 5 lavados de 5 min cada uno en PBS 1X, para eliminar cualquier resto de anticuerpo secundario que no se haya unido al anticuerpo primario y que enturbiaría la visualización de la unión específica. A continuación, se incubaron las muestras durante 10 min en una solución

de DAPI a concentración de 1µg/ml en PBS 1X. Se eliminó el exceso de solución realizando 2 lavados de 5 min en agua destilada estéril y se procedió al montaje con Mowiol® 4-88 (Sigma-Aldrich) (Apartado 3.9.4.b). Las preparaciones se guardaron a 4ºC protegidas de la luz hasta que fueron analizadas en un microscopio láser confocal (CLSM) Leica TCS SP5.

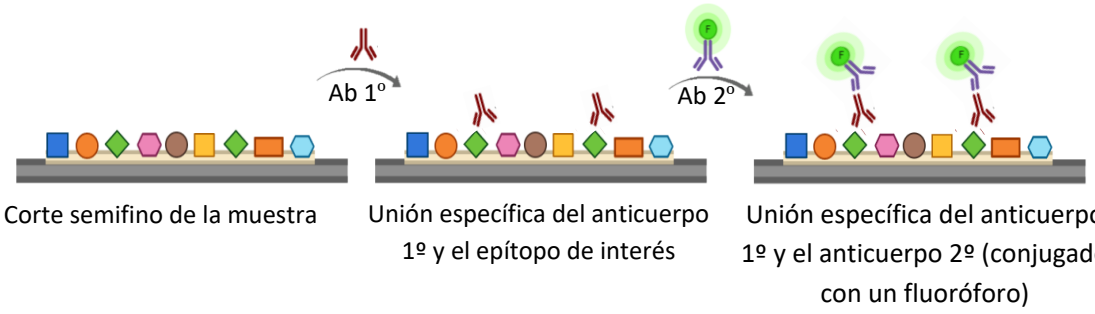


Figura 51. Esquema de la reacción de inmunofluorescencia.

Tabla 16. Anticuerpos primarios empleados en inmunofluorescencia (IF), *dot blot* (DB) y *western blot* (WB).

Anticuerpo	Origen	Tipo de anticuerpo	Antígeno	Concentración	Referencia
Anti-AIA	Ratón	Monoclonal	Auxina	IF 1:100	Sigma A0855
Anti-CK	Conejo	Policlonal	*Trans*-zeatina	IF 1:5	Agrisera AS09 431
Anti-JIM5	Rata	Monoclonal	Pectinas no esterificadas	IF Puro DB 1:100	Knox *et al*. 1990
Anti-JIM7	Rata	Monoclonal	Pectinas esterificadas	IF 1:5 DB 1:100	Knox *et al*. 1990
Anti-LM19	Rata	Monoclonal	Pectinas no esterificadas	IF 1:5 DB 1:100	Vehertbruggen *et al*. 2019
Anti-LM20	Rata	Monoclonal	Pectinas esterificadas	IF 1:5 DB 1:100	Vehertbruggen *et al*. 2019
Anti-LM2	Rata	Monoclonal	β-linked-GlcA en AGP glicanos	IF 1:20 DB 1:200	Smallwood *et al*. 1996
Anti-LM6	Rata	Monoclonal	Arabinos α-(1-5)-L-arabinosyl de AGP glicanos, y arabinos de dominio RG-I de pectinas	IF 1:5 DB 1:100	Williams *et al*. 1998
Anti-JIM14	Rata	Monoclonal	AGP glicanos	IF 1:5 DB 1:100	Knox *et al*. 1991; Yates *et al*. 1996
Anti-RNA	Ratón	Monoclonal	RNA celular	IF Puro	Eilat *et al*. 1991
Anti-ATG5	Conejo	Policlonal	Proteína ATG5	IF 1:50	María Fernanda Suárez (Univ. Málaga)
Anti-ATG8	Conejo	Policlonal	Proteína ATG8	IF 1:50	Jose Luis Crespo (IBVF-CSIC)
Anti-Pap1	Conejo	Policlonal	PLCP Pap1	IF 1:20	Isabel Díaz (CBGP)
Anti-Pap6	Conejo	Policlonal	PLCP Pap6	IF 1:50	Isabel Díaz
Anti-Pap19	Conejo	Policlonal	PLCP Pap19	IF 1:100	Isabel Díaz
Anti-SAG12	Conejo	Policlonal	PLCP SAG12	IF 1:20 WB 1:1000	Agrisera AS14 2771
Anti-RD21A	Cabra	Monoclonal	Péptido DELPESIDWRKKG de RD21A	WB 1:1000	Havé *et al*. 2018
Anti-CATHB3	Conejo	Monoclonal	N-terminal de la proteína CATHB3	WB 1:1000	Havé *et al*. 2018

Tabla 17. Anticuerpos secundarios empleados en inmunofluorescencia.

Anticuerpo	Fluoróforo conjugado	Concentración	Referencia
Anti-IgG de ratón	Alexa Fluor ™ 488	1:25	Molecular Probes
Anti-IgG de conejo	Alexa Fluor ™ 488	1:25	Molecular Probes
Anti-IgG de rata	Alexa Fluor ™ 488	1:25	Molecular Probes

3.10.3 Controles de inmunofluorescencia

En cada experimento de inmunofluorescencia se trabajó con una serie de controles negativos y/o positivos dependiendo del tipo de anticuerpo utilizado en el análisis.

Control negativo por ausencia de anticuerpo primario

En los pocillos destinados a este tipo de control negativo, se siguió el mismo protocolo de inmunofluorescencia que con el resto de muestras exceptuando el momento de añadir el anticuerpo primario. En este paso, la solución de anticuerpo primario fue sustituida por PBS 1X durante la incubación. Este tipo de control negativo se incluyó en el análisis de todos los anticuerpos estudiados.

Control negativo por inmunodeplección

La técnica de inmunodeplección (Fig. 52), consiste en incubar previamente el anticuerpo primario con su antígeno y es esta solución la que se utiliza como sustituto del anticuerpo primario en la incubación. El resto del protocolo es igual que para el resto de las muestras. Este tipo de control negativo es muy útil para comprobar la especificidad del anticuerpo por su antígeno, ya que al haber bloqueado el anticuerpo con el antígeno previamente, éste no se unirá a los epítopos de la muestra.

En este trabajo se realizaron controles de inmunodeplección para dos anticuerpos de forma independiente: el anticuerpo anti-AIA y anti-CK. Para la inmunodeplección del anticuerpo frente a auxina, se preparó una solución de auxina sintética (Merck) 5 mg/ ml en PBS 1X; y en el caso de la inmunodeplección para el anticuerpo anti-CK, la solución se preparó con la citoquinina sintética BAP (6-Bencilaminopurina) (Duchefa Biochemie) 5 mg/ ml en PBS 1X.

A continuación, se realizó una pre-incubación del anticuerpo en esta solución en proporción 1: 2 (v:v) durante toda la noche a 4^{o}C. Esta mezcla se empleó como sustituto del anticuerpo primario en el ensayo de inmunofluorescencia, siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 3.10.2.

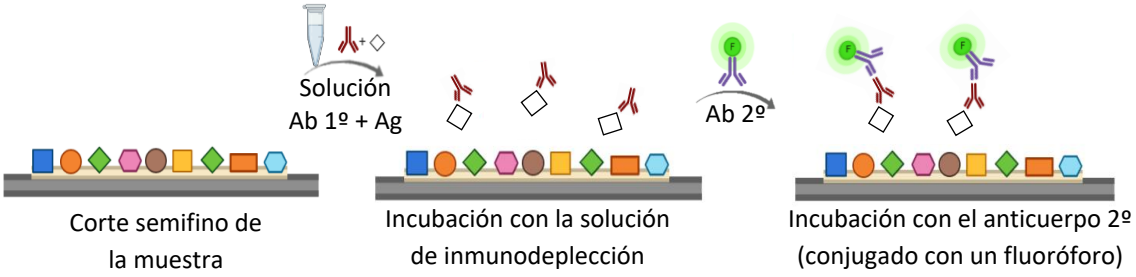


Figura 52. Esquema de la reacción de inmunofluorescencia en un control negativo por inmunodeplección.

Control positivo

El control positivo consiste en utilizar un material diferente a la muestra de interés de la misma especie o incluso una especie diferente, en la que se conozca por estudios previos la indudable presencia del antígeno en una localización determinada, para así demostrar el funcionamiento y especificidad del anticuerpo. En este trabajo se realizó un control positivo para probar la eficacia del anticuerpo anti-AIA. En este caso el análisis de inmunofluorescencia se llevó a cabo sobre cortes semifinos de puntas de raíces en crecimiento obtenidas a partir de semillas germinadas de cebada, siguiendo el mismo protocolo y concentración del anticuerpo que para el resto de muestras. Se utilizó este material por la extensa bibliografía que prueba la acumulación de auxina en la punta de raíces jóvenes en crecimiento.

3.10.4 Análisis de microscopía confocal

Las preparaciones de inmunofluorescencia se analizaron en un microscopio láser confocal (CLSM) Leica TCS SP5.

Dentro de cada experimento, los análisis de microscopía confocal se llevaron a cabo utilizando el mismo nivel de excitación y emisión de láser, y las imágenes fueron tomadas bajo las mismas condiciones de adquisición en todas las preparaciones de inmunofluorescencia con el mismo anticuerpo. Esta dinámica de trabajo permitió comparar la intensidad de la señal de fluorescencia de un mismo anticuerpo en distintas muestras.

Tanto la intensidad del láser como las condiciones de adquisición de la imagen se fijaron para cada anticuerpo tomando como referencia los controles negativos de cada experimento.

3.10.5 Cuantificación de la intensidad de señal de inmunofluorescencia con Image-J

La cuantificación de la señal de fluorescencia se llevó a cabo utilizando el programa informático Image-J, sobre la proyección máxima de las imágenes tomadas en un microscopio láser confocal (CLSM) Leica TCS SP5 obtenidas tal y como se describe en el apartado 3.10.4.

Las estructuras correspondientes a distintos estadios del desarrollo fueron seleccionadas como regiones de interés (ROIs, *Regions of interest*) y se obtuvieron sus valores de intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, comparables entre sí. En estos análisis, se midió la intensidad de fluorescencia de un mínimo de 25 estructuras de cada etapa del desarrollo, procedentes de diferentes experimentos de inmunofluorescencia, cada uno de ellos con un mínimo de tres réplicas biológicas de cada estadio.

3.11 DETECCIÓN DE PECTINAS Y PROTEÍNAS ESPECÍFICAS MEDIANTE TÉCNICAS DE *INMUNOBLOT*

Se llevaron a cabo dos tipos de ensayos de *inmunoblot*: inmuno *dot blot* y *western blot*. La técnica de inmuno *dot blot* se utilizó para el estudio del desarrollo embriogénico de *Q. suber* con anticuerpos o con reactivo Yariv, mientras que la técnica de *western blot* se llevó a cabo en distintas etapas del desarrollo del polen de *H. vulgare*. Las muestras utilizadas en estos análisis fueron recogidas, congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80^{o}C siguiendo la metodología descrita en los apartados 3.7.1 y 3.7.3.

3.11.1 Técnica de *inmuno dot blot* para la detección de pectinas y AGPs

3.11.1.a Preparación del tampón de extracción

En un frasco ámbar se preparó la solución del tampón de extracción, compuesto por Tris-HCl 25 mM pH 7,2, ácido trans-1,2-diaminociclohexano-N, N, N´N´-tetracético (CDTA, *trans-1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid*) 50 mM y 1,4-ditiotreitol (DTT) 25 mM. La solución se guardó a 4ºC hasta el momento de ser utilizada.

3.11.1.b Extracción de proteínas totales

En primer lugar, se procedió al homogeneizado de 100 mg de muestra, utilizando un mortero de porcelana (Haldenwanger) y nitrógeno líquido. Una vez que la muestra quedó completamente pulverizada se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1-2 minutos y se añadió un volumen de 20 µl de tampón de extracción (Apartado 3.11.1.a), repartiendo el volumen por toda la muestra hasta formar una papilla. Es importante no añadir el tampón hasta que la muestra esté parcialmente descongelada, para evitar que éste se congele y no pueda mezclarse con la muestra. La papilla resultante se transfirió a un eppendorf de 1,5 ml y se dejó en hielo durante 10-15 minutos, alternándose con vórtex a máxima potencia para favorecer la lisis del material.

A continuación, se centrifugó la muestra a 7.000 rpm a 4ºC durante 10 minutos en una centrífuga de mesa Eppendorf MiniSpin®. Seguidamente, se recogió el sobrenadante (con el total de proteínas extraídas) en un nuevo eppendorf de 1,5 ml y se mantuvo en hielo para continuar con el experimento o se almacenó a -20ºC hasta el momento de su uso.

3.11.1.c Determinación de la concentración de proteínas totales

Para determinar la concentración de proteínas totales en la muestra se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976), empleando albúmina de suero bovino (BSA) como patrón de calibración.

El ensayo se llevó a cabo en una placa multipocillo (Falcon), añadiendo a cada pocillo un volumen final de 250 µl, correspondiente a 5 µl de muestra y 245 µl de reactivo Bio-Rad Protein Assay Reagent (Bio-Rad), todas las muestras se añadieron por

triplicado. Se dejó incubar la reacción en oscuridad durante 30 minutos y transcurrido este tiempo se procedió a la lectura de la placa en un espectrofotómetro MultiskanTM Sky Microplate UV/Vis (ThermoFisher Scientific), programado a una longitud de onda de 595 nm. Las lecturas se tomaron utilizando el tampón de extracción como blanco de las mediciones. La concentración de proteínas de las muestras se calculó extrapolando los valores de absorbancia de las muestras en la recta patrón de calibración con BSA, elaborada con concentraciones conocidas de entre 0,125 y 2 µg/µl.

3.11.1.d Ensayo de inmuno *dot blot* para la detección de pectinas

Se ajustaron todos los extractos a una concentración de proteína de 1mg/ml en tampón de extracción.

Para cada ensayo de anticuerpo se recortó una membrana de nitrocelulosa (Millipore) de 4 x 2 cm y se activó por inmersión secuencial en metanol durante 15 seg, agua destilada estéril durante 2 min y tampón tris salino (TBS, *Tris Buffered Saline*) 1X (compuesto por Tris HCl 20 mM pH 7,8 y NaCl 0,18 M) durante 5 min. Para manipular las membranas se utilizó una pinza de pico de pato, y se agarraron siempre por el mismo extremo para evitar en la medida de lo posible marcas en la membrana que aparecerán en el revelado final del ensayo.

Una vez activadas las membranas, se quitó el excedente de TBS 1X colocando la membrana sobre papel de cromatografía de celulosa 3 MM Chr (Whatman) y se añadió una gota de 10 µl de cada extracto, dejando una separación aproximada de 1 cm entre muestras para evitar que se solapen al secar. Se dejó caer la gota sin apoyar la punta de la pipeta en la membrana para evitar dejar marcas. Se esperó a que las gotas penetrasen por completo en las membranas y después se dejaron secar durante aproximadamente 1h.

A continuación, se realizó una tinción reversible con una solución comercial de Rojo Ponceau (Sigma) 1X como control para verificar que se cargó la misma concentración del extracto de proteínas de todas las muestras. Para ello se introdujeron las membranas en una placa Petri de 60 x 15 mm (Falcon) con el colorante, hasta observar una coloración rojiza de la membrana en la zona de las muestras. Se tomó una imagen de la tinción de Rojo Ponceau mediante digitalización de la membrana en un

escáner Hewlett Packard 6100C. Este colorante presenta la ventaja de poder eliminarse por completo tras sumergir la membrana en sucesivos lavados con agua destilada, sin haber interferencia alguna en los pasos posteriores de inmunodetección.

Una vez eliminada la tinción, se dejaron secar las membranas y se preparó el tampón de bloqueo, compuesto por TBS 1X y leche desnatada en polvo (Central Lechera Asturiana) al 1,5% (p/v). Las membranas se incubaron en esta solución durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación suave a 100 rpm sobre un agitador orbital. A continuación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno en TBS 1X. Seguidamente, se incubaron las membranas con el anticuerpo primario correspondiente para detectar pectinas con distinto grado de metilesterificación (JIM5, JIM7, LM19 y LM20) (Tabla 16) en proporción 1:100 (v:v) en TBS 1X durante toda la noche a temperatura ambiente y agitación suave de 100 rpm en un agitador orbital. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno en TBS 1X y se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario anti-IgG de rata (ya que los anticuerpos primarios eran IgGs de rata) conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma) en proporción 1:1000 (v:v) en TBS 1X durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación suave a 100 rpm en un agitador orbital. A continuación, se realizaron 3 lavados de la membrana de 10 minutos cada uno en TBS 1X.

Finalmente, se revelaron las membranas sumergiéndolas en una solución de NBT/BCIP ready-to-Use Tablets (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. En el momento en que se observó una coloración marrón azulada de la membrana en la zona de las muestras, se detuvo la reacción de revelado sumergiendo la membrana en varios lavados de agua destilada estéril. Las membranas se dejaron secar, y se digitalizaron en un escáner Hewlett Packard 6100C.

3.11.2 Ensayo de *dot blot* con reactivo Yariv para la detección de AGPs

Todos los extractos se ajustaron a una concentración de proteína de 1mg/ml en tampón de extracción. Además, como control positivo se preparó una solución de goma arábiga (Biosupplies) de 2 µg/ ml en PBS 1X, compuesta por una mezcla de proteínas de arabinogalactano (AGPs).

Se recortaron dos membranas de nitrocelulosa (Millipore) de 6 x 2 cm y se activaron mediante inmersión en metanol durante 15 seg, agua destilada estéril durante 2 min y finalmente PBS 1X durante 5 min.

Una vez activadas, se quitó el excedente de PBS 1X de las membranas colocándolas sobre papel de filtro (Whatman). Acto seguido, se añadió en cada membrana una gota de 10 µl de cada extracto, así como de la solución de goma arábiga preparada como control positivo. También se añadió a la membrana una gota de PBS 1X como control negativo del ensayo. Las gotas se dispensaron dejando entre ellas una separación aproximada de 1 cm, para evitar contacto entre los halos al absorberse en la membrana. Se dejó caer la gota en la membrana, con cuidado de no dañarla con la punta de la micropipeta. Se esperó a que las gotas penetraran por completo en las membranas y se dejaron secar durante aproximadamente 1h.

A continuación, se realizó una tinción reversible con una solución comercial de Rojo Ponceau (Sigma) 1X como control para verificar que se cargó la misma cantidad de proteínas de todas las muestras. Las membranas se digitalizaron en un escáner Hewlett Packard 6100C y se lavaron en agua destilada estéril varias veces hasta eliminar por completo la tinción.

Una vez eliminada la tinción, se dejaron secar las membranas y se preparó el tampón de bloqueo, compuesto por TBS 1X y leche desnatada en polvo (Central Lechera Asturiana) al 3% (p/v). Las membranas se incubaron en esta solución durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación suave de 100 rpm sobre un agitador orbital. A continuación, se realizaron 3 lavados de la membrana de 10 minutos cada uno en TBS 1X. El siguiente paso fue incubar la membrana durante 15 min en β-Glucosyl-Yariv o β-Mannosil-Yariv, ambos a una concentración de 150 µg/ml en NaCl al 1% en TBS 1X. Tras la incubación, la membrana se lavó 3 veces con TBS 1X durante 10 min para disminuir el *background* de la tinción. Tras observar coloración en la zona de las muestras, se digitalizaron las membranas en un escáner Hewlett Packard 6100C.

3.11.3 Técnica de *western blot* para la detección de proteínas específicas

Los experimentos de *western blot* se realizaron durante una estancia de 4 semanas en el *Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR1318 INRA-AgroParisTech*, en Versalles (Francia), en el grupo de "Senescencia, autofagia, reciclaje de nutrientes y eficiencia en el uso de nitrógeno" dirigido por la Dra. Celine Masclaux-Daubresse.

3.11.3.a Preparación de tampón de extracción

Se preparó el tampón de extracción, compuesto por 30 Mm Tris-HCl 30 pH 8,8, 7M urea, 2 M tiourea, 20 mM DTT, CHAPS al 4% (p/v), tritón al 0,2% (p/v), cOmplete^{TM} inhibitor cocktail (Roche) 1X y polivinilpolipirrolidona (PVPP) al 1,5% (p/v) en agua Mili-Q. La solución se guardó a 4^{o}C hasta el momento de ser utilizada.

3.11.3.b Extracción de proteínas totales

En primer lugar, se procedió al homogeneizado de 50 mg de muestra utilizando un mortero de porcelana (Haldenwanger) y nitrógeno líquido. Una vez que la muestra quedó completamente pulverizada se recogió en un eppendorf de 1,5 ml y se añadió un volumen de 125 µl de tampón de extracción. Los tubos se dejaron en hielo durante 3-5 minutos, alternándose con vórtex a máxima potencia para favorecer la lisis del material. A continuación, las muestras se centrifugaron a 20.000 rpm durante 15 min a 4^{o}C en una centrífuga de mesa Eppendorf MiniSpin®. Se recogió el sobrenadante (el cual contiene el total de proteínas extraídas) en un nuevo eppendorf de 1,5 ml y se mantuvo en hielo para continuar con el experimento o se almacenó a -20^{o}C hasta el momento de su uso.

3.11.3.c Determinación de la concentración de proteínas totales

Para determinar la concentración de proteínas totales en la muestra se utilizó el kit 2D Quant kit (Ge Healthcare), empleando albúmina de suero bovino (BSA) como patrón de calibración.

El ensayo se llevó a cabo en una en una placa Elisa multipocillo (Falcon), añadiendo a cada pocillo un volumen final de 200 µl, correspondiente a 10 µl de muestra y 190 µl del reactivo *working color reagent solution* del kit, todas las muestras se añadieron por

triplicado. Se dejó incubar la reacción a temperatura ambiente y en oscuridad durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a la lectura de la placa en un espectrofotómetro SPECTROstar Nano (BMG LABTECH), programado a una longitud de onda de 480 nm. Las lecturas se tomaron utilizando el tampón de extracción como blanco de las mediciones. La concentración de proteínas de las muestras se calculó extrapolando los valores de absorbancia de las muestras en la recta patrón de calibración con BSA, elaborada con concentraciones conocidas de entre 0,125 y 2 µg/µl.

3.11.3.d Separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS)

Para la separación de proteínas se siguió la técnica descrita por Laemmli (Laemmli 1970), utilizando un equipo Mini-Protean III (Bio-Rad). Esta técnica, permite separar las proteínas en función de su peso molecular, midiendo su movilidad a través de un gel de poliacrilamida usando un campo eléctrico (PAGE, *Polyacrylamide gel electroforesis*) y utilizando el detergente dodecil sulfato sódico (SDS, *Sodium dodecyl sulfate*) para desnaturalizar las proteínas y dotarlas de carga negativa. De esta manera, la carga original de la proteína no interfiere en la separación y migran a través del entramado de poliacrilamida desde el cátodo hacia el ánodo a una velocidad inversamente proporcional al peso molecular.

Preparación de geles de poliacrilamida con SDS

Los geles que se utilizaron para la separación de proteínas se componen de dos tipos de geles de poliacrilamida: el gel de separación y el gel de concentración.

El gel de separación es el más abundante, ocupando aproximadamente el 80% de la totalidad del gel de poliacrilamida. Se encuentra en la parte inferior formando el cuerpo del gel por donde migrarán y se separarán las proteínas. El gel de concentración supone el 20% restante del gel final y se localiza en la parte superior, en él se forman los pocillos donde se depositarán las muestras. Debido a que ambos geles pueden mezclarse fácilmente en estado líquido, deben prepararse por separado y esperar a la completa polimerización del primero antes de añadir el segundo. La composición de cada tipo de gel está detallada en la tabla 18, correspondiéndose las cantidades a las

necesarias para la preparación de un minigel con dimensiones aproximadas de 8 - 10 cm de ancho por 5-7 cm de largo y un espesor de 0,7-0,8 mm.

Tabla 18. Composición de geles de poliacrilamida.

Gel de separación			**Gel de concentración**	
% Acrilamida	**10%**	**12%**	**% Acrilamida**	**4%**
H_2O Mili-Q	4,0 ml	3,3 ml	H_2O Mili-Q	1,4 ml
Acrilamida al 30%	3,3 ml	4,0 ml	Acrilamida al 30%	0,33 ml
1 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	1 M Tris-HCl pH 6,8	0,25 ml
10% SDS	0,1 ml	0,1 ml	10% SDS	0,2 ml
10% APS	0,1 ml	0,1 ml	10% APS	0,2 ml
TEMED	0,004 ml	0,004 ml	TEMED	0,002 ml

Se utilizaron geles de separación con distinto porcentaje de acrilamida según el tipo de proteínas que fueran a separarse (geles 12% de acrilamida para separar proteínas de 20-40 KDa y con 10% de acrilamida para separar proteínas en torno a los 100 KDa de tamaño).

En primer lugar, se montaron todos los componentes de la cámara de electroforesis sobre el soporte, tal y como se indica en la figura 53. A continuación, se preparó el gel de separación mezclando los componentes en un tubo de 15 ml (Falcon) siguiendo el orden que se indica en la tabla18. En último lugar se añaden secuencialmente los catalizadores persulfato de amonio (APS, *Ammonium persulfate*) y N,N,N´,N´-tetrametiletilendiamina (TEMED), mezclando cada reactivo de manera uniforme en todo el volumen de la solución. Seguidamente, por un extremo y utilizando una pipeta de vidrio de 10 ml (Falcon) se añadió un volumen de 9-10 ml de la solución entre las placas de vidrio del *cassette*, sin sobrepasar la línea trazada que separa el espacio que deben ocupar ambos geles. Posteriormente, se añadieron 800 µl de isopropanol para cubrir la superficie del gel y lograr una correcta polimerización del mismo, en línea recta y sin burbujas.

El gel se dejó polimerizar a temperatura ambiente durante 15-30 minutos, dependiendo del porcentaje de acrilamida. Los geles con mayor porcentaje de acrilamida polimerizaron en menos tiempo. Una vez polimerizado el gel, se descartó el volumen de isopropanol y se lavó varias veces la parte superior del gel con agua

destilada hasta eliminar completamente los restos de isopropanol y de acrilamida no polimerizada.

A continuación, se preparó la solución correspondiente al gel de concentración con un 4% de acrilamida, mezclando cada componente en un nuevo tubo de 15 ml (Falcon) siguiendo el orden que se indica en la tabla 18. En último lugar se añadió el volumen de TEMED y APS y se mezcló invirtiendo varias veces el tubo, intentando que no se formasen demasiadas burbujas. Se añadieron aproximadamente 1-2 ml de la solución sobre el gel de separación ya polimerizado, sin importar que rebosara un poco de la estructura, y se colocó el peine entre ambos vidrios. Los restos de solución que llegaron a derramarse se limpiaron con papel de celulosa.

Se dejó polimerizar el gel a temperatura ambiente durante 15-30 minutos, usando como control de la polimerización la solución de acrilamida que quedó remanente en el tubo. Una vez polimerizado, se retiró el peine y se añadió agua Mili-Q a la parte superior del gel, y se guardó en posición vertical en una caja de plástico cerrada previamente forrada en el fondo con papel de celulosa humedecido. El gel se mantuvo dentro de la caja en una cámara a 4^{o}C hasta el momento de su uso.

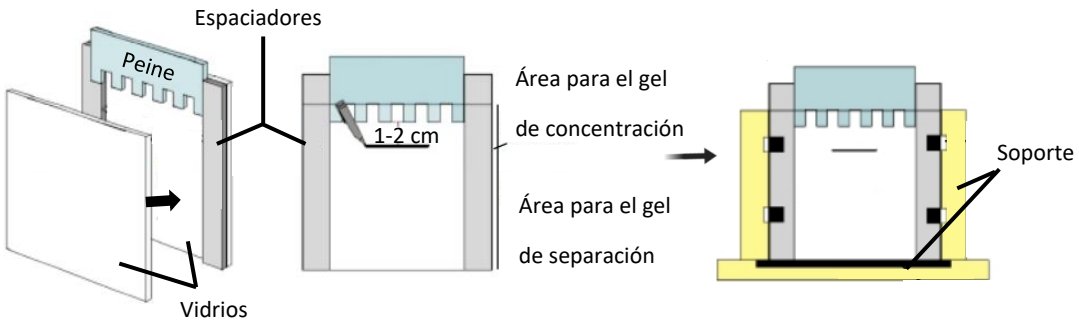


Figura 53. Montaje de la estructura para la preparación de un gel de poliacrilamida.

Separación de proteínas por PAGE-SDS

Se quitó cuidadosamente el peine del gel y se lavó cada uno de los pocillos con un chorro de agua destilada utilizando un frasco lavador, para asegurar que no se queden bloqueados por restos de acrilamida que impidan cargar la muestra. A continuación, se introdujo el gel en la cubeta de electroforesis, previamente enjuagada con agua osmotizada, y se rellenó tanto la cubeta como el espacio donde está colocado nuestro

gel con tampón de electroforesis 1X (25 mM de Tris-HCl pH 8,3, 192 mM de glicina y SDS al 0,1% (p/v), tal y como se muestra en la figura 54.

A continuación, se prepararon las soluciones de carga de las distintas muestras partiendo de un volumen de extracto correspondiente a 5 µg de proteína extraída y un 25% de solución de loadding buffer (LB) (1,25 M Tris-HCl al 20% (v/v) pH 6,8, SDS al 20% (v/v) y Glycerol al 40% (v/v), en agua Mili-Q) a la que se añadió 355 M β-Mercaptoetanol al 10% (v/v) (LB + β-merc (10%) y 1 µl de azul de bromofenol), en un volumen final de 20 µl completado con agua Mili-Q.

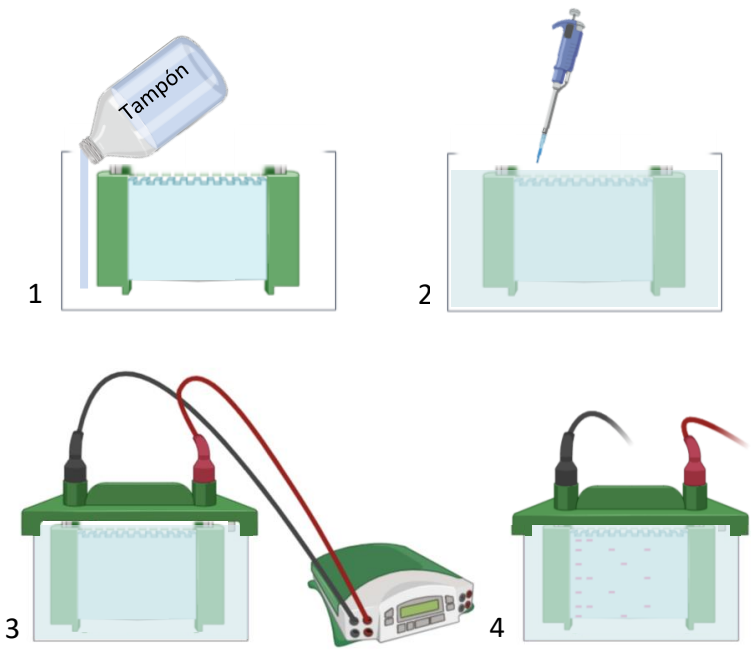


Figura 54. PAGE-SDS. **(1)** Colocación del gel de poliacrilamida en la cubeta de electroforesis y llenado con tampon de electroforesis. **(2)** Carga de las muestras. **(3)** Conexión de la cubeta a la fuente de alimentación. **(4)** Proteínas corridas en el gel en función de su peso molecular.

Se cargó el gel añadiendo en cada pocillo 20 µl de muestra o 5 µl del marcador de pesos moleculares PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). Una vez cargado el gel, se cerró la cubeta de electroforesis, se conectaron los electrodos a la cubeta y a la fuente de alimentación y se aplicó una corriente eléctrica constante de 150 V durante 1-2 h, dependiendo de las características que tuvieran las proteínas que se querían separar.

En todos los geles se cargó como control positivo una muestra procedente de hoja de *Arabidopsis thaliana*, de la que se conocía de antemano el nivel de expresión de la proteína de interés (muestra proporcionada por el grupo de la Dra. Céline Masclaux Daubresse).

3.11.3.e Transferencia de proteínas e inmunodetección

Transferencia electroforética de las proteínas (*electroblotting*)

Una vez separadas las proteínas en el gel, éstas se trasfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, *Polyvinylidene fluoride*) TransBlot® Turbo™ (Bio-Rad) por transferencia húmeda, utilizando el sistema de transferencia Trans-Blot ®Turbo™ Transfer System (Bio-Rad) y un tampón de transferencia compuesto por 48 mM de Tris-HCl, 39 mM de glicina, SDS al 0,037% (p/v) y metanol al 5% (v/v).

Primero se cortó la parte correspondiente al gel de concentración con ayuda de una espátula, y se desechó. El resto del gel se colocó en una cubeta con agua Mili-Q cubriéndolo por completo.

A continuación, se prepararon los componentes del "sándwich". Se activó la membrana de PVDF con etanol absoluto (Merck) durante 5 seg y seguidamente se mantuvo en buffer de transferencia durante 3-5 min. También se empaparon en el tampón de transferencia varios papeles Whatman de 8,5 cm x 13,5 cm Trans-Blot ®Turbo™ (Bio-Rad). Se montó el "sándwich" tal y como se muestra en la figura 55. En la base del *cassette* se colocaron 2 papeles Whatman, a continuación, se colocó la membrana y encima de ésta el gel, sobre el que se colocaron otros 2 papeles Whatman.

A cada una de las capas que forman el "sándwich", exceptuando la membrana, se les pasó suavemente un rodillo en el momento de colocarlas en la estructura con el fin de eliminar cualquier pequeña cámara de aire entre esta capa y la anterior, lo cual dificultaría la transferencia de proteínas.

Por último, se colocó la parte superior del *cassette* y se cerró la estructura. Se eliminó el exceso de líquido de la estructura, volcándola cuidadosamente y se colocó en sistema de transferencia Trans-Blot ®Turbo™ Transfer System (Bio-Rad), programado a 23 V durante 5 min. Las proteínas migraron desde el cátodo hacia el ánodo,

transfiriéndose desde el gel a la membrana. Es muy importante mantener húmeda la membrana en todo momento una vez realizada la transferencia.

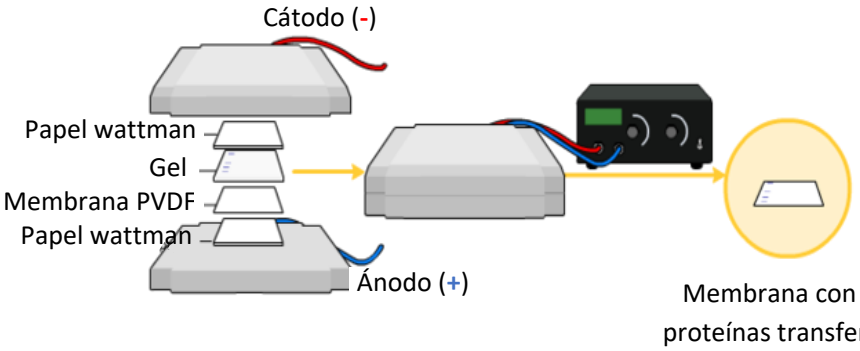


Figura 55. Transferencia húmeda de las proteínas desde el gel a la membrana (*electroblotting*).

Inmunodetección

Una vez finalizada la transferencia, la membrana se incubó en una solución de bloqueo (leche desnatada en polvo al 5% (p/v) y 0,1% de Tween-20 (v/v), en PBS 1X) durante toda la noche (overnight), a 4ºC y en agitación suave.

Transcurrido el tiempo de incubación, se lavó la membrana 3 veces durante 10 min con una solución de PBS 1X + 0,1% de Tween-20 (v/v) (PBS-T). A continuación, se incubaron las membranas con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 16) durante 90 min, a temperatura ambiente y en agitación suave. La dilución del anticuerpo se preparó con una solución de leche desnatada en polvo al 5% (p/v) en PBS-T. Tras la incubación, se lavaron las membranas con PBS-T, realizándose dos lavados rápidos de 1 min y tres lavados largos de 10 min cada uno.

Seguidamente, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (Tabla 19) a una concentración 1:10.000 durante 1h a temperatura ambiente y protegida de la luz. Finalmente se hicieron dos lavados de 1 min y tres lavados de 10 min cada uno con PBS-T, y se procedió al revelado de la membrana.

Tabla 19. Anticuerpos secundarios empleados en *western blot*.

Anticuerpo	Enzima conjugada	Concentración	Referencia
Anti-IgG de conejo	HRP	1:10.000	Sigma
Anti-IgG de cabra	HRP	1:10.000	Sigma

Revelado de la inmunodetección

Para la detección de la reacción antígeno-anticuerpo en la membrana, se empleó un método de quimioluminiscencia que utiliza luminol. El anticuerpo secundario está conjugado con la enzima peroxisasa de rábano (HRP, *Horseadish peroxidase*), la cual en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) cataliza la oxidación del luminol presente en el tampón de revelado, produciéndose una emisión de luz directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la membrana (Fig. 56).

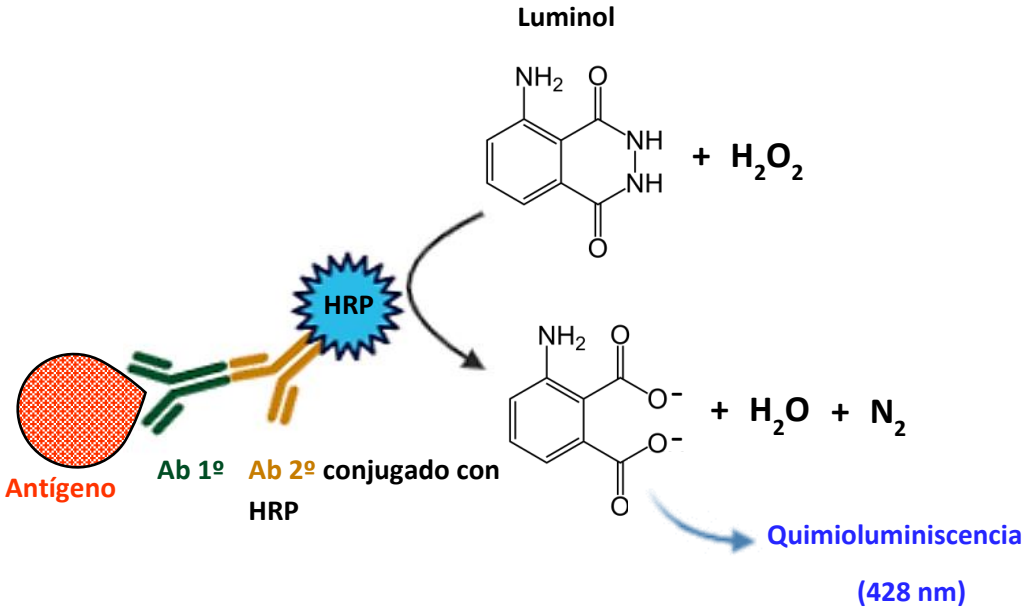


Figura 56. Inmunodetección y revelado de *western blot*.

Para llevar a cabo el revelado, el primer paso fue sacar la membrana del último lavado en PBS-T y apoyar cuidadosamente uno de los extremos sobre papel secamanos, para eliminar el exceso de solución por capilaridad. A continuación, se colocó la membrana sobre una lámina de acetato completamente seca, previamente lavada con agua Mili-Q y etanol absoluto (Merck). Seguidamente se preparó la solución de revelado

a partir del kit comercial Amersham™ ECL Select™ (GE Healthcare), añadiendo luminol y H_2O_2 a partes iguales (v/v), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cubrió la membrana con la solución y se dejó incubar durante 5 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente se eliminó el exceso de solución de revelado, se cubrió la membrana con otra lámina de acetato y se introdujo en un lector ImageQuant™ LAS-400 (GE Healthcare Life Science) para la visualización de quimioluminiscencia a 428 nm. Se tomaron fotografías de la membrana con la cámara CCD del equipo, a intervalos de 10 seg, tras tiempos de exposición de 1 seg hasta 5 min dependiendo de la intensidad de señal observada.

Tinción con azul brillante de Coomassie

Una vez revelada la inmunodetección, se realizaron 3 lavados de la membrana de 10 min cada uno con PBS-T. A continuación, se realizó una tinción con azul brillante Coomassie R-250 (Bio-Rad) como control para verificar que se cargó la misma cantidad de proteínas de todas las muestras.

Se preparó una solución de azul brillante de Coomassie al 0,25% (p/v), ácido acético al 20% (v/v) e isopropanol al 20% (v/v) en agua Mili-Q. La membrana se dejó incubando en esta solución durante 1h a temperatura ambiente y agitación suave. A continuación, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con una solución de decoloración compuesta por etanol al 10% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) en agua Mili-Q. La membrana se fotografió con una cámara CCD ImageQuant™ LAS-400 (GE Healthcare Life Science).

3.12 DETECCIÓN DEL PERFIL DE CISTEÍN PROTEASAS ACTIVAS MEDIANTE LA TÉCNICA ABPP (*ACTIVITY BASED PROTEIN PROFILING*)

Esta técnica se llevó a cabo durante una estancia de 4 semanas en el *Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR1318 INRA-AgroParisTech*, en Versalles (Francia), en el grupo de "Senescencia, autofagia, reciclaje de nutrientes y eficiencia en el uso de nitrógeno" dirigido por la Dra. Celine Masclaux-Daubresse.

3.12.1 Extracción y cuantificación de proteínas solubles

Se procedió a la extracción de proteínas solubles de la muestra, siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.11.1.b, utilizando como tampón de extracción una solución de PVPP al 1,5% (p/v) en agua Mili-Q.

La concentración de proteínas totales de cada muestra se determinó con el kit 2D Quant kit (Ge Healthcare), empleando BSA como patrón de calibración tal y como se detalla en el apartado 3.11.1.c.

3.12.2 Tratamiento de las muestras con DCG-04

Para detectar el perfil de cisteín proteasas activas de las muestras se utilizó DCG-04 (van der Hoorn *et al*., 2004), cuya síntesis se detalla en el trabajo de Greenbaum *et al*. (2000). El DCG-04 es un compuesto que se une con una alta afinidad a la forma activa de cisteín proteasas, y al que se ha incorporado un residuo de lisina biotinilada de cadena lateral (Fig. 57).

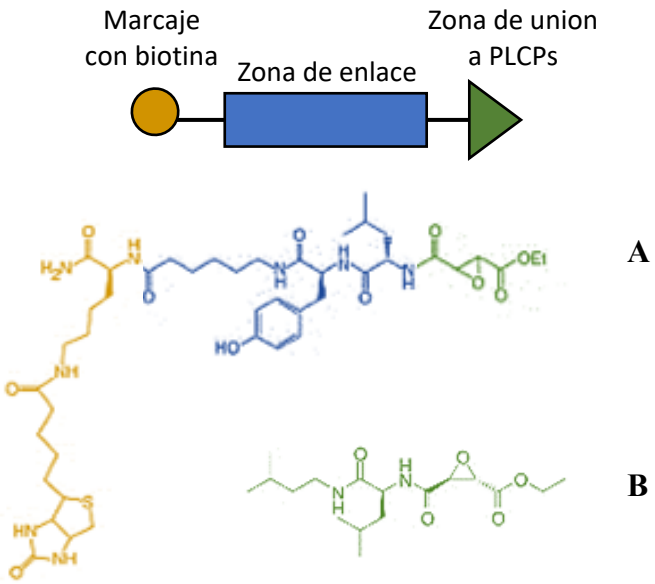


Figura 57. (A) Estructura molecular del DCG-04. **(B)** Estructura molecular del E-64d.

La biotina es una molécula estable y relativamente pequeña que se une de forma no covalente a la estreptavidina (una proteína aislada de *Streptomyces avidinii*). Esta

interacción ocurre con alta afinidad y se usa para la amplificación de señal en inmunoensayos.

Se preparó un volumen final de reacción de 40 µl, el cual se compuso de 40 µg de las proteínas extraídas de la muestra, 50 mM de acetato de sodio (NaAc) pH 5,5, 2 mM de ditiotreitol (DTT) y 5 µM de DGC-04, en agua Mili-Q. Los tubos se incubaron durante 150 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se paró la reacción añadiendo un 25% (v/v) de una solución de *loading buffer* (LB) (1,25 M Tris-HCl al 20% (v/v) pH 6,8, SDS al 20% (v/v) y Glycerol al 40% (v/v), en agua Mili-Q y β-mercaptoetanol al 10% (v/v). Las muestras se mantuvieron a 4^{o}C para continuar con el experimento o a -20^{o}C si en ese momento no se iba a continuar trabajando con ellas.

Controles de especificidad del ensayo

Al mismo tiempo, se llevaron a cabo distintos controles para probar la especificidad del ensayo (Fig. 58).

Se utilizó como control positivo una muestra de hoja de *Arabidopsis thaliana* (proporcionada por el grupo de la Dra. Céline Masclaux Daubresse), de la que se conocía de antemano su perfil de PLCPs activas.

Otro de los controles consistió en preparar una reacción adicional en la que los 40 µg del extracto de proteína consistieron en una mezcla de todos los extractos de proteína de las muestras analizadas, donde todas las muestras contribuyeron de manera igualitaria a la concentración final del extracto.

También se llevó a cabo un control de competencia, mediante la inhibición competitiva de DCG-04 por la presencia del compuesto E-64d. El E64d es un inhibidor de PLCPs que presenta en su estructura una cadena lateral de leucina imitando al sustrato de la enzima, de esta manera ocupa el sitio de unión entre la cisteína y la proteasa de manera irreversible. El ensayo consistió en un pre-tratamiento de las muestras con una solución 100 µM de E-64 en DMSO (Sigma) durante 30 min, justo antes de añadir la solución con DCG-04.

Debido a la similitud de las estructuras de los compuestos E-64d y DCG-04 (Fig. 57), la incubación con E-64d bloqueó cualquier sitio de unión al que pudiera unirse DCG-04 y por tanto no se observó señal quimioluminiscente tras el revelado del ensayo de inmunodetección.

Al mismo tiempo se realizó un control negativo en el que no se añadió DCG-04 a la reacción (NPC*, No Probe Control*), siendo sustituido por DMSO. Al igual que en el control con el inhibidor, tampoco se observó ninguna señal en el revelado de la membrana.

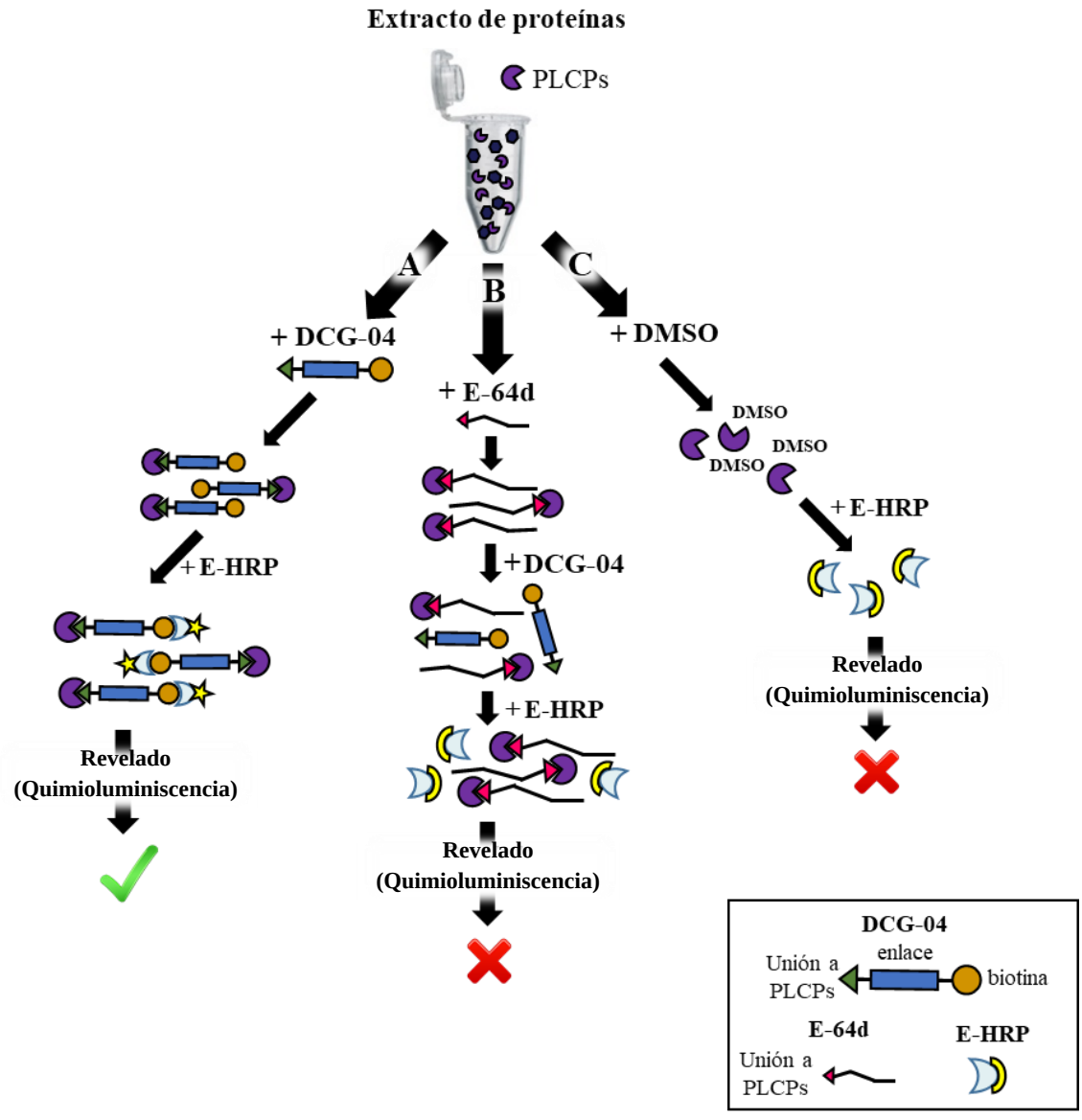


Figura 58. Inmunodetección de la actividad ABPP de PLCPs. **(A)** Incubación de las muestras con DCG-04. **(B)** Control con E-64d + DCG-04. **(C)** Control sin DCG-04. Estreptavidina conjugada con HRP (E-HRP).

3.12.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS)

Se incubaron todas las muestras (extractos de proteínas con DCG-04 y controles) a 90ºC durante 10 min para desnaturalizar las proteínas y separarlas en función de su peso molecular mediante PAGE-SDS, tal y como se describe en el apartado 3. 11.3.d. Para este ensayo se utilizaron geles de poliacrilamida al 12%, debido a que los pesos moleculares de las proteasas de cisteína se sitúan en torno a los 20-40 KDa. En cada pocillo se cargó un total de 10 µg.

3.12.4 Ensayo de *westen blot* (transferencia de proteínas e inmunodetección)

A continuación se procedió a la transferencia de proteínas desde el gel de poliacrilamida a una membrana de PVDF mediante la técnica de electroblotting utilizando el sistema de transferencia Trans-Blot ®Turbo™ (Bio-Rad), tal y como se describe en el apartado 3.11.3.e.

Una vez transferidas las proteínas en la membrana, se llevó a cabo el ensayo de inmunodetección. En primer lugar, se incubó la membrana en una solución de bloqueo (1% de BSA (p/v) en PBS-T) *overnight*, a temperatura ambiente y en agitación suave. A continuación, se lavó la membrana 3 veces durante 10 min con una solución de PBS-T, y se incubó con estreptavidina-HRP a una dilución 1:20.000 en PBS-T (0,1%) durante 1 h a temperatura ambiente, en agitación suave y en oscuridad. La estreptavidina es una proteína que se une a biotina con alta afinidad, y se añadió en estado conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) para la detección por quimioluminiscencia. Al finalizar la incubación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con solución PBS-T y se procedió al revelado de la inmunodetección. Para el revelado se utilizó el kit comercial Amersham™ ECL Select™ (GE Healthcare), añadiendo luminol y H_2O_2 a partes iguales (v/v), siguiendo las instrucciones del fabricante. La señal quimioluminiscente, debida a la actividad peroxidasa de la HRP, se observó en un ImageQuant™ LAS-400 (GE Healthcare Life Science). Tanto para el revelado como para la adquisición de imágenes de la membrana se siguió la metodología descrita en el apartado 3.11.3.e.

Una vez adquiridas las imágenes de la inmunodetección, se realizaron 3 lavados de la membrana de 10 min cada uno con la solución PBS-T y se procedió a teñir la

membrana con azul brillante Coomassie R-250 (Bio-Rad), como control para verificar que se cargó la misma cantidad de proteínas de todas las muestras. El procedimiento de la tinción se detalla en el apartado 3.11.3.e.

3.13 INMUNOPRECIPITACIÓN DE PLCPs ACTIVAS Y ANÁLISIS PROTEÓMICO

Estos experimentos se realizaron durante uma estancia de 4 semanas en el *Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR1318 INRA-AgroParisTech*, en Versalles (Francia), en el grupo de "Senescencia, autofagia, reciclaje de nutrientes y eficiencia en el uso de nitrógeno" dirigido por la Dra. Celine Masclaux-Daubresse.

Para identificar las PLCPs activas presentes en las muestras, se llevó a cabo un ensayo de inmunoprecipitación por afinidad o *pull-down*, el cual permite precipitar de forma selectiva proteínas de interés contenidas en una solución proteica compleja. La metodología consiste en incubar el extracto proteico con un compuesto ligado a biotina (en este caso DCG-04, compuesto de unión específica a PLCPs activas), con el fin de biotinilizar la proteína de interés. Esta biotinilización permite el aislamiento de las proteínas de interés por afinidad con perlas de avidina o estreptavidina, que más tarde son eliminadas de la muestra para no interferir en la separación por PAGE-SDS. Más adelante se llevaron a cabo análisis proteómicos para la identificación de PLCPs activas presentes en la muestra.

3.13.1 Extracción de proteínas solubles

En primer lugar, se procedió a la extracción de proteínas solubles de la muestra de interés, siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.11.1.b, utilizando como tampón de extracción una solución de PVPP al 1,5% (p/v) en agua Mili-Q. Se midió la concentración de proteínas totales de la muestra utilizando el kit 2D Quant kit (Ge Healthcare), empleando BSA como patrón de calibración tal y como se detalla en el apartado 3.11.1.c.

3.13.2 Biotinilación de PLCPs activas

Se trataron un total de 2,5 mg de proteínas con una solución 50 mM de acetato de sodio (NaAc) pH 5,5, 2 mM de DTT y 5 µM de DGC-04 biotinilado (de unión específica a PLCPs activas) en agua Mili-Q. La reacción se incubó durante 150 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se paró la reacción añadiendo un 25% (v/v) de solución LB + β-merc (10%) y se mantuvo la muestra a 4ºC para continuar con el ensayo. En caso de necesitar almacenarla para más adelante, se puede congelar a -20ºC hasta el momento de su uso.

3.13.3 Ensayos de *pull-down* de proteínas biotiniladas

Tras el marcaje con DCG-04 biotinilado, se procedió a purificar las proteínas biotiniladas siguiendo la metodología descrita por Chandrasekar *et al*. (2014), a excepción de utilizar avidina (A9207 Sigma-Aldrich) en lugar de estreptavidina en el ensayo.

3.13.3.a Precipitación de las proteínas

Para precipitar las proteínas contenidas en la muestra, se incubó 1 ml de muestra en una solución a 4ºC de cloroformo (Merck) metanol (Merck) y agua Mili-Q en proporción 4:1:3 (v/v) y se aplicó vórtex a máxima potencia durante 1-3 min, hasta observar la precipitación de las proteínas. Es importante que la solución esté fría para evitar que las proteínas se disuelvan en el metanol. A continuación, se centrifugó el tubo a 4.000 rpm durante 5 min a 4ºC. Tras la centrifugación, se obtuvieron tres fases correspondientes al metanol (en la parte superior), las proteínas (suspendidas formando una capa intermedia) y el cloroformo (en la parte inferior). El siguiente paso consistió en descartar con mucho cuidado el metanol de la muestra. Una vez eliminado el metanol, se hizo un movimiento rápido de giro del tubo para que fracción de proteínas quedase adherida a la pared del mismo, y se eliminó con cuidado el volumen correspondiente al cloroformo. Seguidamente, se dejó el tubo abierto en la cabina de flujo durante 5 min con el fin de evaporar cualquier resto de cloroformo, vigilando que no se secase el *pellet* de proteínas. Trascurrido este tiempo, se añadieron 2 ml de una solución de SDS al 1,2% en PBS 1X y se aplicó vórtex a máxima potencia durante 1-3 min hasta que se observó la

completa disolución del *pellet*. A continuación, se incubó la solución en un baño termostático a 95ºC durante 10 min, seguida de una incubación de 5 min a temperatura ambiente. En este momento es posible congelar las muestras a -20ºC en el caso de no continuar con el ensayo en el mismo día, debiendo incubarlas de nuevo a 95ºC y RT en el momento que se vuelvan a utilizar.

3.13.3.b Pre-equilibrado de las perlas de avidina

En un tubo de 1,5 ml (eppendorf) se añadió un volumen de 100 µl de avidin-agarosa (A9207 Sigma-Aldrich) procedente de clara de huevo y 1 ml de una solución de SDS al 0,2% en PBS 1X. Tras homogeneizar la solución por pipeteo, se incubó el tubo en un agitador rotativo de tipo noria durante 10 min a RT y se descartó el sobrenadante. Se volvió a añadir 1 ml de SDS al 0,2% en PBS 1X, repitiendo el procedimiento hasta un total de 4 veces.

13.3.3. Incubación de las proteínas precipitadas con la solución de pre-equilibrado de avidina

Se diluyó la muestra de proteínas precipitadas en un volumen de 10 ml de PBS 1X, para obtener una solución con una concentración del 0,2% de SDS en PBS 1X. A continuación, se añadieron 100 µl de la solución de pre-equilibrado de perlas de avidina y se incubó en la noria a temperatura ambiente durante 2 h. Finalizada la incubación, se centrifugó la muestra a 3.000 rpm durante 3 min y se descartó el sobrenadante (o se guardó en el caso de tener sospechas de que pudiese haber ido algo mal en este último paso y tener la necesidad de repetirlo). A continuación, se procedió al lavado del *pellet* con 5 ml de una solución de SDS al 1,2% en PBS 1X (x3 veces), 5 ml de una solución de SDS al 1% en PBS 1X (x3 veces), 10 ml de PBS 1X (x3 veces) y 10 ml de agua Mili-Q (x1 vez). Cada lavado consistió en incubar la muestra en noria durante 10 min en la solución correspondiente, seguida de una centrifugación a 3.000 rpm durante 3 min y posterior eliminación del sobrenadante. Es importante lavar las perlas de avidina con una solución de porcentaje en SDS cada vez menor, para evitar que éste dificulte la unión posterior avidina-biotina en nuestra muestra. En el último lavado, se eliminaron 9 de los 10 ml de agua Mili-Q del sobrenadante y el 1 ml restante se traspasó a un tubo de 1,5 ml

(Eppendorf). Este tubo se centrifugó a 3.000 rpm durante 3 min, tras lo cual se descartó cualquier resto de sobrenadante. Posteriormente, se resuspendió el precipitado en 30 µl de una solución de LB + β-mercaptoetanol (10%), y se incubó a RT durante 15 min, seguida de una incubación a 95ºC durante 15 min. Tras la última incubación, se centrifugó la muestra a 14.000 rpm durante 1 min a RT y se recogió el sobrenadante en un nuevo tubo. El precipitado del tubo anterior no se descartó, sino que volvió a incubarse en 30 µl de LB + β-merc (10%), repitiéndose el mismo procedimiento y añadiendo el sobrenadante obtenido al tubo que ya contenía el primer sobrenadante. Se llevaron a cabo por tanto dos eluciones de la muestra, obteniendo un volumen final de 60 µl de solución.

Para asegurar el correcto desarrollo del experimento, se tomaron alícuotas en diferentes puntos del ensayo de *pull-down* a las que se les añadió un 25% de la LB + β-merc (10%), y se mantuvieron a -20ºC hasta el momento de su uso como controles del experimento.

3.13.3.d Separación de las proteínas por PAGE-SDS

Se procedió a la separación de las proteínas PLCPs activas de la muestra, mediante PAGE-SDS en geles de poliacrilamida al 12%. También se cargaron en el gel todas las alícuotas control del experimento de *pull-down*, lo que demostró la correcta ejecución del ensayo.

3.13.3.e Tinción del gel de poliacrilamida y extracción de bandas

Una vez separadas las proteínas, se realizó sobre el gel una tinción de nitrato de plata utilizando el kit PlusOne™ Silver Staining Kit (GE Heathcare), siguiendo las instrucciones del fabricante. La coloración del gel por la unión del nitrato de plata a las proteínas se digitalizó utilizando un scanner de sobremesa, adquiriendo la imagen a 16 y 48 bits en escala de grises.

A continuación, se seleccionaron un total de 7 bandas del gel situadas en la franja de los 20-40 KDa de peso molecular y correspondientes a las observadas en el ensayo de *western blot* para la actividad ABPP de PLCPs. Las bandas se cortaron y extrajeron cuidadosamente con ayuda de unas pinzas y un bisturí, y se guardaron individualmente

en tubos eppendorf de 0,5 ml. Los tubos se mantuvieron a -20ºC hasta que fueron enviados para el análisis proteómico.

3.13.4 Análisis proteómico: identificación de PLCPs activas mediante HPLC-MS/MS

El análisis proteómico de las bandas fue realizado por la plataforma PAPSO (Plateforme d'Analyse Protéomique Paris Sud-Ouest. Génétique Quantitative et Évolution - Le Moulon INRA - Université Paris-Sud - CNRS – AgroParisTech Ferme du Moulon. 91190 Gif sur Yvette. http://pappso.inra.fr/), para los posteriores análisis proteómicos.

Las distintas bandas extraídas del gel fueron digeridas y analizadas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS, *High performance liquid chromatography with tandem mass espectrometry*). La digestión de las proteínas de las bandas se llevó a cabo con el sistema Progest (Digilab, Proteomic Solutions). A continuación, los extractos peptídicos se analizaron por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, *High performance liquid chromatography*) utilizando un equipo cromatográfico Ultimate 3000 RSLCnano (ThermoFinnigan). Por último, los péptidos eluídos, se analizaron con un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap discovery (Thermo Finnigan), utilizando una interfaz de nanoelectrospray. El protocolo del ensayo está detallado en el anexo 3 del trabajo de Havé *et al*. (2018).

A continuación, se procedió al análisis de los datos proteómicos obtenidos. Las proteínas identificadas se filtraron y agruparon utilizando el programa X!Tandem Pipeline (Versión 3.4.2) en base a los siguientes criterios:

- Se consideró necesario un mínimo de dos péptidos diferentes en los casos en los que el E-valor fuese menor que 0.01.

- El E-valor de la proteína debía ser menor que 10^{-5}.

3.14 ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PECTINMETILESTERASA

3.14.1 Preparación del tampón de extracción

Se preparó la solución del tampón de extracción compuesto por Tris-HCl 25 mM pH 7,2, ácido trans-1,2-diaminociclohexano-N, N, N´N´-tetracético (CDTA, *trans-1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid*) 50 mM, 1,4-ditiotreitol (DTT) 25 mM y polivinilpirrolidona (PVPP) al 1,5% (p/v) en agua Mili-Q. La solución se guardó a 4ºC hasta el momento de ser utilizada.

3.14.2 Extracción y cuantificación de proteínas totales

En primer lugar, se procedió al homogeneizado de 100 mg de muestra, utilizando un mortero de porcelana (Haldenwanger) pre-enfriado a -20ºC y nitrógeno líquido. Una vez que la muestra quedó completamente pulverizada se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1-2 minutos y se añadió un volumen de 60 µl de tampón de extracción (Apartado 3.11.1.a). La papilla resultante se transfirió a un eppendorf de 1,5 ml y se dejó en hielo durante 10-15 minutos, alternándose con vórtex a máxima potencia para favorecer la lisis del material.

A continuación, se centrifugó la muestra a 7.000 rpm a 4ºC durante 10 minutos en una centrífuga de mesa Eppendorf MiniSpin®. Tras la centrifugación, las proteínas extraídas quedaron en la fracción del sobrenadante, el cual se recogió en un nuevo eppendorf de 1,5 ml.

A continuación, se procedió a determinar la concentración de proteínas totales de la muestra utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976), empleando albúmina de suero bovino (BSA) como patrón de calibración (Apartado 3.11.1.c).

3.14.3 Preparación de los reactivos

Se preparó una solución stock de sustrato utilizando pectina (Sigma, procedente de piel de cítrico, ref. P-9135) al 5% (p/v) en agua destilada autoclavada. También se preparó una solución stock de la enzima alcohol oxidasa (AO) (Sigma, ref. A2404) 0.1 U/µl, una solución stock de la enzima formaldehido deshidrogenasa (FDH) (Sigma, ref. F1879) 0,5 U/µl y una solución stock de NAD (nicotinamida adenina dinucleótido) (Sigma, ref. N8410) 0,4 mM, todas ellas en buffer fosfato 100 mM, pH 7,5.

3.14.4 Ensayo de actividad pectinmetilesterasa

En primer lugar, se ajustaron todas las muestras a una concentración final de proteína de 1 mg/ml y, a continuación, se realizó el ensayo de actividad enzimática PME basado en tres reacciones: I) La actividad PME produce liberación de metanol; II) oxidación del metanol por la actividad alcohol oxidasa (AO); y III) la consiguiente oxidación del paraformaldehido por la actividad de la enzima formaldehido deshidrogenasa (FDH) que produce NADH. Por tanto, la liberación de metanol mediada por PME es equimolar con el NADH formado en la reacción acoplada (Fig. 59).

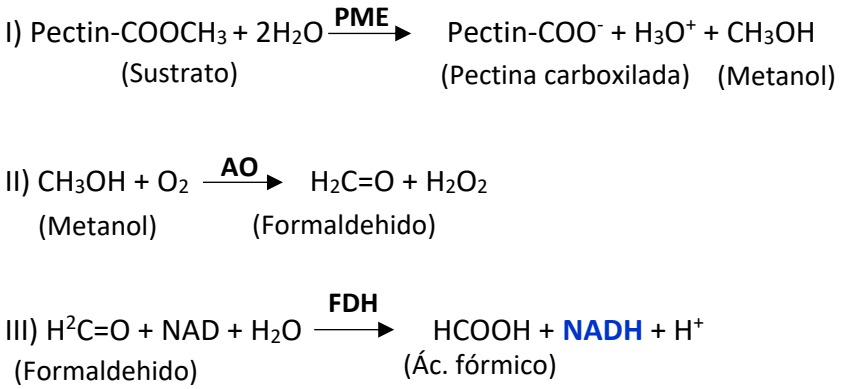


Figura 59. Esquema de las sucesivas reacciones químicas llevadas a cabo en el ensayo espectrofotométrico acoplado para la detección de actividad PME.

El ensayo se llevó a cabo en una placa Elisa multipocillo (Falcon) según se describe en el trabajo de Levesque-Tremblay *et al*. (2015). A cada pocillo se le añadió un volumen final de 190 µl correspondientes a 10 µl de la muestra y 180 µl de la solución compuesta por 156µl de NAD 0,4 mM, 2 µl de AO (0.2 U), 2 µl de FDH (1 U) y 20 µl de la solución de stock de pectina al 5%. La muestra se añadió en último lugar para controlar el inicio de la reacción e inmediatamente se llevó a cabo la lectura de la placa en un espectrofotómetro Multiskan™ Sky Microplate UV/Vis (ThermoFisher Scientific), programado a una longitud de onda de 340 nm (absorbancia del NADH). Todas las muestras se analizaron por duplicado. Los valores de absorbancia para cada muestra se transformaron en picomoles de NADH producidos por minuto teniendo en cuenta el total de miligramos de proteína de partida (pmol/min/mg).

3.15 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FITOHORMONAS

Se llevó a cabo la extracción y posterior cuantificación de fitohormonas de muestras de distintos estadios del desarrollo embriogénico de *B. napus* y *H. vulgare*, y del desarrollo del polen de *B. napus*. Las muestras para el ensayo fueron recogidas y almacenadas a -80^{o}C siguiendo la metodología indicada en el apartado 3.7.1 y 3.7.2.

De todas las fitohormonas cuantificadas, y como objetivo de esta tesis, el estudio se focalizó en el análisis de auxinas y citoquininas.

AUXINAS

En el caso de la auxina, se procedió la extracción de fitohormonas totales en el laboratorio, siguiendo el protocolo facilitado por el Dr. Aurelio Gómez Cadenas (*Universitat Jaume I*, Castellón) cuyo grupo de investigación se encargó de la posterior cuantificación hormonal mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray (LC-ESI-MS/MS) de las muestras.

En primer lugar, se pesó un total de 100 mg de cada muestra y se añadieron a tubos de centrífuga de 12 ml acoplables a una centrífuga Sorvall™ LYNX™ (ThemoFisher). Para extraer las fitohormonas totales de la muestra se utilizó una solución de estándar interno proporcionada por el grupo del Dr. Aurelio Gómez Cadenas, compuesta por 5 ng de [^{2} H_2] AIA (ácido indol-3- acético) obtenido de Isotech (Sigma-Aldrich), 100 ng de [$^{2}H_6$] ABA (ácido abscísico) (sintetizado según se describe en el trabajo de Gómez-Cadenas *et al*. (2002)) y 100 ng de [$^{2}H_6$] JA (ácido jasmónico) (sintetizado según se describe en el trabajo de Miersch (1991)).

A cada tubo con la muestra se le añadió un volumen de 25 µl de estándar interno y 5 ml de agua destilada, y se procedió a su homogeneizado durante 1-2 min utilizando un homogeneizador de tejidos Ultra-Turrax (Ika-Werke) programado a máxima velocidad. Se tuvo especial cuidado en limpiar el homogeinizador con acetona pura (Merck) y posteriormente con agua destilada, para evitar contaminación cruzada entre las muestras.

Una vez homogeneizadas las muestras, hasta el punto de obtener una papilla completamente homogénea, se procedió a centrifugar los tubos a 4.000 rpm durante

45 min a 4ºC en una centrífuga Sorvall™ LYNX™ (ThemoFisher). A continuación, se recogió el sobrenadante y, con mucho cuidado de no coger nada de precipitado en el pipeteo, se trasvasó a un tubo de 50 ml (Falcon). Seguidamente se procedió a medir su pH utilizando un pH-metro de sonda fina y se acidificó la solución hasta alcanzar un pH de 3, añadiendo la cantidad necesaria de ácido acético (Merck) al 30% en agua destilada.

El siguiente paso consistió en hacer la partición líquido-líquido de la muestra, añadiéndole el mismo volumen de dietiléter (Panreac) y mezclando enérgicamente con ayuda de un vórtex programado a máxima potencia. Una vez mezclados por completo todos los componentes, el tubo se centrifugó a 2.000 rpm durante 10 min a 4ºC en una centrífuga basculante 5702 RH (Eppendorf).

Tras la centrifugación, se observaron 3 fases en el tubo: una fase superior (dietiléter con hormonas), una fase intermedia (precipitado con restos de tejidos) y una fase inferior acuosa. Con ayuda de una pipeta Pasteur, se recogió la fase superior del sobrenadante correspondiente al dietiléter con las hormonas, con mucho cuidado de no coger parte de la fase acuosa ni del precipitado en el pipeteo, y se pasó a un eppendorf de 1,5 ml. Sobre el tubo anterior se repitió la partición líquido-líquido con la fase acuosa remanente, y el sobrenadante correspondiente a la nueva fase de dietiléter se añadió al obtenido la vez anterior.

El último paso fue la desecación de la fase orgánica de la muestra, para ello se utilizó un desecador Speedvac CS100 (Savant) programado en calor y entrada de aire durante 1-2 h, hasta evaporar por completo los restos de dietiléter. Finalizado el proceso de desecación, los tubos fueron almacenados a -20ºC y enviados en frío a la Universidad Jaume I de Castellón, al grupo del Dr. Aurelio Gómez-Cadenas que realizó los posteriores análisis de cuantificación hormonal.

CITOQUININAS

Para la detección de citoquininas, el procedimiento consistió en el pesado de un mínimo de 60 mg de muestra que se trituraron por completo utilizando nitrógeno líquido (N_2) y un mortero de porcelana (Haldenwanger) pre-enfriado a -20ºC. El material homogeneizado se guardó a -80ºC y se envió en nieve carbónica al departamento de Nutrición Vegetal del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC),

al grupo del Dr. Alfonso Albacete, quien realizó la extracción y purificación de fitohormonas según el método de Dobrev y Kaminek (Dobrev y Kamínek, 2002), y posteriormente cuantificó su concentración mediante cromatografía líquida de alta definición acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS, *High performance liquid chromatography with mass spectrometry*).

3.15.1 Cuantificación de auxinas mediante LC-ESI-MS/MS

La cuantificación hormonal llevada a cabo por el grupo del Dr. Aurelio Gómez Cadenas se realizó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray (LC-ESI-MS/MS, *Liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry*). El experimento se llevó a cabo en un equipo de cromatografía Waters Alliance 2690 (Waters) acoplado a un espectrómetro de masas Micromass Quattro (Waters), siguiendo la metodología detallada en el trabajo de Durgbanshi *et al*. (2005).

Se realizaron tres réplicas técnicas de un mínimo de 2 réplicas biológicas de cada estadio del desarrollo. La concentración final de auxina detectada en el análisis se obtuvo dividiendo los nanogramos de proteína detectada entre los miligramos de peso fresco del material de partida.

3.15.2 Cuantificación de citoquininas mediante HPLC-ESI-MS

El grupo del Dr. Alfonso Albacete llevó a cabo la cuantificación hormonal de las muestras utilizando la técnica de cromatografía de líquidos de alta definición acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS, *High performance liquid chromatography with mass spectrometry*) y una interfaz de ionización por electrospray (ESI, *electrospray ionization*). El ensayo se realizó en un equipo de HPLC Agilent Serie 1100 (Agilent Technologies) conectado a un espectrómetro de masas XCT Plus Agonnt Ion Trap (Agilent Technologies), siguiendo la metodología detallada en el trabajo de Albacete *et al*. (2008).

Se realizaron tres réplicas técnicas de un mínimo de 2 réplicas biológicas de cada estadio del desarrollo. La concentración final de citoquinina detectada en el análisis se

obtuvo dividiendo los nanogramos de proteína detectada entre los miligramos de peso fresco del material de partida.

3.16 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA POR PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL

3.16.1 Extracción de RNA

Se procedió a la extracción de RNA de muestras congeladas a -80ºC utilizando diferentes kits en base a las características del material de partida y a la cantidad de muestra de que se disponga en el momento de la extracción.

El aislamiento del RNA de muestras de *H. vulgare* y *B. napus*, tanto del desarrollo embriogénico como del desarrollo *in vivo* del polen, se llevó a cabo utilizando el kit comercial RNeasy Plant Minikit (Qiagen), en el caso de disponer de una cantidad de entre 20 y 100 mg de muestra, o el kit RNeasy Plant Microkit (Qiagen) si la cantidad de muestra era inferior a 20 mg de peso fresco, situación común en muestras de cultivos de microsporas en fases tempranas del desarrollo (microspora vacuolada y proembrión). Para aislar el RNA de las muestras de *Q. suber* se utilizó el kit comercial NucleoSpinR RNA Plant (Macherey-Nagel), utilizando una cantidad de material entre 100-200 mg de peso fresco.

Una vez extraído el RNA de las muestras, se evaluó su concentración (técnica descrita más adelante) y se almacenaron a -80ºC.

Tratamiento con DNasa

Independientemente del método de extracción utilizado, en todos los casos se procedió a la digestión con DNasa del RNA aislado para garantizar la ausencia de contaminantes en las muestras. Las muestras de RNA extraído con cualquiera de los dos kit de Quiagen (RNeasy Plant Minikit o RNeasy Plant Microkit) se trataron utilizando el kit comercial TURBO DNA-freeTM (Ambion). Las muestras de RNA extraído con el kit NucleoSpinR RNA Plant (Macherey-Nagel) se trataron con DNasa siguiendo los pasos concretos del protocolo del mismo kit.

Evaluación del RNA

Es importante conocer en todo momento la concentración y el grado de pureza del RNA con el que estamos trabajando. Estas características pueden medirse mediante espectrofotometría UV-Visible en base a la absorbancia de la molécula de RNA dentro de diferentes rangos de longitudes de onda. La evaluación de estos parámetros se llevó a cabo en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (ThermoFisher Scientific) partiendo de 1 µl de muestra.

La concentración de RNA de la muestra se determinó asumiendo que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 µg/ml de RNA. Asimismo, los datos de pureza del RNA se obtuvieron partiendo del cociente entre las lecturas a 260 nm (máximo de absorbancia de las moléculas de ácidos nucleicos) y 280 nm (máximo de absorbancia de las moléculas de proteínas), siendo 2 el valor óptimo de pureza de la muestra y aceptando unos niveles de pureza entre 1,9 y 2,2. También se tuvo en cuenta el cociente de las lecturas a 260 nm y 230 nm (máximo de absorbancia de contaminantes como fenoles y carbohidratos), aceptando valores en el rango de 2,0-2,2. La pureza también se evaluó observando el perfil de la gráfica que se obtuvo al realizar un barrido de absorbancia entre 220 y 320 nm, sabiendo que la curva óptima presenta un pico de absorbancia a 260 nm con forma de campana (Fig. 60).

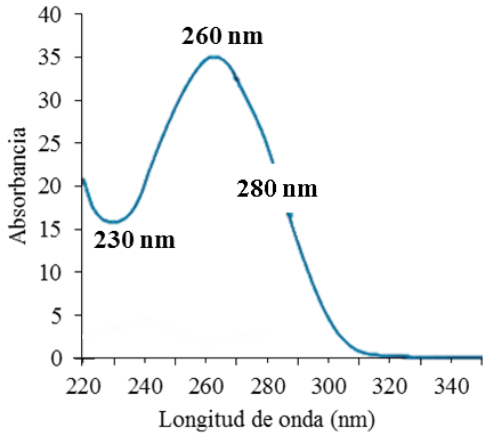


Figura 60. Espectro de absorbancia de los ácidos nucleicos.

3.16.2 Síntesis de cDNA

Se llevó a cabo la síntesis de cDNA a partir de 1 µg del RNA aislado (Apartado 3.16.1) y tratado con DNAsa o, en el caso de las muestras de *Q. suber*, ajustando a la mayor concentración de RNA que permitiera el rendimiento de la muestra limitante (generalmente 0,3 µg).

Se comenzó añadiendo en un eppendorf de 0,5 ml 1 µg de RNA, 1 µl de oligo (dT) (500 µg/ml) (Biotools), 1 µl de dNTPs (10 mM) (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) (Promega) y agua libre de RNasas hasta completar un volumen final de 12 µl. La mezcla se incubó a 65^{o}C durante 5 min en un baño termostático, e inmediatamente después se dejó reposar en hielo para parar la reacción. Tras 2-3 minutos de incubación en frío, se añadieron 4 µl de tampón de la enzima 5X First-Strand Buffer (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3, KCl 375 mM y $MgCl_2$ 15 mM) (Invitrogen), 2 µl de DTT (0,1 M) (Invitrogen) y 1 µl de inhibidor de ribonucleasa RNaseOUT^{TM} (40 U/µl) (Promega), y se dejó incubar a 42^{o}C durante 2 min en un termociclador Mastercycler® personal (Eppendorf). A continuación, se añadió 1 µl de la enzima SuperScript® II Reverse Transcriptase (200 U/µl) (Invitrogen). La reacción se incubó en el termociclador a 42^{o}C durante 50 min y seguidamente se programó otra incubación a 70^{o}C durante 15 min para su inactivación. Finalmente, las muestras de cDNA sintetizado se almacenaron a -20^{o}C hasta el momento de su uso.

3.16.3 Diseño de oligonucleótidos

Se procedió al diseño de oligonucleótidos de distintos genes de interés (Tabla 20) de las especies *B. napus*, *H. vulgare* y *Q. suber*, con el fin de analizar sus niveles de expresión génica en las distintas etapas seleccionadas del desarrollo.

Tabla 20. Lista de oligonucleótidos utilizados en qRT-PCR.

Abreviatura del gen	**Secuencia de oligonucleótidos (5´→3´)**	
	Forward	***Reverse***
HvCYCL	CCTGTCGTGTCGTCGGTCTAAA	ACGCAGATCCAGCAGCCTAAAG
HvTAR2-like	CTTTGGTTTTCGATCCGTGT	CTGGTTGCGAGTTGTTGTCT
HvPIN1-like	CACTTCATCTCCTCCAACG	TCCCTCTTCTCGCACTACTC
HvPap-1	TCCTGGAGTCGATCTTTGGTTTC	CAAGCATACTGTTGCGGCTTC
HvPap-6	TGCAATTGACGGCAAGAAGA	TGGATCACCAGGTGATCATTTG
HvPap-12	ATGTGCGCTATTGCTACCTGC	CACCTTATTCATGTCTGGCGAA
HvATG5	TGGGAATCAGTGAGGAAAGG	CCAGGAGATTCAGGCTCATC
HvATG8_1	ACGAGGAGAACAAGGACGAG	GGCACGCCTTATTTACAGGA
BnACT	TGAAGATCAAGGTGGTCGCA	AGAAGGCAGAAACACTTAGAAG
AtHEL	CCATTCTACTTTTTGGCGGCT	TCAATGGTAACTGATCCACTCTGATG
BnTUB	ACAATGCAACGCTCTCTGTG	ACCCACCATGAAGAAGTGG
BnTAA1	CGTCACCCAATAACCCAGAC	CATCTTCTTTGCCACCTTCT
BnPIN1-like	CGACTCCCTCCAGAAAATCA	TTCAGATCGTGGTGCTTCAG
BnIPT1-2	CGACGAACACGACAAAGTAAC	CGGGAAGGTAATCTGGTTG
BnIPT9	CCGCTTGCTCTGTTTCTCTA	ACCTCCTTTCTATCACTTGCTG
BnARR5	CCTGGGATGACTGGATATGA	TTGAAAACTCGTTCCTCAGC
BnARR21	GCATCTCTCAGCAAATCCAG	ATCACCAGAACCACCGTTT
BnCKX2	CTGTCAAATGCTGGAATCG	CCCAAACCTCCTAAAACTCC
QsACT	CCTGATGGGCAGGTTATCACA	GCTTCAATGAGAGATGGCTGG
QsPME	AGTTGCAGAAGCGTATGTCC	GCAGGAGTTTACACGGAGAA
QsPMEI	ACTCCACCATAGTCACCAGC	GCCAAAACCACTGTCGATGC
QsAGP16L1	AGTGGCTCAGGCACAATCTC	CTACGGTGATGATGAGGCGT
QsLys-rich-AGP18	TGGTGCTTGTGGTTTAGACG	TGGCATTCGCATTGATCTGC
QsLys-rich-AGP17	GACAGTGGGGTGGAGAAGAT	ACCAACAATAGGAGAGCCCA

La identificación de las secuencias correspondientes a los genes de interés se llevó a cabo utilizando distintas bases de datos según la especie de estudio.

Para la selección de secuencias de *B. napus* se utilizaron las bases de datos BRAD (http://brassicadb.org/brad/index.php) y TAIR (http://www.*Arabidopsis*.org); para la especie *H.vulgare*, se utilizó la base de datos IPK Gatersleben (https://webblast.ipk-gatersleben.de); y en el caso de la especie *Q.suber*, las secuencias se identificaron a partir de la base de datos CorkOakDataBase (http://www.corkoakdb.org). Para todas ellas también se utilizó de forma complementaria la base de datos GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov).

En aquellos casos en los que no se pudo encontrar la secuencia génica de interés en estas bases de datos, se llevó a cabo una búsqueda por homología con especies cercanas y se realizó un alineamiento múltiple utilizando los programas CLUSTALW y MUSCLE con la finalidad de encontrar y seleccionar las secuencias más conservadas.

Una vez identificada la secuencia del gen de interés, se procedió al diseño de oligonucleótidos con los programas específicos de diseño Primer3Plus (http://www.bioinformatics.nl/cgibin/primer3plus/primer3plus.cgi), Premier Biosoft (http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1) y NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Los oligonucleótidos se diseñaron en base una serie de criterios que favoreciesen una correcta reacción en cadena de la polimerasa:

- Se aseguró la presencia de una única secuencia complementaria en el cDNA para la hibridación de los oligonucleótidos. Es necesario que uno de los oligonucleótidos tenga la misma secuencia que se encuentra en una de las cadenas del DNA (*forward*), mientras que el otro debe llevar la secuencia complementaria que estará al final del fragmento que se quiere amplificar (*reverse*) para que uno sea complementario a la cadena que forma el otro; de no ser así no se amplificaría la región de interés.

- La región de interés que se quiera amplificar debe componerse por el mínimo número de pares de bases posible con el fin de evitar errores en la amplificación.

- La temperatura de fusión (Tm o temperatura de *melting*) se fijó en un rango de 55-65^{o}C, siempre teniendo en cuenta que la temperatura entre oligonucleótidos no difiriese en más de 5^{o}C, para evitar amplificaciones asimétricas (en una sola hebra). La Tm es la temperatura a la cual la mitad de las moléculas de oligonucleótidos se han hibridado con las hebras de cDNA molde. Una Tm demasiado baja puede conllevar inespecificidad de los oligonucleótidos, uniéndose a secuencias distintas a las que se quieren amplificar. Por otro lado, seleccionar una Tm demasiado alta, conllevara un bajo rendimiento de la amplificación por verse reducida la probabilidad de anillamiento.

- La longitud de cada oligonucleótido se fijó entre 17-26 pares de bases. Una longitud muy grande dificultaría su hibridación y un tamaño muy pequeño favorecería hibridaciones no deseadas.

-El contenido de G:C (Guanina:Citosina) se estableció en un rango del 40-60%, con una diferencia máxima del 5% entre los oligonucleótidos.

- Se evitaron las secuencias con 3 o más Cs o Gs en la región terminal 3´.

- Se descartaron aquellas secuencias complementarias para el extremo terminal 3´, ya que esto favorecerían la formación de dímeros.

- Se minimizó la posibilidad de formación de estructuras secundarias y horquillas.

Los oligonucleótidos diseñados se encargaron a la empresa ROCHE.

3.16.4 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR)

Para llevar a cabo la amplificación de la región de interés mediante la reacción en cadena de la de la polimerasa a tiempo real (qRT-PCR, *Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*) se utilizaron placas de PCR (Bio-Rad) de 96 pocillos. En cada pocillo se añadió un total de 25 ng de cDNA de la muestra correspondiente, los oligonucleótidos diseñados (*Forward* y *Reverse*) a una concentración de 500 nm, 5 µl de FastStart Essential DNA Green Master (Roche Diagnostics) y agua de calidad PCR (Roche) hasta completar un volumen final de 10 µl. En cada experimento se añadieron dos tipos de control negativo en los que el volumen correspondiente a la muestra de cDNA fue sustituido por agua de calidad PCR (Roche), o por el RNA a partir del cual se realizó la transcripción inversa.

Una vez completa la placa, se selló con el adhesivo transparente (Bio-Rad) y se mantuvo a 4^{o}C hasta su lectura. A continuación, se programó el termociclador con el correspondiente protocolo de amplificación (Desnaturalización inicial de 2 min a 95^{o}C. Seguido por 50 ciclos de amplificación, cada uno de ellos programado 15 seg a 95^{o}C y 30 seg a 58^{o}C. Después de cada lectura, se adquirió una curva de disociación para comprobar la especificidad de la amplificación, sometiendo a las muestras a un aumento de temperatura de 55 a 95^{o}C con una duración de 6 seg) y se inició la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real qRT-PCR en un iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Se llevaron a cabo experimentos con diluciones seriadas (puro, dil.1:10, dil.1:100, dil.1:1000) del cDNA de varias muestras, para obtener los datos de eficiencia de cada

una de las parejas de oligonucleótidos. En todos los experimentos, los niveles de expresión de nuestro gen de interés se compararon con los niveles de expresión de un gen endógeno de referencia. El gen endógeno se seleccionó en base a la especie de estudio y teniendo en cuenta las características del gen de interés, con el fin de equiparar lo máximo posible los ciclos de amplificación de ambos, aumentando así la fiabilidad de la comparación en los análisis.

Todas las reacciones de qRT-PCR se llevaron a cabo por triplicado y en cada ensayo génico se realizaron un mínimo de tres repeticiones técnicas.

3.16.5 Análisis de expresión génica

Los datos obtenidos fueron analizados con el programa Bio-Rad CFX Manager 3.1 (Versión 3.1.1517.0823) (Bio-Rad), utilizando el método de cálculo de Livak (Livak y Schmittgen, 2001).

3.17 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los resultados cuantificables de este trabajo se sometieron a un análisis estadístico utilizando el programa Statgraphics Centurion XVIII, realizando para cada experimento varias réplicas y repeticiones que asegurasen una alta potencia estadística (1-β).

En primer lugar, se comprobó que los datos seguían una distribución normal utilizando el test de Saphiro-Wilk (para un tamaño muestral $n<50$). A continuación, se aplicó el test de Levene para comprobar la homocedasticidad de la varianza poblacional. Una vez aceptada la normalidad y homocedasticidad de los datos, se procedió al análisis paramétrico de las variables.

Para el análisis de variables de dos factores, se realizó una prueba t-Student bilateral. Para el análisis de variables de 3 o más factores, primero se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA), para comparar las medias de dos o más muestras de los ensayos independientes en relación a la variable de interés. Con este análisis se determinó si las distintas poblaciones mostraban o no entre ellas diferencias significativas en base a la variable de estudio. En aquellos análisis que presentaron

diferencias significativas tras aplicar el test estadístico ANOVA, se procedió a realizar la prueba post hoc Tukey. En todos los análisis estadísticos se fijó un nivel de significación del 95% ($p<0,05$).

RESULTADOS

4.1. DINÁMICA DE LA AUXINA DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS Y EL DESARROLLO DEL POLEN Y EL TAPETUM DE *BRASSICA NAPUS*

La regulación hormonal, y en concreto la auxina, ha sido descrita como uno de los factores determinantes implicados en la regulación del proceso de embriogénesis de muchas especies.

Por ello, en esta tesis se ha procedido a analizar la dinámica y posible papel de la auxina endógena durante el inicio y progresión de la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Brassica napus*. Además, con el objetivo de comparar la dinámica de la auxina durante los dos programas de desarrollo de la microspora: desarrollo embriogénico (*in vitro*) y desarrollo del polen (*in vivo*), también se ha llevado a cabo un estudio de la auxina durante el desarrollo de la antera, analizando tanto las microsporas y el polen como el tapetum.

4.1.1 Caracterización de las etapas principales de la embriogénesis de microsporas de *B. napus*

La embriogénesis de microsporas de *Brassica napus* es considerado un sistema modelo de inducción embriogénica dentro de las plantas dicotiledóneas. Este proceso se lleva a cabo en un medio de cultivo en el que no se añaden auxinas de manera exógena, lo que le convierte además en un sistema muy apropiado para analizar el papel que juega la auxina endógena durante el inicio y progresión de la embriogénesis.

La inducción embriogénica se llevó a cabo aplicando un tratamiento de estrés por calor a 32^{o}C en cultivos de microsporas aisladas. Para ello, se seleccionaron botones florales en el estadio de microspora vacuolada (Fig. 61A-B), por ser la etapa más sensible a la inducción embriogénica (Prem *et al*., 2012), de los que se aislaron las microsporas para su cultivo *in vitro*. En este estadio del desarrollo, la microspora se encuentra rodeada por una gruesa capa de exina y se caracteriza por presentar una gran vacuolización del citoplasma que desplaza al núcleo hacia una posición periférica en la célula (Fig. 61A). Otra característica de esta etapa es la ausencia de gránulos de almidón en su citoplasma, lo cual se observa en la tinción con yoduro potásico (Fig. 61B), un conocido marcador celular de la diferenciación.

Transcurridos entre 4-7 días de cultivo, se puede observar cómo algunas microsporas abandonan la ruta de desarrollo gametofítico, reprogramándose hacia una ruta embriogénica y dividiéndose para formar estructuras multicelulares denominadas proembriones, aún envueltas por la exina (cubierta que rodea la microspora) (Fig. 61C-D). Estas estructuras embriogénicas presentan un citoplasma con pequeñas vacuolas (Fig. 61C) y algunos depósitos de almidón dispersos (Fig. 61D). A medida que avanza la embriogénesis y continúan las divisiones celulares, las estructuras aumentan gradualmente de tamaño, la cubierta de exina se rompe y se forman los embriones globulares (Fig. 61E-F), en los que se observa poca vacuolización del citoplasma de sus células (Fig. 61E) y abundantes depósitos de almidón (Fig. 61F). A continuación, se forman embriones corazón, embriones torpedo y, tras 30 días de cultivo, embriones cotiledonares (Fig. 61G-H) en los que puede observarse una clara diferenciación tisular. En esta etapa se puede observar cómo los dominios apicales dan lugar a los cotiledones y el dominio basal origina la radícula del embrión. Las células de las zonas no meristemáticas desarrollan grandes vacuolas, quedando el núcleo y el resto de los orgánulos citoplásmicos en la zona periférica. Además, las zonas más diferenciadas (periféricas), muestran un mayor acúmulo de gránulos de almidón, mientras que las zonas de proliferación (más internas) presentan menor contenido de este polisacárido (Fig. 61H).

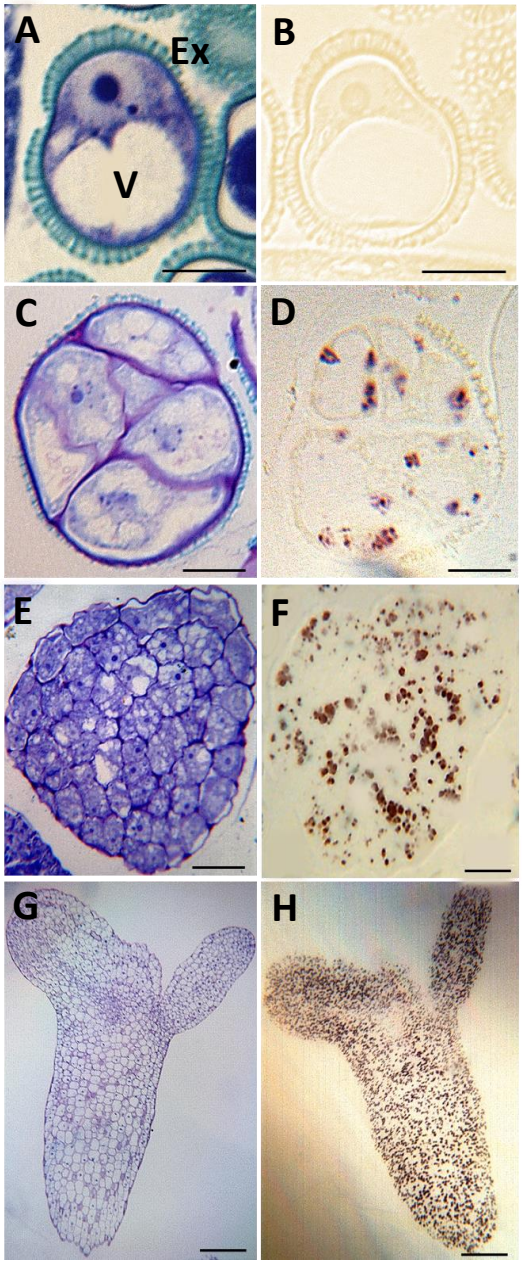


Figura 61. Principales etapas de la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Brassica napus*. Cortes semifinos observados en con microscopía óptica de campo claro. **(A, C, E, G)** Citoquímica con azul de toluidina. **(B, D, F, H) C**itoquímica con yoduro potásico (I_2KI). **(A-B)** Microspora vacuolada aislada al inicio del cultivo. **(C-D)** Proembrión tras 6 días de cultivo, rodeado por la exina. **(E, F)** Embrión globular. **(G-H)** Embrión cotiledonar, tras de 30 días de cultivo. V= vacuola; Ex= exina. Barras **(A-D)**: 10 µm, **(E-F)**: 20 µm, **(G-H)**: 50 µm.

4.1.2 Patrón temporal de concentración y localización de auxina durante la embriogénesis de microsporas de *B. napus*

En primer lugar, se procedió a evaluar el cambio en los niveles de auxina endógena en distintas etapas del desarrollo embriogénico de microsporas (microspora vacuolada

aislada, proembrión, embrión globular y embrión cotiledonar) mediante cromatografía líquida de alta definición acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS, *High performance liquid chromatography with mass spectrometry*). Estos análisis se llevaron a cabo en el laboratorio del Dr. Alfonso Albacete. Con esta técnica se calculó la concentración de auxina endógena mayoritaria, el ácido indol-3-acético (AIA).

Los análisis no detectaron AIA en la fase de microspora vacuolada aislada, mientras que si mostraron niveles detectables de esta hormona tras la inducción, en la etapa de proembrión, alcanzándose valores significativamente mayores en los estadios más avanzados del desarrollo, en embriones globulares y cotiledonares (Fig. 62).

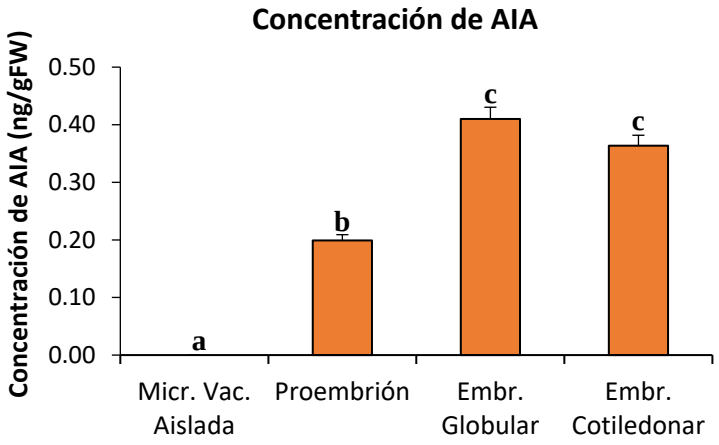


Figura 62. Cuantificación de la concentración de AIA endógeno durante el desarrollo embriogénico de *Brassica napus*, utilizando cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray (LC-ESI-MS/MS). Las columnas muestran el valor promedio de la concentración de AIA de muestras de distintas etapas del desarrollo: microspora vacuolada aislada (Micr. Vac. Aislada), proembrión, embrión globular y embrión cotiledonar. Se realizaron tres réplicas técnicas de un mínimo de 2 réplicas biológicas de cada estadio del desarrollo. Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$.

Una técnica ampliamente utilizada en experimentos de localización de auxina es el uso de plantas transgénicas que expresan la proteína verde fluorescente (GFP) como marcador, bajo la dirección del promotor sintético de respuesta a auxina DR5. Esta metodología resulta de gran utilidad para estudiar el desarrollo y diferenciación de plantas modelo como *Arabidopsis*, pero esta herramienta no está disponible en muchas otras especies de interés. En este estudio, para evaluar los cambios en la distribución y

acumulación de la auxina durante la embriogénesis de microsporas de *Brassica napus*, se han realizado ensayos de inmunofluorescencia y posterior análisis mediante microscopía láser confocal, utilizando el anticuerpo monoclonal anti-AIA de ratón (Sigma A0855) en cortes semifinos. Para este ensayo se seleccionaron las etapas de microspora vacuolada aislada, proembrión, embrión globular y embrión cotiledonar

Los resultados mostraron una baja señal de fluorescencia en la etapa de microspora vacuolada (Fig. 63A-A´´´), señal que aumenta notablemente una vez iniciada la embriogénesis, en la etapa de proembrión, el cual muestra una intensa fluorescencia en el citoplasma de todas sus células (Fig. 63B-B´´´). En algunas preparaciones de la etapa de microspora vacuolada (Fig. 63A´, A´´) y proembrión (Fig. 63B´, B´´) se observa autofluorescencia inespecífica y de intensidad variable de la exina que rodea ambas estructuras. Los controles negativos con este anticuerpo no mostraron ninguna señal de fluorescencia (datos no mostrados). La señal de fluorescencia de AIA continúa aumentando según avanzamos en el desarrollo, mostrando una alta intensidad en el embrión globular (Fig. 63C-C´´´ y Fig. 64) con una distribución heterogénea. En algunos embriones del cultivo se pudieron observar estructuras de tipo suspensor (Fig. 64), estructura típica del desarrollo embriogénico *in vivo* que une el embrión cigótico en desarrollo al saco embrionario. En estos embriones se puede apreciar como el suspensor apenas presenta señal de fluorescencia, en comparación con el resto de células activas en proliferación que forman el embrión (Fig. 64B). Tras las etapas de embrión globular, corazón y torpedo, el embrión alcanza la etapa más avanzada del desarrollo, la fase de embrión cotiledonar, donde se revela el mayor nivel de fluorescencia (Fig.65), en comparación con el resto de fases estudiadas. En esta etapa se observa un patrón de distribución diferencial de la auxina, siendo más intensa la señal en la región apical de los cotiledones (Fig. 65A, B) y en la zona basal del embrión (Fig. 65A, C), zonas con mayor proliferación dentro del embrión.

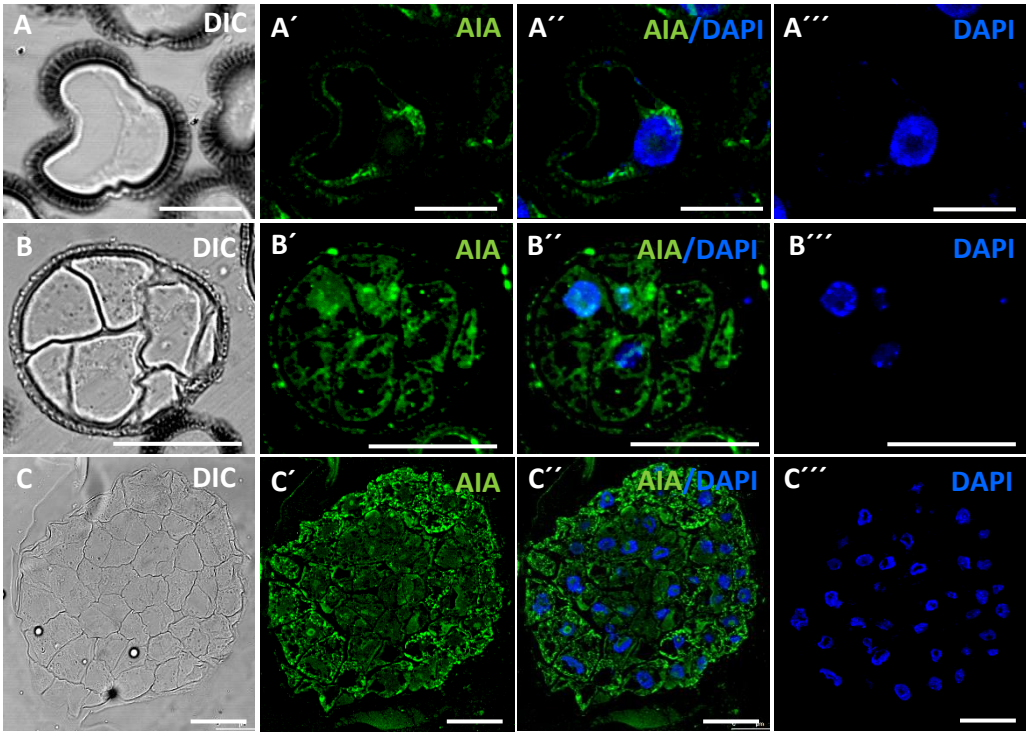


Figura 63. Inmunolocalización de AIA durante la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Brassica napus.* Las imágenes de microscopía confocal muestran la señal de fluorescencia del AIA (verde), la tinción de núcleos con DAPI (azul) y el DIC (contraste de interferencia diferencial). **(A-A´´´)** Microspora vacuolada. **(B-B´´´)** Proembrión rodeado por la exina. **(C-C´´´)** Embrión globular temprano, tras la ruptura de la exina. Barras **(A-A´´´)**: 10 µm, **(B-B´´´, C-C´´´)**: 25 µm.

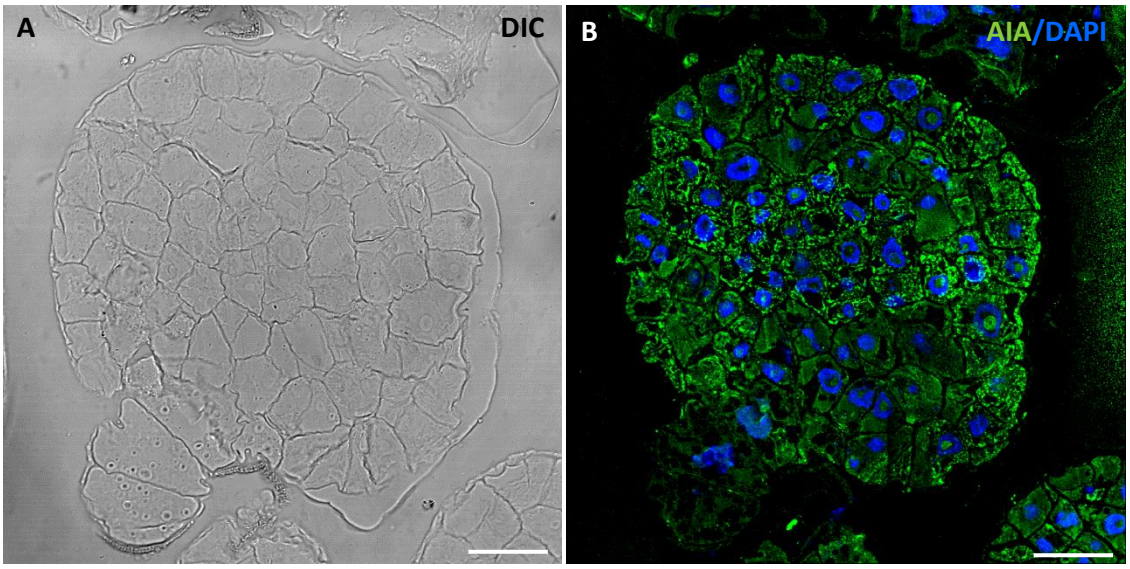


Figura 64. Inmunolocalización de AIA durante la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Brassica napus*, imagen de un embrión globular que conserva la estructura del suspensor. **(A)** DIC (contraste de interferencia diferencial). **(B)** Imagen de microscopía confocal con la combinación de la señal de fluorescencia del AIA (verde) y la tinción de núcleos con DAPI (azul). Barras: 25 µm.

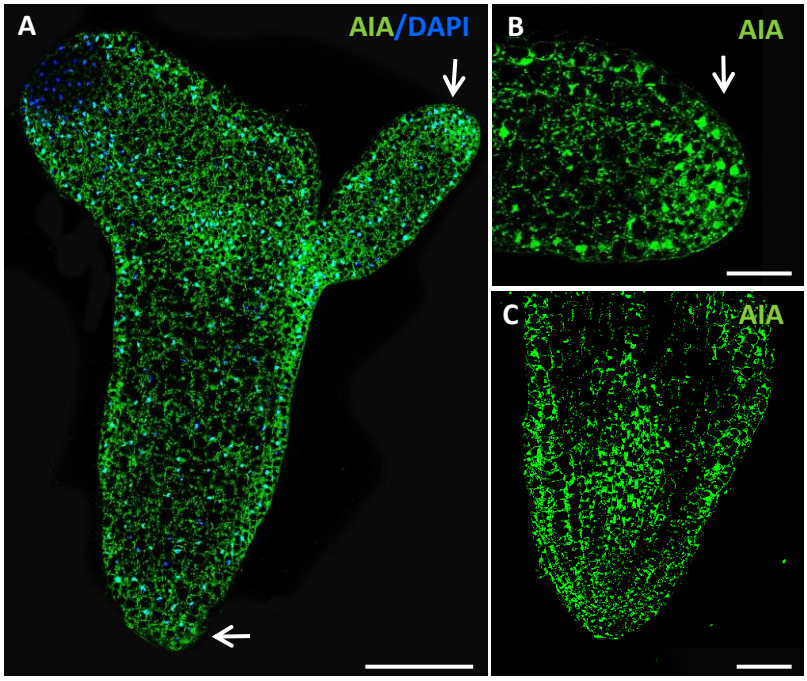


Figura 65. Inmunolocalización de AIA durante la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Brassica napus*, imagen de un embrión cotiledonar trascurridos 30 días de cultivo. **(A)** Imagen panorámica de microscopía confocal con la combinación de la señal de fluorescencia del AIA (verde) y la tinción de núcleos con DAPI (azul). **(B-C)** Detalle de la señal de auxina en la zona apical de un cotiledón **(B)** y del ápice radicular **(C)** del embrión. Las flechas en **(A)** señalan las regiones ampliadas en **(B-C)**, la flecha en **(B)** señala la zona de mayor acumulación de AIA en el cotiledón. Barras: 75 µm.

Una vez realizados los ensayos de inmunofluorescencia, se procedió a cuantificar la intensidad de la señal de fluorescencia de la auxina en cada una de las fases del desarrollo. Para ello se utilizó la proyección máxima de las imágenes de microscopía confocal de las diferentes etapas, todas ellas obtenidas bajo las mismas condiciones de excitación e idénticos ajustes en la captura para hacer posible la comparación entre los distintos estadios del desarrollo.

La intensidad de fluorescencia se midió con el programa de análisis de imagen Image-J, el cual permitió obtener una estimación de los cambios en la acumulación de auxina en las diferentes etapas de la embriogénesis de microsporas (Fig. 66). Antes de la inducción, en la etapa de microspora vacuolada, la señal de fluorescencia fue muy baja, mientras que, tras la inducción, se observó un aumento significativo de la señal en la etapa de proembrión, con valores que triplicaban los obtenidos en la etapa anterior. En estadios más avanzados, los embriones globulares y cotiledonares mostraron una

intensidad mucho mayor que cualquiera de las etapas anteriores, con valores de hasta 20 y 150 veces superiores, respectivamente, al de proembriones.

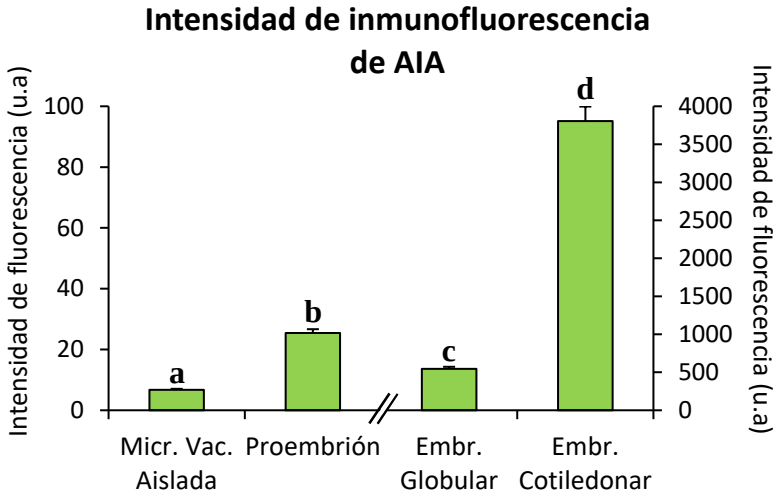


Figura 66. Cuantificación de la concentración de AIA endógeno durante la embriogénesis de microsporas de *Brassica napus*. Las columnas muestran la concentración media de AIA de muestras de cultivo en distintos estadios del desarrollo: microspora vacuolada aislada (Micr. Vac. Aislada), proembrión, embrión globular y embrión cotiledonar. Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$.

Los resultados obtenidos con ambas técnicas indicaron un aumento en los niveles de auxina endógena tras la inducción y con el avance de la embriogénesis de microsporas en *B. napus*.

4.1.3 Patrones de expresión de los genes *BnTAA1* y *BnPIN1-like* durante la embriogénesis de microsporas de *B. napus*

Se analizó la expresión del gen de biosíntesis *BnTAA1* y del gen de transporte polar de auxina *BnPIN1-like* en distintas fases de la embriogénesis de microsporas: microspora vacuolada aislada (Micr. Vac. Aislada), proembrión y embrión globula/corazón.

El análisis de expresión de ambos genes mostró un patrón similar, observándose descenso de los niveles de expresión génica a medida que avanza el desarrollo embriogénico (Fig. 67A-B).

Los resultados obtenidos con el gen *BnTAA1* mostraron niveles muy bajos de expresión en la fase de microspora vacuolada aislada, mientras que tras la inducción, en la fase de proembrión, se obtuvieron valores significativamente superiores (del orden de 10 veces más que en la fase de microspora vacuolada aislada). En la fase de embrión globular/corazón se obtuvieron los niveles más altos de expresión, con valores hasta 25 veces superiores a los obtenidos en la etapa de microspora vacuolada aislada (Fig. 67A).

En el caso de *BnPIN1-like,* no se detectó expresión del gen *BnPIN1-like* en la fase de microspora vacuolada aislada, pero si en el proembrión, fase que marca el inicio de la embriogénesis. En etapas más avanzadas, en la fase de embrión globular/corazón, esta expresión se vio incrementada hasta tres veces con respecto a los valores obtenidos en la fase de proembrión (Fig. 67B).

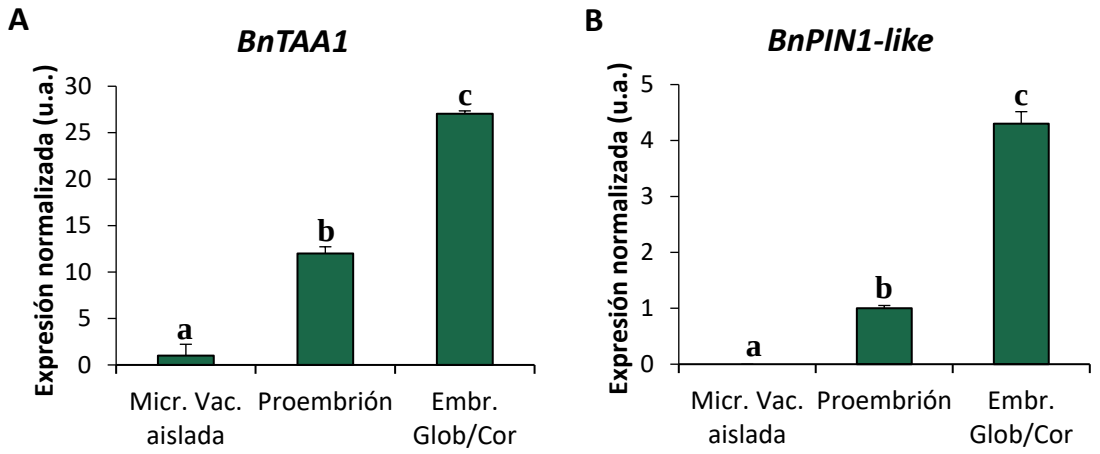


Figura 67. Patrones de expresión génica por qRT-PCR de *BnTAA1* (gen de biosíntesis de auxina) y *BnPIN1-like* (gen de transporte polar de auxina) durante el desarrollo embriogénico de *Brassica napus.* **(A)** Patrón de expresión temporal del gen *BnTAA1*. **(B)** Patrón de expresión temporal del gen *BnPIN1-like*. Los histogramas muestran cambios en los niveles de mRNA mediante qRT-PCR en diferentes estadios del desarrollo: microspora vacuolada aislada al inicio del cultivo (Micr. Vac. aislada), proembrión y embrión globular/corazón (Embr. Glob/Cor). Cada columna representa el valor promedio de al menos tres muestras biológicas diferentes y tres réplicas técnicas. Los niveles de transcripción fueron normalizados utilizando los valores del gen endógeno de referencia *BnACTINA*. Los datos muestran los niveles de expresión (en unidades arbitrarias: u.a) normalizados a la etapa de microspora vacuolada aislada (**A**) y proembrión (**B**). Las barras representan el error estándar de la media (*SEM*). Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$.

Estos resultados muestran que tras la inducción embriogénica hay una activación de la biosíntesis y transporte de auxinas, y ambas aumentan progresivamente a medida que avanza el desarrollo del embrión.

4.1.4 Efectos de la inhibición de la biosíntesis de auxina sobre la inducción y progresión de la embriogénesis de microsporas de *B. napus*

Con el fin de conocer el grado de implicación la auxina en el inicio y la progresión de la embriogénesis de microsporas de *Brassica napus*, se llevó a cabo un estudio funcional con el compuesto L-kinurenina, un inhibidor de la biosíntesis de auxina, añadiéndolo al inicio del cultivo a concentraciones 4, 40 y 100 µM.

Para evaluar el efecto del tratamiento sobre el inicio de la embriogénesis se procedió a cuantificar el porcentaje de proembriones presentes en los cultivos sin tratar (control) y tratados, trascurridos 6 días de cultivo.

Los cultivos tratados con kinurenina mostraron una reducción significativa del número de proembriones (en torno al 10%, en comparación con los cultivos control) al aplicar el tratamiento a una concentración 100 µM, no viéndose diferencias significativas en las concentraciones más bajas testadas (Fig. 68A).

Para evaluar el efecto del inhibidor en la progresión de la embriogénesis se tomaron fotografías panorámicas de las placas de cultivo control y tratadas tras 30 días de cultivo, lo que permitió comparar la producción de embriones cotiledonares diferenciados en cada caso.

Tras 30 días, los cultivos control produjeron un gran número de embriones diferenciados (Fig. 68B). Sin embargo, en los cultivos tratados con el inhibidor se observó un notable descenso del número de embriones diferenciados ya en la concentración de 40 µM, y apenas se observaron estructuras diferenciadas en las placas tratadas con la concentración 100 µM de kinurenina.

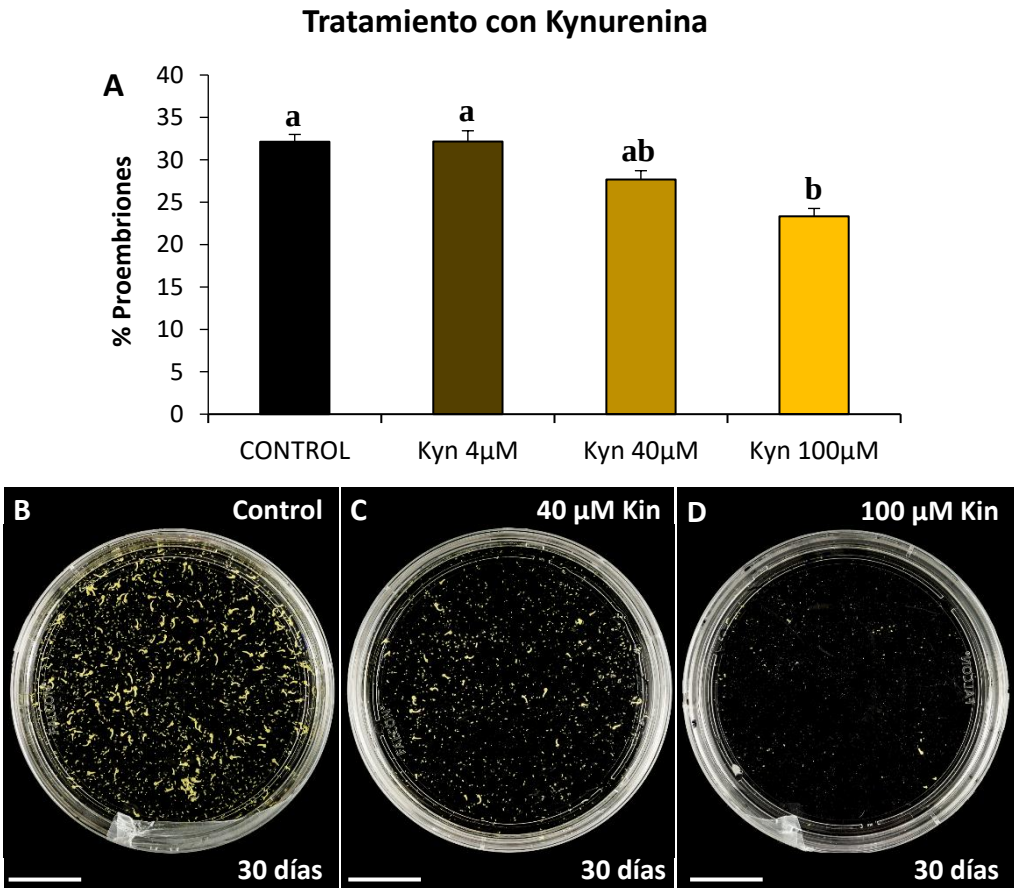


Figura 68. Efecto del tratamiento con kinurenina, inhibidor de la biosíntesis de auxina, en cultivos de embriogénesis de microsporas de *Brassica napus*. **(A)** Cuantificación de la inducción embriogénica, medida a través del porcentaje de proembriones presentes en los cultivos control y tratados con kinurenina a concentraciones de 4, 40 y 100 µm. Los histogramas muestran el valor promedio del porcentaje de proembriones en cultivos control y tratados, después de 6 días de cultivo. Cada columna representa la media de tres repeticiones y tres réplicas biológicas. Las barras representan el error estándar de la media (*SEM*). Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$. **(B-D)** Placas Petri donde se muestran embriones procedentes de embriogénesis de microsporas tras 30 días en medio de cultivo control **(B)** y tratado con kinurenina a concentraciones de 40 µM **(C)** y 100 µM **(D)**. Barras: 20 µm.

Estos resultados indicaron que la inhibición de la biosíntesis de auxina afectó tanto a la inducción embriogénica como al posterior desarrollo del embrión, sugiriendo un importante papel de la auxina tanto en el inicio como en la progresión de la embriogénesis de microsporas en *Brassica napus*.

4.1.5 Dinámica de la auxina durante el desarrollo *in vivo* del polen y del tapetum de *B. napus*

4.1.5.a Caracterización de las etapas principales del desarrollo del polen y del tapetum de *Brassica napus*

In vivo, el grano de polen se desarrolla en el interior de las anteras mediante un proceso de microsporogénesis, que da lugar a la formación de las microsporas, seguido de un proceso microgametogénesis, que originará en última instancia el grano de polen. Para el estudio de la ruta gametofítica se seleccionaron anteras en cinco fases características del desarrollo: tetrada, microspora joven, microspora vacuolada, polen bicelular y polen tricelular.

Microsporogénesis y microgametogénesis

La microsporogénesis comienza con la división meiótica de la célula madre del polen o meiocito, que da lugar a una tetrada (Fig. 69A-C). La tetrada está formada por cuatro microsporas haploides rodeadas por una capa de calosa que las mantiene unidas (Fig. 69A). Cada una de estas microsporas presenta un núcleo con pequeñas masas de cromatina condensada (Fig. 69A, C) y, tal y como muestra la tinción con yoduro potásico (marcador celular de diferenciación), no presenta depósitos de almidón en su citoplasma (Fig. 69B). Esta fase de tetrada finaliza con la liberación de las microsporas al lóculo de la antera a causa de la degradación de la pared de calosa que las rodea. La microspora liberada recibe el nombre de microspora joven (Fig. 69D-F) y se caracteriza por ser de pequeño tamaño y poseer un gran núcleo central rodeado por un denso citoplasma. En esta fase la microspora es muy activa transcripcionalmente, presentando una cromatina muy descondensada con algunas masas de heterocromatina, tal y como revela la tinción con DAPI (Fig. 69F). En la fase de microspora joven tampoco se detecta presencia de almidón al realizar la tinción de yoduro potásico (Fig. 69E). Según avanza el desarrollo, la microspora aumenta de tamaño y desarrolla una gran vacuola que ocupa la mayor parte del citoplasma y desplaza el núcleo hacia una posición periférica en la célula (Fig. 69G-I). La tinción con DAPI de esta fase muestra un patrón de cromatina más descondensada que en la fase anterior, con algunas masas de heterocromatina (Fig. 69I). Además, la citoquímica con I_2/KI continúa revelando ausencia de almidón en esta fase (Fig. 69H). Al

final de esta etapa, la microspora sufre una primera mitosis asimétrica, dando lugar a un grano de polen bicelular formado por dos células de características muy diferentes: la célula vegetativa, que ocupa la mayor parte del volumen del grano de polen y la célula generativa, de pequeño tamaño, inmersa en el citoplasma de la célula vegetativa (Fig. 69J). En esta fase, la vacuola característica de la fase anterior se ha reabsorbido en el citoplasma y solo quedan algunas vacuolas de muy pequeño tamaño. También se observa un patrón de cromatina muy diferente de ambos núcleos, el núcleo vegetativo presenta una cromatina más descondensada, mientras que el núcleo de la célula generativa posee un patrón de cromatina muy condensado, revelando una intensa señal fluorescente en la tinción con DAPI (Fig. 69L). En este estadio, el citoplasma de la célula se ha enriquecido de todo tipo de orgánulos y se observan por primera vez numerosos depósitos de almidón localizados por todo el citoplasma de la célula (Fig. 69K). En etapas sucesivas del proceso de maduración del polen, la célula generativa migra desde su posición periférica inicial, en contacto con la pared del polen, hacia el interior del grano de polen. Así, en el último estadio de maduración, tanto el núcleo vegetativo como el generativo se encuentran en el centro de la célula. Este proceso va además acompañado por un aumento del tamaño del grano de polen. En algunas especies, como es el caso de *Brassica napus*, tiene lugar una segunda mitosis del polen, en la que la célula generativa se divide y da lugar al grano de polen tricelular, con una célula vegetativa y dos células espermáticas (Fig. 69M-Ñ). En esta fase dejaron de observarse depósitos de almidón en el citoplasma de la célula (Fig. 69N).

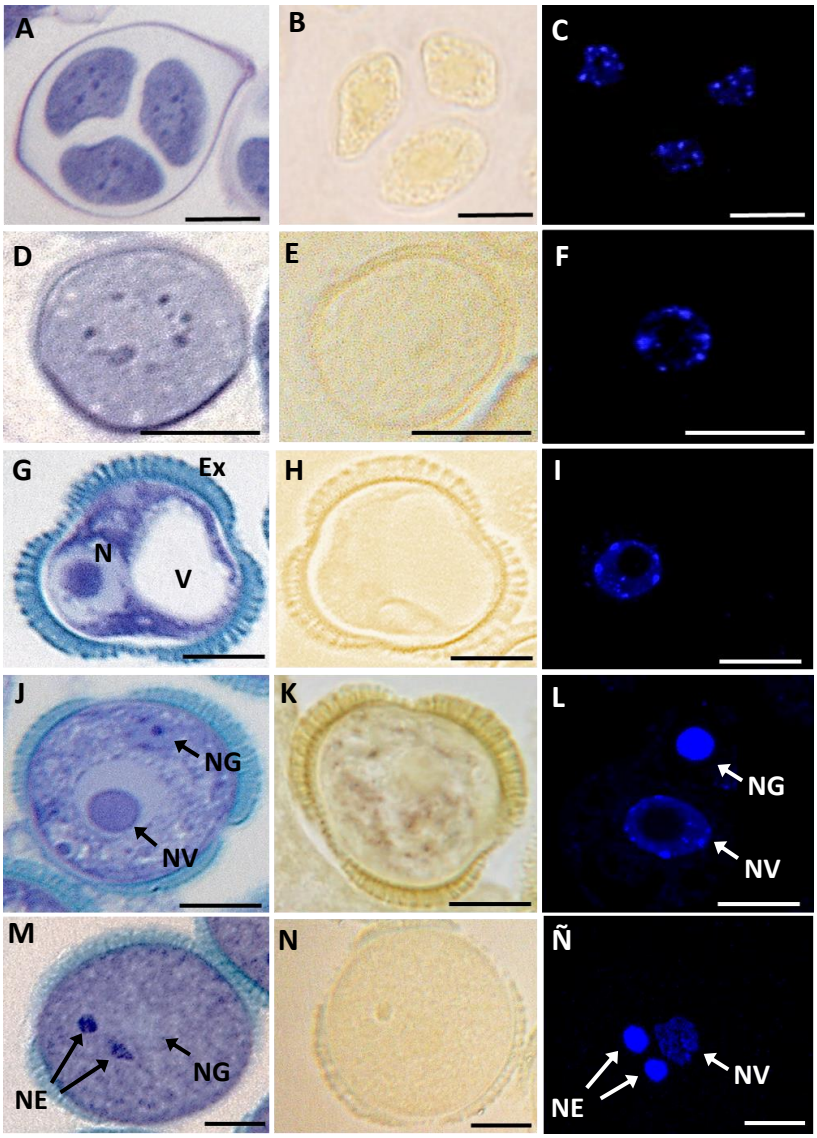


Figura 69. Principales etapas del desarrollo del polen *in vivo* de *Brassica napus*. **(A, D, G, J, M)** Citoquímica con azul de toluidina. **(B, E, H, K, N)** Citoquímica con yoduro potásico (I_2/KI). **(C, F, I, L, Ñ)** Tinción con DAPI. **(A-C)** Tetrada. **(D-F)** Microspora joven. **(G-I)** Microspora vacuolada. **(J-L)** Polen joven bicelular. **(M-Ñ)** Polen maduro tricelular. V= vacuola; Ex= exina; N= núcleo; NV= núcleo vegetativo; NG= núcleo generativo; NE= núcleos espermáticos. Barras: 10 µm.

Desarrollo del tapetum

Durante el desarrollo de la antera, las microsporas y pólenes se encuentran en el lóculo de la antera, rodeadas por las distintas capas que componen la pared de la antera. Estas capas, nombradas desde la más externa a la más interna, son: el exotecio o epidermis, el endotecio, la lámina media y el tapetum (Fig. 70A). A lo largo del desarrollo estas capas experimentan cambios estructurales. En este estudio, además de analizar el desarrollo de las microsporas y el polen, también se ha caracterizado el desarrollo del

tapetum a lo largo de la formación del grano de polen por la activa participación del mismo en el proceso. El tapetum se compone de una única capa de células y es el tejido más cercano a los granos de polen en desarrollo, lo que le convierte en un importante tejido nutricional. El tapetum desempeña un papel clave como tejido secretor, proporcionando nutrientes y moléculas reguladoras para la formación de las microsporas y el correcto desarrollo del polen. En las etapas más avanzadas, este tejido sufre un proceso de muerte celular programada.

Para caracterizar los cambios del tapetum en anteras de *B. napus*, se seleccionaron cinco etapas principales: tapetum activo (Fig.70B, C) (en fase de tetrada y microspora joven), tapetum en muerte celular programada (MCP) temprana (en fase de microspora vacuolada) (Fig.4D), tapetum en MCP avanzada (en fase de polen joven) (Fig.70E) y tapetum en MCP muy avanzada (Fig.70F) (en fase de polen maduro).

En la fase de tapetum activo es cuando el tejido presenta su mayor actividad como tejido nutricional, coincidiendo con las microsporas en etapa de tetrada (rodeadas por la capa de calosa) (Fig. 70B) y etapa de microspora joven (microsporas liberadas de la calosa pero aún sin exina en su pared) (Fig. 70C). En esta fase de tapetum activo las células del tejido son binucleadas, de gran tamaño, forma poligonal, y presentan un denso citoplasma con pequeñas vacuolas y vesículas citoplásmicas (Fig. 70B, C). Sin embargo, justo antes de la primera mitosis del polen, en la etapa de microspora vacuolada, las células del tapetum comienzan el proceso de MCP, y empiezan a observarse los primeros signos de degradación (Fig. 70D). En esta etapa, las células del tapetum empiezan a perder su forma geométrica, los núcleos pierden su forma redondeada y la cromatina se condensa en grandes masas de heterocromatina. Por otro lado, aumenta el número de vacuolas en el citoplasma y se produce la contracción del mismo. A esta etapa se la denomina tapetum en MCP temprana. En la fase de polen bicelular el tapetum entra en lo que se llama MCP avanzada, en la que el núcleo y citoplasma muestran una mayor contracción y el número de vacuolas citoplásmicas cada vez es mayor (Fig. 70E). Finalmente, en anteras en fase de polen tricelular, las células del tapetum aparecen completamente degradadas y solo se observa una fina capa con restos del tejido (Fig. 70F). A esta etapa se la denomina tapetum en MCP muy avanzada y coincide con la maduración completa del grano de polen.

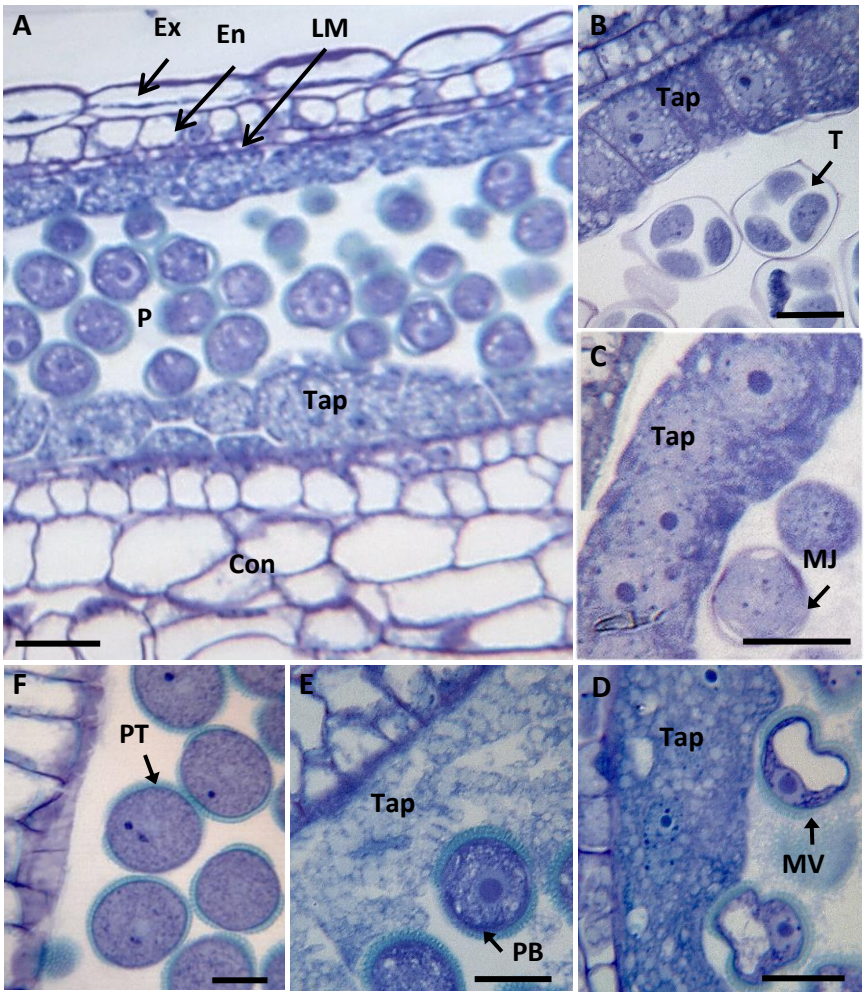


Figura 70. Principales etapas del desarrollo del polen y muerte celular programada (MCP) del tapetum de *Brassica napus*. Cortes semifinos teñidos con azul de toluidina y fotografiados con microscopía óptica de campo claro. **(A)** Imagen panorámica de un corte longitudinal de una antera de *Brassica napus*, donde se señalan las principales capas celulares de la misma. **(B-F)** Imagen ampliada de una antera en distintos estadios del desarrollo: **(B)** antera con tapetum activo en la fase de tetrada, **(C)** antera con tapetum activo en la fase de microspora joven, **(D)** antera con tapetum en MCP temprana en la fase de microspora vacuolada, **(E)** antera con tapetum en MCP avanzada en la fase de polen bicelular, **(F)** antera en MCP muy avanzada en la fase de polen tricelular. Ex: Exotecio o epidermis; En= Endotecio; LM= lámina media; P= polen; Tap= tapetum; Con= tejido conectivo; T= tetrada; MJ= microspora joven; MV= microspora vacuolada; PB= polen bicelular; PT= polen tricelular. Barras **(A)**: 50 µm, **(B-F)**: 20 µm.

4.1.5.b Patrón temporal de concentración y localización de auxina endógena durante el desarrollo del polen y el tapetum de *B. napus*

Para monitorizar los cambios en los niveles de AIA endógeno durante el desarrollo del polen, se seleccionaron tres etapas principales: la fase de tetrada como etapa temprana en el desarrollo, la fase de microspora vacuolada como fase intermedia y polen tricelular como etapa de maduración. Este ensayo se llevó a cabo en el laboratorio

del Dr. Aurelio Gómez Cadenas (*Universitat Jaume I*, Castellón) mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray (LC-ESI-MS/MS).

Los resultados mostraron niveles muy altos de auxina endógena en etapas tempranas del desarrollo, en la fase de tetrada, y una disminución de la concentración a medida que se avanza en el desarrollo, en la fase de microspora vacuolada, observándose los valores más bajos en la etapa de polen tricelular (Fig. 71).

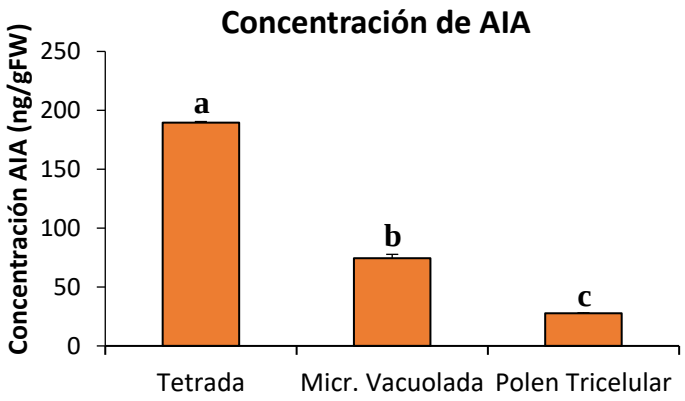


Figura 71. Cuantificación de la concentración de AIA endógeno durante el desarrollo del polen de *Brassica napus*, utilizando cromatografía de líquidos con ionización por electrospray acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-ESI-MS/MS). Las columnas muestran el valor promedio de la concentración de AIA de muestras de distintas etapas del desarrollo: tetrada, microspora vacuolada y polen tricelular. Se realizaron tres réplicas técnicas de un mínimo de 2 réplicas biológicas de cada estadio del desarrollo. Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$.

Para estudiar la localización subcelular de la auxina durante el desarrollo del polen, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo monoclonal anti-AIA. Para este estudio se seleccionaron las mismas fases del desarrollo utilizadas previamente para evaluar los niveles de auxina endógena por LC-ESI-MS/MS (tetrada, microspora vacuolada y polen tricelular), y se procedió a analizar la dinámica de distribución de AIA a nivel celular tanto de las microsporas y el polen como de las células del tapetum.

Los resultados obtenidos mostraron un descenso de la intensidad de fluorescencia a medida que avanza el desarrollo, correlacionando con los resultados de concentración endógena de la hormona.

En la etapa de tetrada, en la que el tapetum está activo, se observaron unos niveles muy altos de fluorescencia en las células del tapetum y algo menos de intensidad en las microsporas, siendo esta la etapa con mayor intensidad de señal durante el desarrollo en ambos tipos celulares (Fig. 72A-A´´).

Al analizar la señal de auxina en la etapa de microspora vacuolada, en la que el tapetum está en MCP temprana, se aprecia una disminución de la fluorescencia con respecto a la señal mostrada en la etapa anterior, tanto en las células del tapetum como en las microsporas, observándose un marcado muy localizado en el citoplasma y ausencia de señal en el resto de compartimentos celulares (Fig. 72B-B´´).

En la etapa del desarrollo más avanzada, correspondiente al polen tricelular y al tapetum en MCP muy avanzada, el tapetum está prácticamente degradado y no muestra señal anti-AIA y el polen maduro muestra una señal fluorescente de una intensidad casi indetectable (Fig. 72C-C´´).

Con la finalidad de demostrar la especificidad del anticuerpo y de los resultados de inmunolocalización obtenidos, se llevaron a cabo dos tipos de controles negativos: a) eliminando anticuerpo primario y b) utilizando la técnica de inmunodeplección, donde el anticuerpo anti-AIA es bloqueado previamente con AIA sintético. Ambos controles se realizaron sobre cortes semifinos de la etapa de tetrada, seleccionada por presentar la mayor intensidad de fluorescencia dentro del desarrollo del polen.

En ninguno de los casos se observó señal de fluorescencia (Fig. 72D-F), lo cual indica que no existen artefactos de autofluorescencia en la muestra y comprueba la ausencia de reactividad cruzada con ningún otro antígeno. Estos resultados respaldaron la especificidad del anticuerpo y la fiabilidad de los resultados obtenidos con esta técnica.

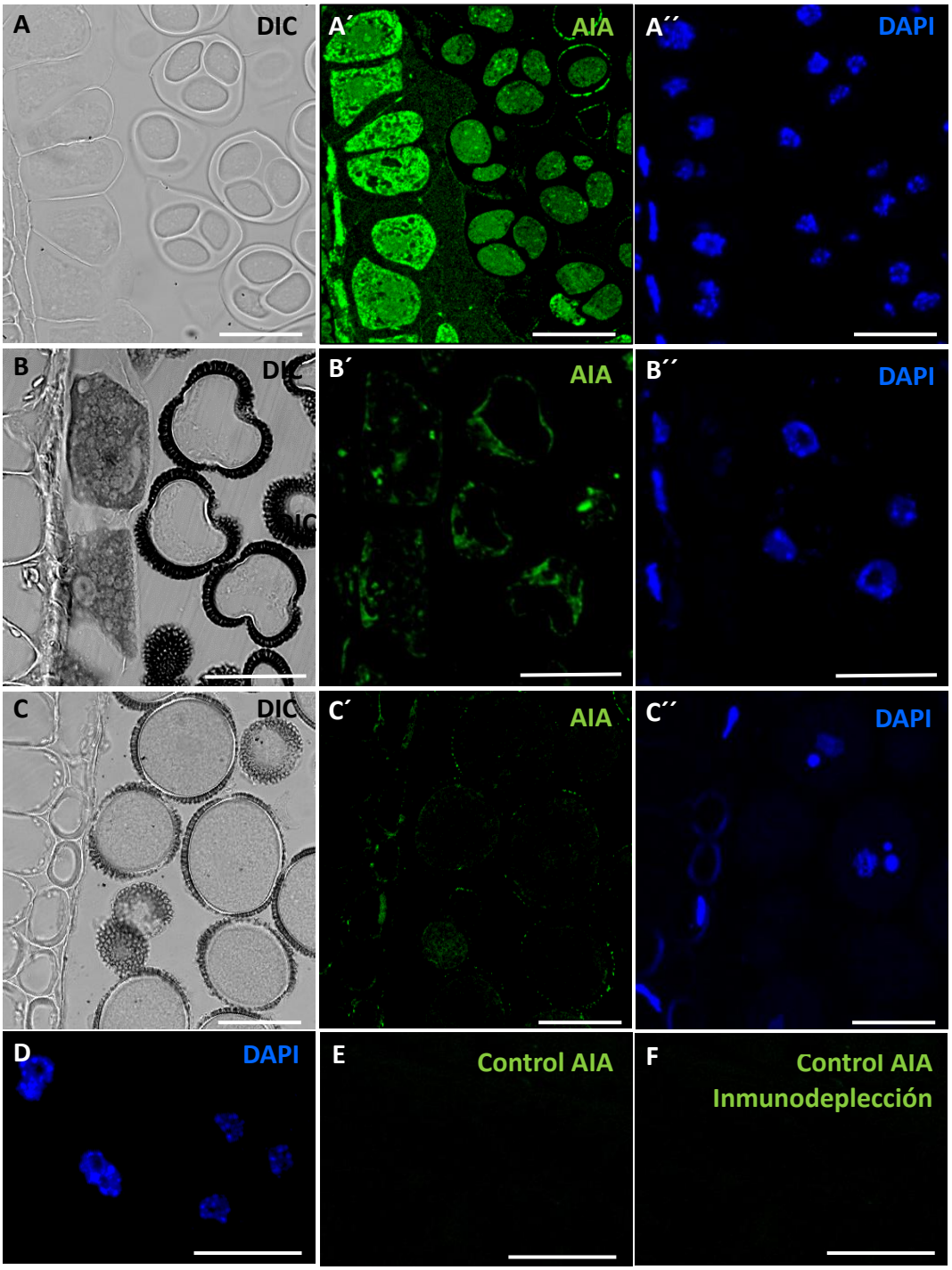


Figura 72. Inmunolocalización de AIA durante el desarrollo del polen de *Brassica napus*. Las imágenes de microscopía confocal muestran la señal de fluorescencia del AIA (verde), la tinción de núcleos con DAPI (azul) y el DIC (contraste de interferencia diferencial). **(A-A´´)** Antera en fase de tetrada y tapetum activo. **(B-B´´)** Antera en etapa de microspora vacuolada y tapetum en MCP temprana. **(C-C´´)** Antera en etapa de polen tricelular y tapetum en MCP muy avanzada. **(D-F)** Control negativo de la inmunofluorescencia de AIA sin anticuerpo primario **(E)** y utilizando el anticuerpo anti-AIA bloqueado previamente con AIA sintético (inmunodeplección) **(F)**. Barras **(A-A´´, B-B´´, D-F)**: 20 µm, **(C-C´´)**: 50 µm.

Como análisis adicional a los resultados cualitativos obtenidos mediante inmunofluroescencia, se procedió a cuantificar la intensidad del marcado fluorescente de las imágenes obtenidas con microscopía confocal. Para ello se seleccionaron las imágenes de proyección máxima, siempre tomadas bajo las mismas condiciones de excitación y ajustes de captura para hacer posible la comparación entre los distintos estadios del desarrollo. Este análisis se llevó a cabo con el programa de análisis de imagen Image-J, y permitió obtener una estimación de los cambios en la acumulación de auxina en las diferentes etapas del desarrollo durante el desarrollo del polen, diferenciando entre las microsporas y pólenes y las células del tapetum.

Los resultados mostraron un descenso significativo en la intensidad de fluorescencia a medida que avanzamos en el desarrollo, esto pudo observarse tanto en el desarrollo del polen como en el desarrollo del tapetum (Fig. 73).

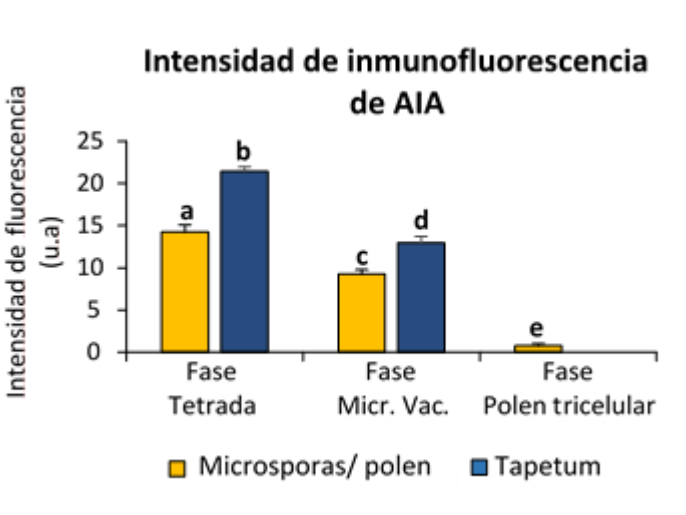


Figura 73. Cuantificación de la intensidad de la señal de inmunofluorescencia del AIA a nivel celular, tanto de microsporas y polen como del tapetum, durante el desarrollo del polen de *Hordeum vulgare*. El histograma muestra el nivel de intensidad de fluorescencia medida en unidades arbitrarias utilizando el programa Image-J. Los datos se obtuvieron a partir del análisis de imágenes de microscopía confocal en proyección máxima de distintas etapas del desarrollo (tetrada, microspora vacuolada y polen tricelular). Las barras representan la media de la intensidad de fluorescencia (±*SEM*) de imágenes procedentes de al menos tres experimentos de inmunofluorescencia y tres réplicas biológicas. Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$.

4.1.5.c Patrones de expresión de los genes *BnTAA1* *BnPIN1-like* durante la embriogénesis de microsporas de *B. napus*

Se analizó la expresión del gen de biosíntesis *BnTAA1* y del gen de transporte polar de auxina *BnPIN1-like* en las fases de tetrada, microspora vacuolada y polen tricelular. El patrón de expresión obtenido fue similar para ambos genes, mostrándose un descenso en los niveles de expresión a medida que avanza el desarrollo del polen (Fig. 74A-B).

Los resultados indicaron expresión del gen *BnTAA1* en las primeras etapas del desarrollo, concretamente en la fase de tetrada, mientras que el nivel de expresión desciende drásticamente en las fases de microspora vacuolada y polen tricelular (Fig. 74A), con valores hasta 10 veces inferiores a los obtenidos en la etapa de tetrada. Estos resultados indicaron que hay síntesis *de novo* de AIA en las primeras etapas del desarrollo del polen.

Del mismo modo, se detectó expresión del gen *BnPIN1-like* en la etapa de tetrada, disminuyendo drásticamente en la etapa de microspora vacuolada, y obteniéndose una expresión prácticamente nula en la etapa más avanzada de polen tricelular (Fig. 74B).

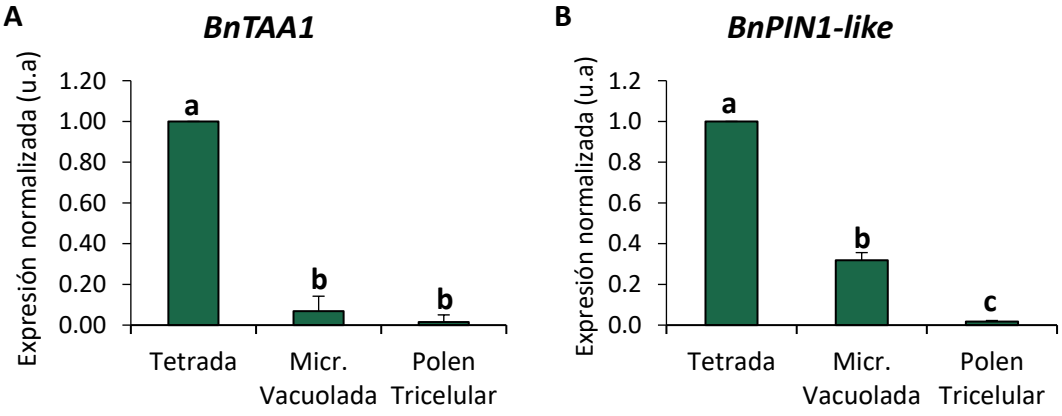


Figura 74. Patrones de expresión génica por qRT-PCR de *BnTAA1* (gen de biosíntesis de auxina) y *BnPIN1-like* (gen de transporte polar de auxina) durante el desarrollo del polen de *Brassica napus*. **(A)** Patrón de expresión temporal del gen *BnTAA1*. **(B)** Patrón de expresión temporal del gen *BnPIN1-like*. Los histogramas muestran cambios en los niveles de mRNA mediante qRT-PCR en diferentes estadios del desarrollo: tetrada, microspora vacuolada y polen tricelular. Cada columna representa el valor promedio de al menos tres muestras biológicas diferentes y tres réplicas técnicas. Los niveles de transcripción fueron normalizados utilizando los valores del gen endógeno de referencia *BnACTINA*. Los datos muestran los niveles de expresión (en unidades arbitrarias: u.a) normalizados a la etapa de tetrada. Las barras representan el error estándar de la media (*SEM*). Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$.

Estos resultados sugieren una baja activación de la biosíntesis y transporte de auxinas durante el desarrollo del polen de *B. napus*.

4.2 DINÁMICA DE LA AUXINA DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS Y EL DESARROLLO DEL POLEN DE *HORDEUM VULGARE*

Con la finalidad de caracterizar la dinámica de la auxina en un sistema modelo de embriogénesis de microsporas en una monocotiledónea, se estudiaron los cambios e implicación de esta hormona durante la embriogénesis de microsporas de la especie *Hordeum vulgare*. Además, también se analizó el papel de la auxina durante el desarrollo del polen, lo que permitió conocer los cambios en la dinámica de esta hormona en ambos desarrollos, así como comparar estos resultados con los obtenidos previamente en la especie dicotiledónea *Brassica napus* (Apartado 4.1).

4.2.1 Caracterización de las etapas principales de la embriogénesis de microsporas de *H. vulgare*

En primer lugar, se seleccionaron y recolectaron espigas inmaduras en el estadio de microspora vacuolada (Fig. 75A), por ser la etapa que presenta un mayor índice de respuesta a la inducción embriogénica. Estas espigas se sometieron a un estrés por frío a 4^{o}C durante 23 días y, trascurrido este tiempo, se procedió a aislar y cultivar las microsporas. Trascurridos entre 4-7 días de cultivo tras la inducción, se pudo observar cómo algunas microsporas habían abandonado la ruta de desarrollo gametofítico, reprogramándose hacia una ruta embriogénica, dividiéndose y formando estructuras multicelulares o proembriones todavía rodeados por la exina, cubierta que envuelve las microsporas (Fig. 75B). A medida que avanza la embriogénesis y continúan las divisiones celulares, la exina se rompe y se forman embriones globulares (Fig. 75C), transicionales, escutelares y, tras 30 días de cultivo (Fig. 75E, F), aparecen embriones coleoptilares maduros (Fig. 75D).

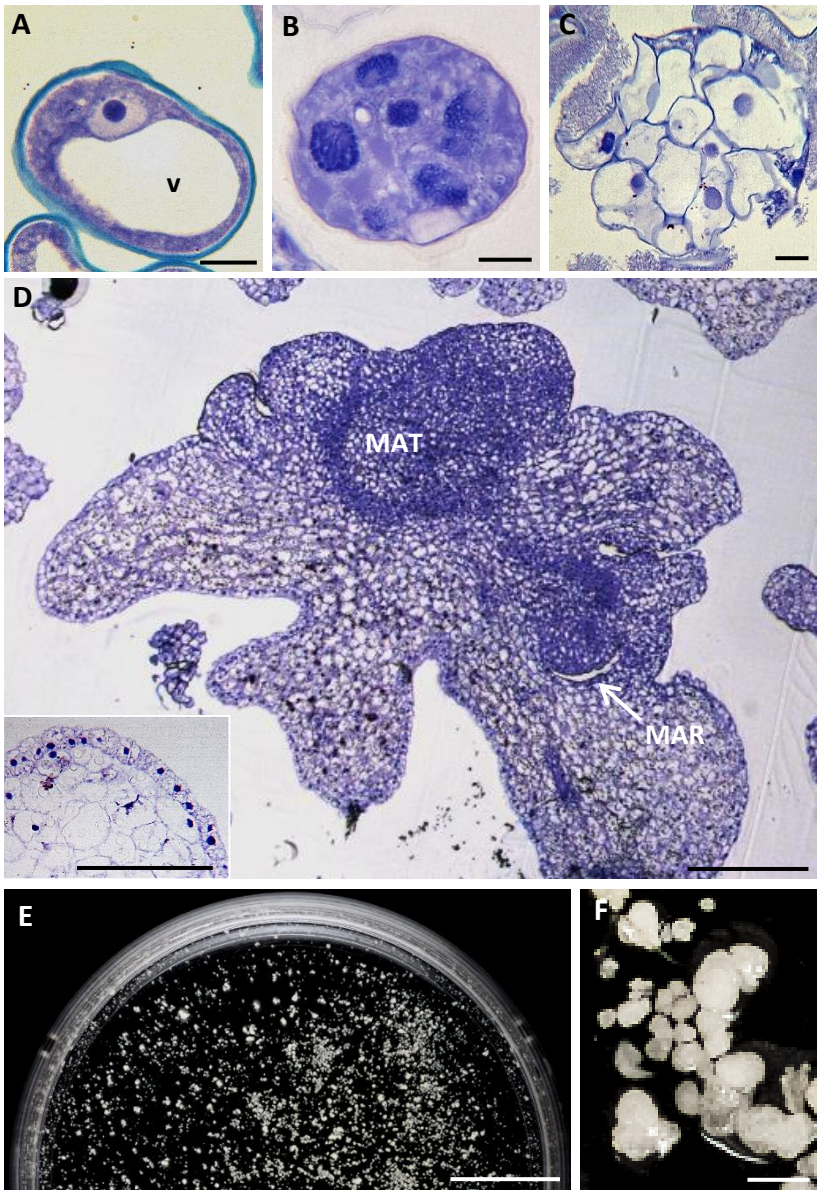


Figura 75. Principales etapas de la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Hordeum vulgare*. Cortes semifinos teñidos con azul de toluidina y observados con microscopía de campo claro. **(A)** Microspora vacuolada aislada al inicio del cultivo. **(B)** Proembrión tras 6 días de cultivo, rodeado por la exina. **(C)** Embrión globular temprano, justo después de la ruptura de la exina. **(D)** Embrión coleoptilar maduro, tras de 30 días de cultivo. Imagen insertada: detalle a mayor aumento de la zona de la epidermis y los tejidos adyacentes. **(E)** Vista panorámica de una placa Petri con embriones formados después de 30 días de cultivo. **(F)** Detalle de embriones a los 30 días de cultivo. V= vacuola; MAT: meristemo apical del tallo; MAR: meristemo apical de la raiz. Barras **(A-C)**: 10 µm, **(D)**: 200 µm, **(E)**: 1 cm, **(F)**: 500 µm, imagen insertada: 100 µm.

4.2.2 Patrón temporal de localización y acumulación de auxina durante la embriogénesis de microsporas de *H. vulgare*

Para analizar el patrón de distribución de AIA durante el desarrollo, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-AIA, el mismo que se utilizó previamente en la localización de auxina durante el desarrollo de *Brassica napus*.

Los resultados del experimento mostraron una intensidad de la señal de fluorescencia muy baja en la etapa de microspora vacuolada, tanto antes como después de aplicar el estrés, localizada en la delgada capa periférica de citoplasma de la célula (Fig. 76A), no observándose señal en ningún caso en su gran vacuola central. Sin embargo, una vez iniciada la embriogénesis, los proembriones mostraron una intensa señal de auxina en todas sus células (Fig. 76B), indicando que existe una gran acumulación de auxina en las células del embrión ya en estadios tempranos del desarrollo. Esta señal se localizó específicamente en el citoplasma de las células, en ningún momento se observó marcado fluorescente en vacuolas, otros orgánulos o paredes celulares. En un estadio más avanzado, tras la ruptura de la capa de exina, los embriones globulares jóvenes también mostraron una alta intensidad de la señal de auxina (Fig. 76C). A medida que avanzaba la embriogénesis se pudo apreciar un aumento cada vez mayor de la intensidad de fluorescencia, siendo especialmente intensa la señal de auxina en la etapa de embrión coleoptilar maduro, y específicamente en sus meristemos (Fig. 76D).

Con la finalidad de demostrar la especificidad del anticuerpo y de los resultados de inmunolocalización, se realizaron experimentos de control tanto negativo como positivo del ensayo. Se llevaron a cabo dos tipos de controles negativos: a) eliminando la incubación de las muestras con el anticuerpo anti-AIA y b) utilizando la técnica de inmunodeplección. Esta última técnica consistió en incubar previamente el anticuerpo anti-AIA con una solución concentrada de auxina sintética. Durante esta incubación, los anticuerpos/ inmunoglobulinas específicas para AIA reaccionaron con las moléculas de auxina presentes en la solución, produciéndose un bloqueo de los sitios activos del anticuerpo y siendo este anticuerpo pre-bloqueado el que se utilizó en los ensayos de inmunofluorescencia.

En ninguno de los controles negativos realizados, por eliminación del anticuerpo anti-AIA (resultados no mostrados) y por inmunodeplección (Fig.77), se observó señal de fluorescencia en las muestras de microspora vacuolada (Fig. 77A, A´, A´´), proembrión (Fig. 77B, B´, B´´) o embrión coleoptilar maduro (Fig. 77C, C´). Estos resultados obtenidos por inmunodeplección indicaron que el anticuerpo anti-AIA utilizado en el ensayo de inmunofluorescencia fue completamente pre-bloqueado por la auxina sintética y no mostró reactividad cruzada con ningún otro antígeno presente en las muestras, lo cual respalda la especificidad del anticuerpo y los resultados obtenidos con esta técnica.

También se realizó un experimento de control positivo utilizando muestras de raíces primarias de cebada en crecimiento, donde se ha descrito una alta acumulación de auxina localizada en sus ápices. Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con el mismo anticuerpo anti-AIA, utilizando cortes semifinos de raíces en crecimiento obtenidas de semillas de cebada germinadas. Los resultados mostraron una alta intensidad de fluorescencia en el ápice de la raíz (Fig. 78A-A´´). Los controles negativos por inmunodeplección en muestras de raíz bloquearon por completo la señal de fluorescencia (Fig. 78B-B´´).

En conjunto, tanto los controles negativos como positivos del ensayo apoyaron la especificidad del anticuerpo y los resultados de inmunofluorescencia.

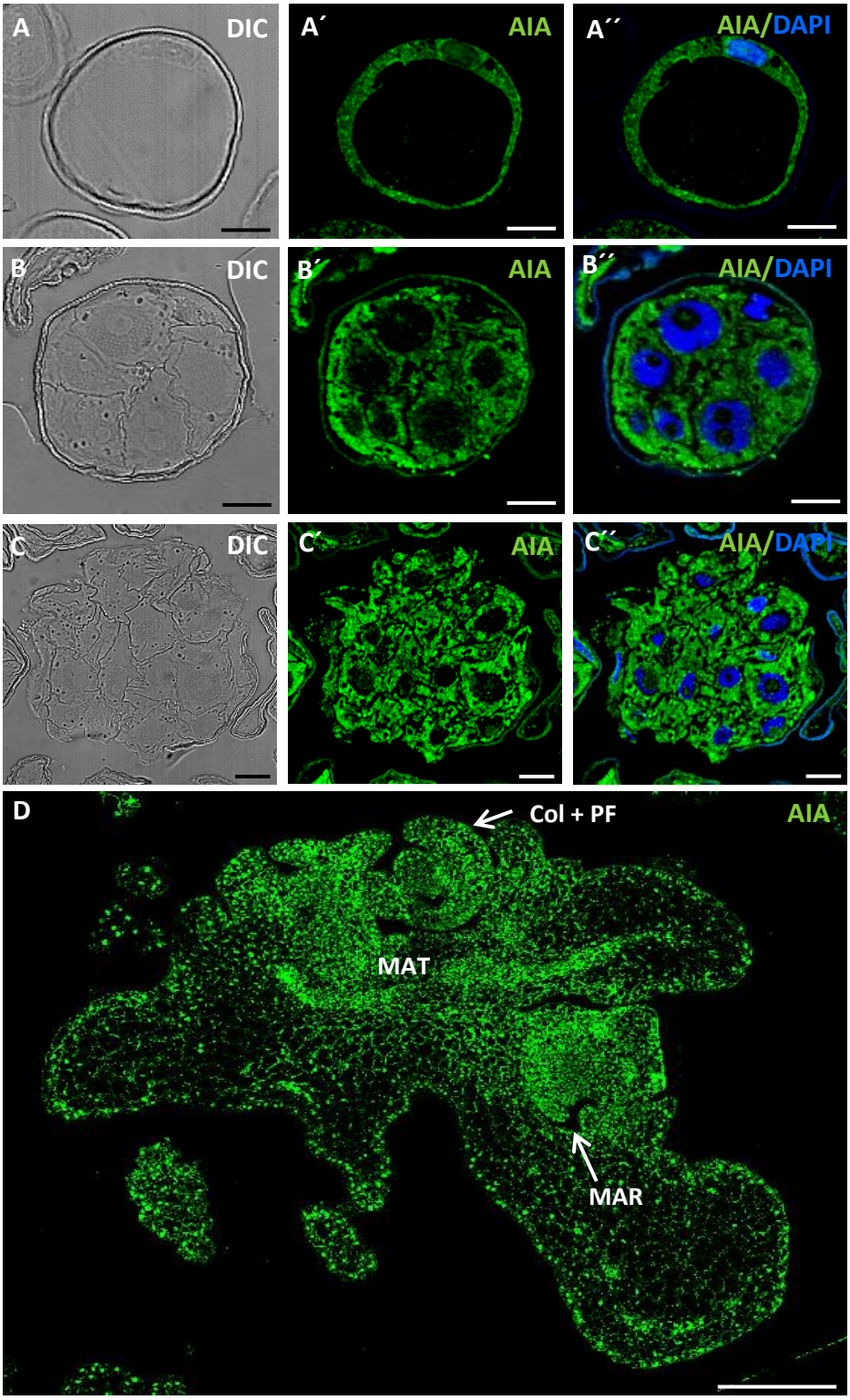


Figura 76. Inmunolocalización de AIA durante la embriogénesis de microsporas de *Hordeum vulgare* inducida por estrés. Las imágenes de microscopía confocal muestran la señal de fluorescencia del AIA (verde), la tinción de núcleos con DAPI (azul) y el DIC (contraste de interferencia diferencial). **(A-A´´)** Microspora vacuolada. **(B-B´´)** Proembrión rodeado por la exina. **(C-C´´)** Embrión globular temprano, justo después de la ruptura de la exina. **(D)** Embrión coleoptilar maduro, tras de 30 días de cultivo. V= vacuola; MAT= meristemo apical del tallo; MAR= meristemo apical de la raiz; Col+PF= coleoptilo y primordio foliar. Barras **(A-C´´)**: 10 µm, **(D)**: 200 µm.

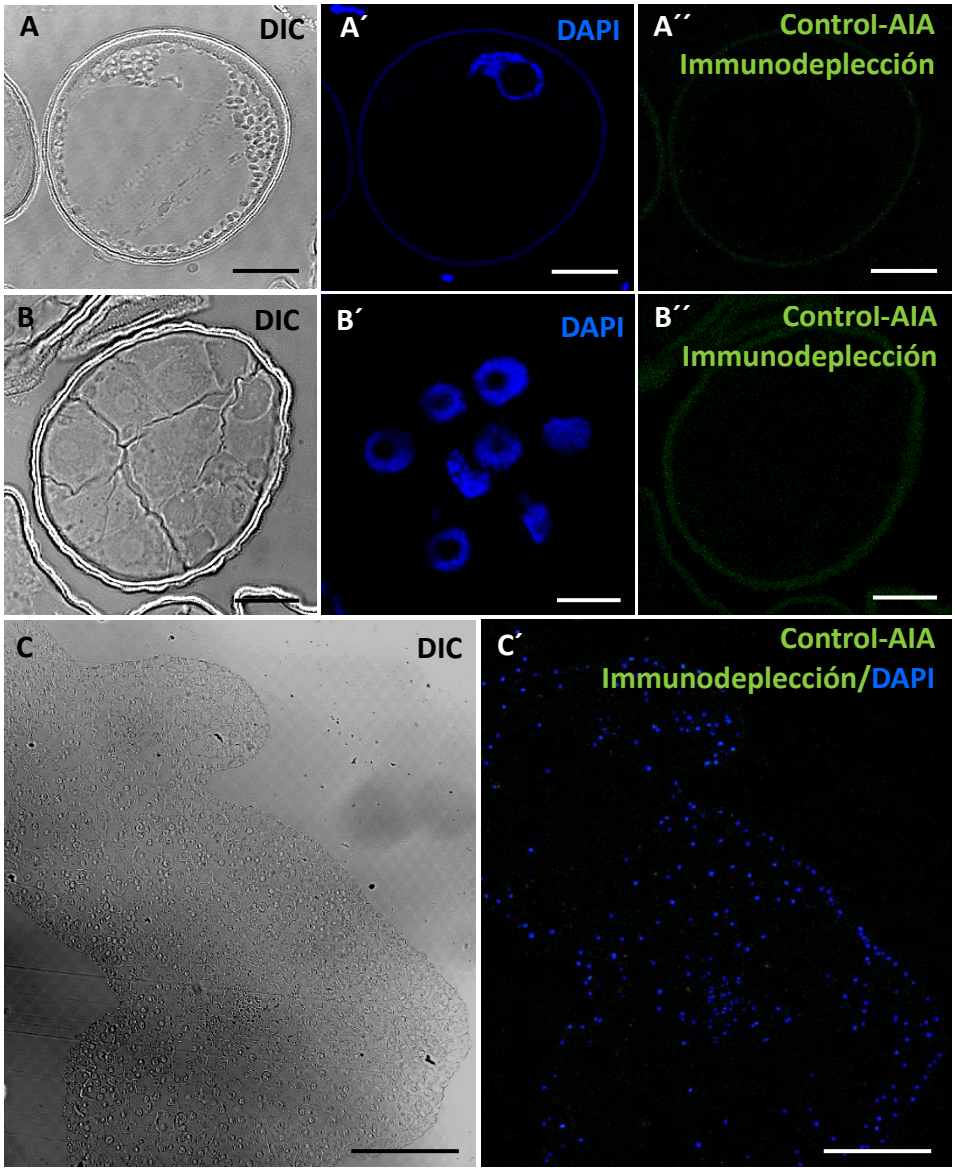


Figura 77. Controles negativos de la inmunofluorescencia de AIA durante la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Hordeum vulgare*, utilizando la técnica de inmunodeplección. Las imágenes de microscopía confocal muestran la señal de fluorescencia del AIA con la inmunodeplección(verde), la tinción de núcleos con DAPI (azul) y el DIC (contraste de interferencia diferencial). El experimento de inmunodeplección se llevó a cabo utilizando el anticuerpo anti-AIA bloqueado previamente con AIA sintético. **(A-A´´)** Microspora vacuolada aislada. **(B-B´´)** Proembrión, rodeado por la exina. **(C-C´)** Región de un embrión coleoptilar maduro, tras 30 días de cultivo. Barras **(A-A´´, B-B´´)**: 10 µm, **(C-C´)**: 150 µm.

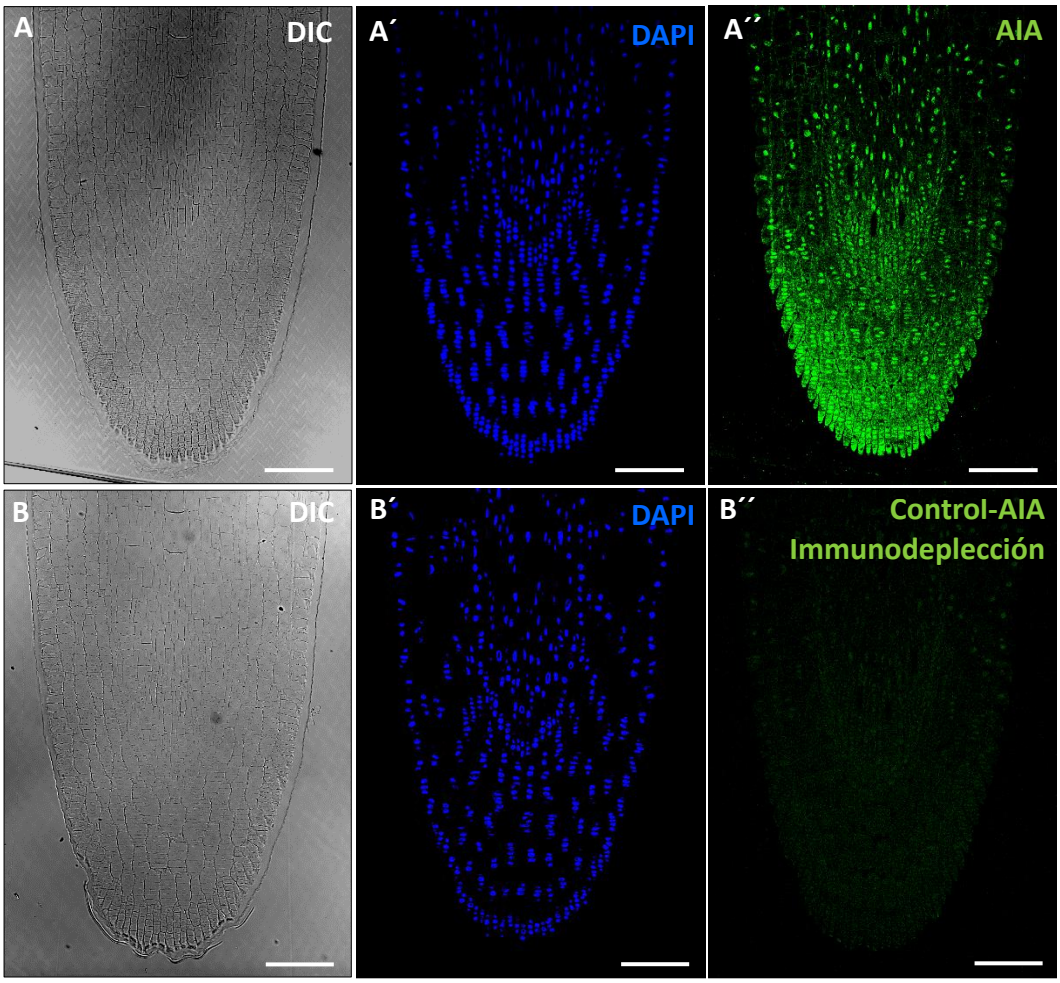


Figura 78. Controles positivos y negativos de la inmunofluorescencia de AIA en ápices de raíz en crecimiento de *Hordeum vulgare*, utilizando la técnica de inmunodeplección. Las imágenes de microscopía confocal muestran la señal de fluorescencia del AIA (verde), la tinción de núcleos con DAPI (azul) y el DIC (contraste de interferencia diferencial). **(A-A´´)** Control positivo de la inmunofluorescencia de AIA. **(B-B´´)** Control negativo de la inmunofluorescencia de AIA, utilizando el anticuerpo anti-AIA bloqueado previamente con AIA sintético (inmunodeplección). Barras: 100 µm.

A continuación, se procedió a cuantificar la intensidad de la señal de fluorescencia de la auxina, utilizando para ello la proyección máxima de las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de las diferentes etapas, todas ellas obtenidas bajo las mismas condiciones de excitación y ajustes de captura para hacer posible la comparación entre los distintos estadios del desarrollo. Este análisis se llevó a cabo con el programa de análisis de imagen Image-J, y permitió obtener una estimación de los cambios en la acumulación de auxina en las diferentes etapas del desarrollo durante la embriogénesis de microsporas (Fig. 79). Antes de la inducción, en la etapa de microspora vacuolada, la señal de fluorescencia fue muy baja, mientras que, tras la inducción, la

intensidad de fluorescencia aumento significativamente en la etapa de proembrión. En estadios más avanzados, los embriones coleoptilares maduros mostraron una intensidad mucho mayor que cualquiera de las etapas anteriores, con un valor más de 30 veces superior al obtenido en proembriones.

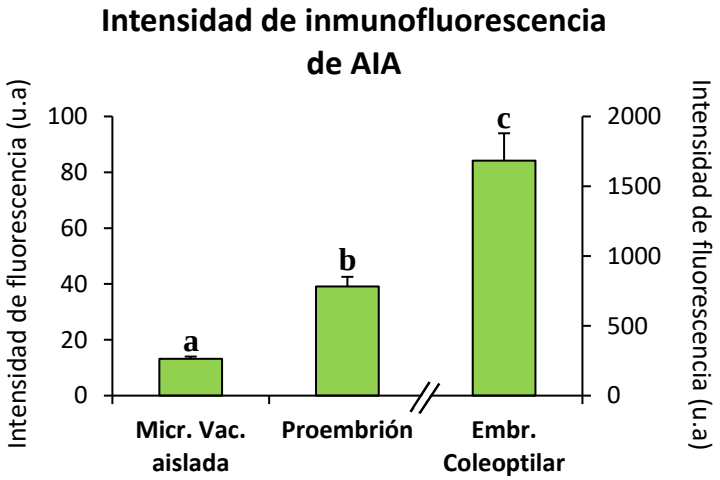


Figura 79. Cuantificación de la intensidad de la señal de inmunofluorescencia de AIA durante la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Hordeum vulgare*. El histograma muestra el nivel de intensidad de fluorescencia medida en unidades arbitrarias utilizando el programa Image-J. Los datos se obtuvieron a partir del análisis de imágenes de microscopía confocal en proyección máxima de distintas etapas del desarrollo (microsporas vacuoladas, proembriones después de 6 días de cultivo y embriones coleoptilares después de 30 días de cultivo). Las barras representan la media de la intensidad de fluorescencia (±SEM) de imágenes procedentes de al menos tres experimentos de inmunofluorescencia y tres réplicas biológicas. Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$.

Estos resultados indicaron una acumulación de auxina endógena desde el comienzo de la embriogénesis de microsporas y su aumento progresivo durante el desarrollo embrionario.

4.2.3 Patrones de expresión de los genes *HvTAR2-like* y *HvPIN1-like* durante la embriogénesis de microsporas de *H. vulgare*

Se analizó la expresión del gen de biosíntesis *HvTAR2-like* y del gen de transporte polar de auxina *HvPIN1-like* en distintas etapas de la embriogénesis de microsporas: microspora vacuolada antes del tratamiento de estrés, microspora vacuolada después

de aplicar el tratamiento de estrés, proembrión a los 6 días de cultivo y embrión coleoptilar tras 30 días de cultivo.

Los resultados obtenidos mostraron niveles bajos de expresión del gen *HvTAR2-like* en la etapa de microspora vacuolada aislada, tanto antes como después del tratamiento de estrés por frío, observándose por el contrario un aumento significativo de la expresión del gen tras la inducción, en la etapa de proembrión (valor de expresión hasta 6 veces superior en proembriones, en comparación con las fases de microspora vacuolada) (Fig. 80A). A su vez, la expresión del gen de biosíntesis de auxina se incrementó enormemente con la progresión de la embriogénesis, en la etapa de embrión coleoptilar maduro (Fig. 80A).

Al analizar la expresión del gen de transporte *HvPIN1-like* se obtuvo un patrón similar al observado para *HvTAR2-like*. Las microsporas vacuoladas aisladas antes y después del tratamiento de estrés mostraron niveles muy bajos de expresión, mientras que la expresión de *HvPIN1-like* aumentó significativamente con el inicio de la embriogénesis, en la etapa de proembrión, aproximadamente el doble en comparación con la etapa de microsporas vacuolada aislada (Fig. 80B). En etapas avanzadas de la embriogénesis, en el embrión coleoptilar maduro, la expresión del gen continuó aumentando, alcanzándose valores hasta 4 veces superiores a los obtenidos en proembrión (Fig. 80B).

Estos resultados indicaron que existe una activación de la biosíntesis de auxinas con el inicio de la embriogénesis de microsporas y una regulación positiva progresiva a medida que avanza el desarrollo del embrión, en paralelo con la activación del transporte polar de auxina (PAT).

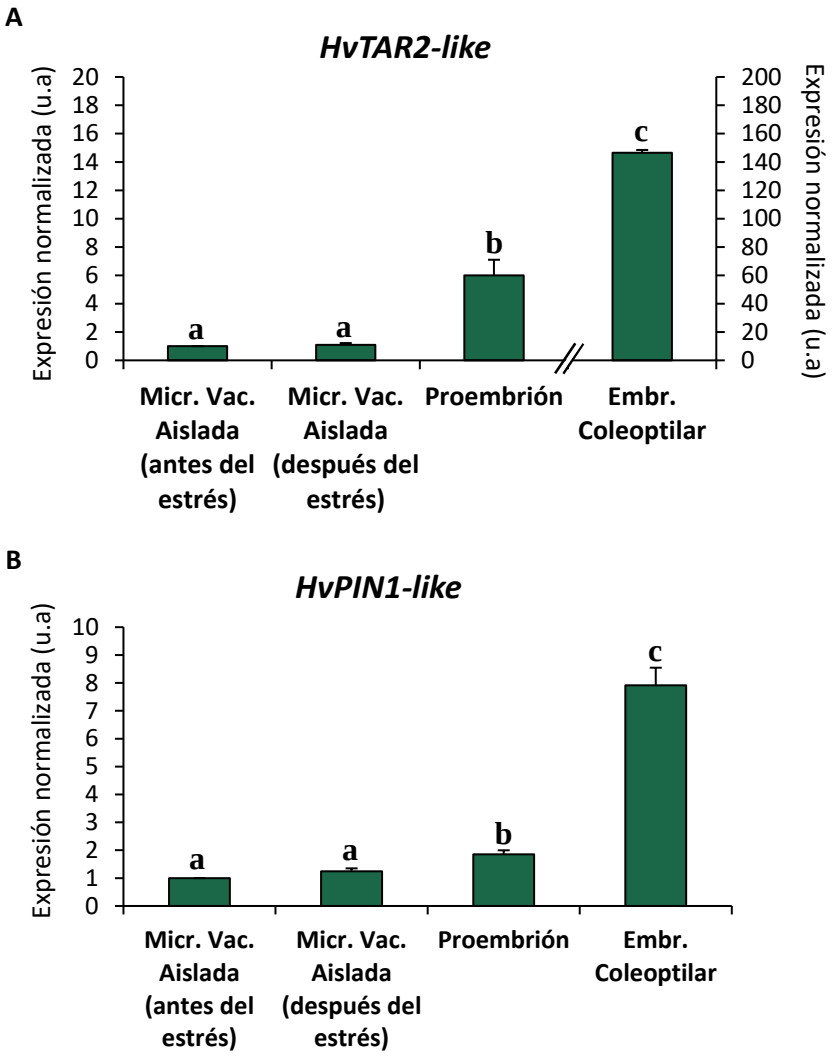


Figura 80. Patrones de expresión génica por qRT-PCR de *HvTAR2-like* (gen de biosíntesis de auxina) y *HvPIN1-like* (gen de transporte polar de auxina) durante la embriogénesis de microsporas de *Hordeum vulgare* inducida por estrés. **(A)** Patrón de expresión temporal del gen *HvTAR2-like*. **(B)** Patrón de expresión temporal del gen *HvPIN1-like*. Los histogramas muestran cambios en los niveles de mRNA mediante qRT-PCR en diferentes estadios del desarrollo: microsporas vacuoladas antes del estrés, microsporas vacuoladas después del estrés, proembriones después de 6 días de cultivo y embriones coleoptilares después de 30 días de cultivo. Cada columna representa el valor promedio de al menos tres muestras biológicas diferentes y tres réplicas técnicas. Los niveles de transcripción fueron normalizados utilizando los valores del gen endógeno de referencia *Hvciclofilina*. Los datos muestran los niveles de expresión (en unidades arbitrarias: u.a) normalizados a la etapa de microspora vacuolada antes del estrés. Las barras representan el error estándar de la media (*SEM*). Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$.

4.2.4 Efecto de inhibidores de la biosíntesis y el transporte polar de auxina sobre la inducción y progresión de la embriogénesis de microsporas de *H. vulgare*

Con el fin de evaluar el posible papel de la auxina en el inicio y la progresión de la embriogénesis de microsporas de *Hordeum vulgare*, se llevaron a cabo análisis funcionales con dos inhibidores que interfieren en la biosíntesis y el transporte polar de auxina. Se utilizaron los compuestos L-Kinurenina, inhibidor de la biosíntesis de auxina, y NPA (ácido N-1-naftilftalámico), inhibidor de PAT, añadiéndolos a distintas concentraciones al inicio del cultivo de microsporas. El efecto de los tratamientos sobre el inicio de la embriogénesis de microsporas inducida por estrés se evaluó mediante la cuantificación del porcentaje de proembriones (primer signo morfológico de inicio de la embriogénesis) presentes en los cultivos control (sin tratamiento) y tratados, a los 6 días de cultivo. El efecto de los inhibidores sobre la progresión de la embriogénesis se evaluó fotografiando las placas control y tratadas tras 30 días de cultivo para evaluar la producción de embriones coleoptilares diferenciados en cada uno de los casos.

El tratamiento de kinurenina se aplicó en los cultivos a concentraciones de 40 y 100 µM. En comparación con los cultivos control, los cultivos tratados con este inhibidor experimentaron una reducción significativa del porcentaje de proembriones a los 6 días de cultivo a medida que aumentaba la dosis del tratamiento (Fig. 81A). El porcentaje promedio de proembriones en los cultivos control alcanzó un valor de 50,64%, mientras que los tratamientos con kinurenina 40 y 100 µM redujeron este porcentaje a 39,44% y 28,85%, respectivamente (Fig. 81A). Trascurridos 30 días, los cultivos control produjeron numerosos embriones; sin embargo, los cultivos tratados con kinurenina mostraron un descenso significativo del número de embriones diferenciados, siendo esta producción mucho menor en la concentración de 100 µM que en la de 40 µM (Fig. 81C).

Los cultivos de microsporas también se trataron con el compuesto NPA (inhibidor de PAT), a concentraciones 3 y 10 µM. El porcentaje promedio de proembriones, después de 6 días de cultivo, se redujo significativamente en los cultivos tratados con NPA, obteniéndose valores de 54,76% en cultivos control y 34,57% y 28,05% en cultivos tratados con las concentraciones de 3 y 10 µM, respectivamente (Fig. 81B). Trabajos previos del grupo han demostrado que los cultivos tratados con NPA también reducen drásticamente la producción de embriones diferenciados a ambas concentraciones, (El-

Tantawy, 2016), indicando que la inhibición de PAT impide en gran medida el desarrollo de los embriones en cultivo.

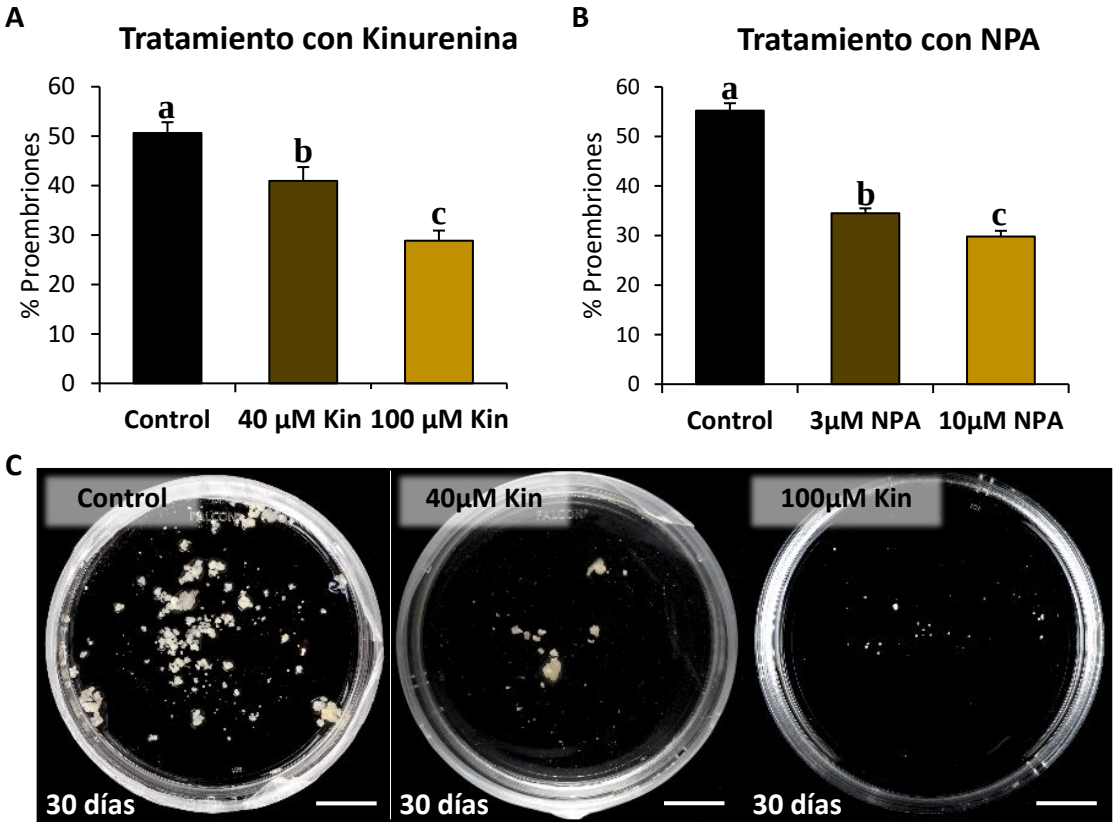


Figura 81. Efecto del tratamiento con kinurenina (inhibidor de la biosíntesis de auxina) y NPA (inhibidor del transporte polar de auxina) en cultivos de embriogénesis de microsporas de *Hordeum vulgare*. (A, B) Cuantificación de la inducción embriogénica, medida a través del porcentaje de proembriones presentes en los cultivos. **(A)** Porcentaje de proembriones en cultivos control y tratados con kinurenina a concentraciones de 40 y 100 µM. **(B)** Porcentaje de proembriones en cultivos control y tratados con NPA a concentraciones de 3 y 10 µM. Los histogramas muestran el valor promedio del porcentaje de proembriones en cultivos control y tratados, después de 6 días de cultivo. Cada columna representa la media de tres repeticiones y tres réplicas biológicas. Las barras representan el error estándar de la media (*SEM*). Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$. **(C)** Placas Petri donde se muestran embriones procedentes de embriogénesis de microsporas tras 30 días de cultivo en medio de cultivo control y tratado con kinurenina a concentraciones de 40 µM y 100 µM. Barras: 1 cm.

Para evaluar el efecto de los tratamientos con kinurenina y NPA sobre la acumulación y distribución de la auxina, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en muestras de cultivos tratados con la concentración más baja de cada uno de los inhibidores.

Los resultados mostraron como la mayoría de los proembriones de los cultivos tratados con kinurenina 40 µM presentaban una baja intensidad de señal de AIA en sus células (Fig. 82A), lo que indica una disminución en los niveles de auxina endógena en comparación con los cultivos control. Las células de los proembriones tratados con kinurenina mostraron morfologías heterogéneas, presentando grandes vacuolas y formas irregulares (Fig. 82A), muy diferentes a las células de los proembriones de los cultivos control, las cuales presentaban forma poligonal, citoplasmas densos y una intensa señal fluorescente de AIA (Fig. 76B, B´, B´´). En los cultivos con kinurenina, solo unos pocos proembriones presentaron la típica organización celular de los cultivos control y una intensidad de fluorescencia más alta que el resto (Fig. 82A).

En cuanto al tratamiento con el inhibidor de PAT, en los cultivos tratados con NPA 3 µM, la intensidad de inmunofluorescencia de AIA de los proembriones fue similar a la de los proembriones procedentes de cultivos control; sin embargo, en los proembriones tratados se observaron algunas regiones citoplásmicas más brillantes que otras (Fig. 82B), lo cual indica una acumulación heterogénea de auxina en las células del proembrión. En etapas más avanzadas del cultivo, los escasos embriones que se desarrollaron en cultivos tratados con NPA 3µM mostraron morfologías irregulares y una baja señal de AIA, con patrones de acumulación anormales (Fig. 82C) en comparación con los embriones de los cultivos control, lo que sugiere defectos en el transporte polar de auxina durante el desarrollo del embrión. Además, algunas células de los embriones tratados con NPA mostraron acumulaciones de AIA en pequeñas regiones/compartimentos intracelulares (imagen insertada en la Fig. 82C), lo que sugiere también alteraciones en la distribución intracelular de auxinas.

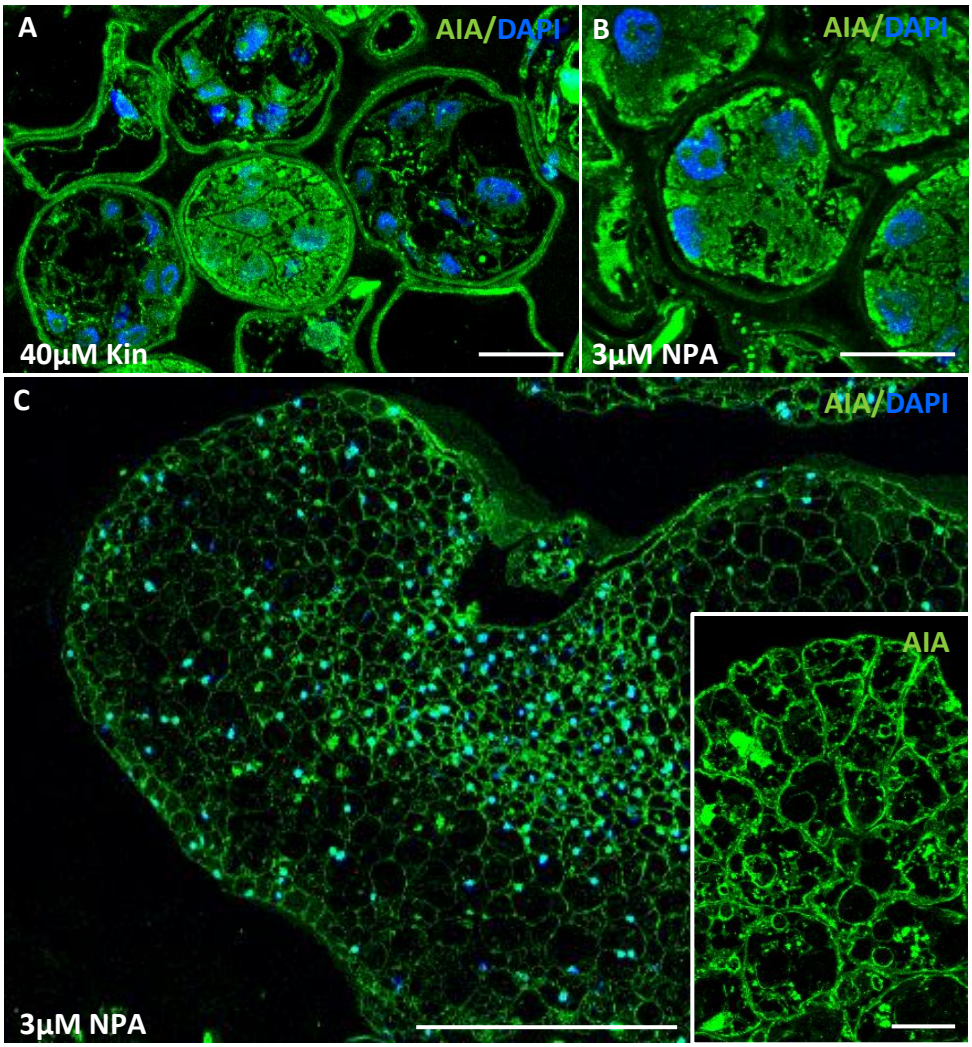


Figura 82. Inmunolocalización de AIA en cultivos de embriogénesis de microsporas de *Hordeum vulgare* tratados con kinurenina (inhibidor de la biosíntesis de auxina) y NPA (inhibidor del transporte polar de auxina). Las imágenes de microscopía confocal muestran la señal de fluorescencia del AIA (verde) y la tinción de núcleos con DAPI (azul). **(A)** Proembriones procedentes de cultivos tratados con una concentración 40 µM de kinurenina, tras 6 días de cultivo. **(B)** Proembriones procedentes de cultivos tratados con una concentración 3 µM de NPA, tras 6 días de cultivo. **(C)** Embrión maduro procedente de cultivo tratado con una concentración 3 µM de NPA, después de 30 días de cultivo. Imagen insertada: Detalle a mayor aumento de un embrión de 30 días procedente de cultivo tratado con una concentración 3 µM de NPA. Barras **(A, B)**: 20 µm, **(C**, Imagen insertada**)**: 200 µm.

4.2.5 Dinámica de la auxina durante el desarrollo del polen de *H. vulgare*

Con la finalidad de comparar la dinámica de la auxina durante los dos programas de desarrollo de la microspora, embriogénico y gametofítico, se procedió a analizar la distribución y acumulación de AIA, así como el patrón de expresión de genes implicados

en la biosíntesis y transporte de auxina, en etapas seleccionadas del desarrollo *in vivo* del grano de polen de *Hordeum vulgare*.

4.2.5.a Caracterización de las etapas principales del desarrollo del polen de *H. vulgare*

In vivo, en el interior de la antera, tiene lugar el desarrollo del grano de polen (Fig. 83A), el cual consta de dos procesos principales: la formación de las microsporas (o microsporogénesis) y, seguidamente, la formación del grano de polen (o microgametogénesis). Durante la microsporogénesis, las microsporas que se forman tras la meiosis experimentan cambios estructurales y funcionales que originan en última instancia la microspora vacuolada, una célula caracterizada por la gran vacuola que ocupa la mayor parte de su citoplasma y que desplaza el núcleo hacia la periferia (Fig. 83B). A continuación, coincidiendo con el inicio de la microgametogénesis, tiene lugar una primera división mitótica de la microspora vacuolada que origina el grano de polen bicelular. Este estadio del grano de polen consta de dos células: una célula vegetativa y una célula generativa. La célula vegetativa es de gran tamaño y su núcleo (denominado núcleo vegetativo) presenta un patrón de cromatina muy descondensado, característico de células transcripcionalmente activas; en el interior de la célula vegetativa, se encuentra la célula generativa, con un tamaño mucho menor, un citoplasma muy reducido y un núcleo con la cromatina muy condensada (Fig. 83C). Continuando la ruta de desarrollo gametofítico, el grano de polen aumenta progresivamente su tamaño y tiene lugar una segunda división mitótica, en este caso de la célula generativa, que dará lugar a la formación de dos células espermáticas, produciéndose un grano de polen tricelular (Fig. 83D).

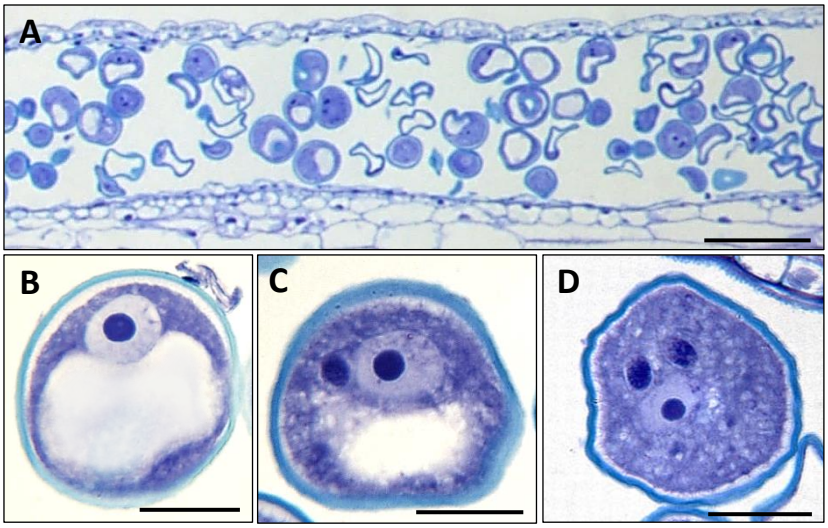


Figura 83. Principales etapas del desarrollo gametofífico del polen de *Hordeum vulgare*. **(A)** Panorámica de una antera con granos de polen en el interior. **(B)** Microspora vacuolada. **(C)** Polen bicelular. **(D)** Polen tricelular. Barras: 15 µm.

4.2.5.b Patrón temporal de localización y acumulación de auxina durante el desarrollo del polen de *Hordeum vulgare*

Se llevó a cabo un estudio de localización subcelular de AIA durante dos estadios del desarrollo: microspora vacuolada y polen tricelular. Para ello se realizaron ensayos de inmunofluorescencia y posterior análisis confocal del marcado con el anticuerpo anti-AIA utilizado en ensayos anteriores.

Los resultados obtenidos mostraron una alta intensidad de la señal de fluorescencia en la etapa de microspora vacuolada, localizada de forma homogénea en el citoplasma de la célula (Fig. 84A´´, A´´´), mientras que, manteniendo las mismas condiciones de excitación adquisición, en la etapa de polen maduro la señal de auxina fue mucho menos intensa (Fig. 84B´´, B´´´).

A continuación, se procedió a cuantificar la intensidad de la señal de fluorescencia de la auxina, utilizando el software de análisis de imagen Image-J, lo que nos permitió obtener una estimación cuantitativa de los cambios en la acumulación de auxina en las etapas de microspora vacuolada y polen maduro del desarrollo gametofítico de *Hordeum vulgare* (Fig. 85). Los resultados obtenidos en este ensayo mostraron un descenso significativo de la señal de fluorescencia en la etapa de polen maduro, con

valores hasta cinco veces inferiores a los obtenidos en la etapa de microspora vacuolada (Fig. 85).

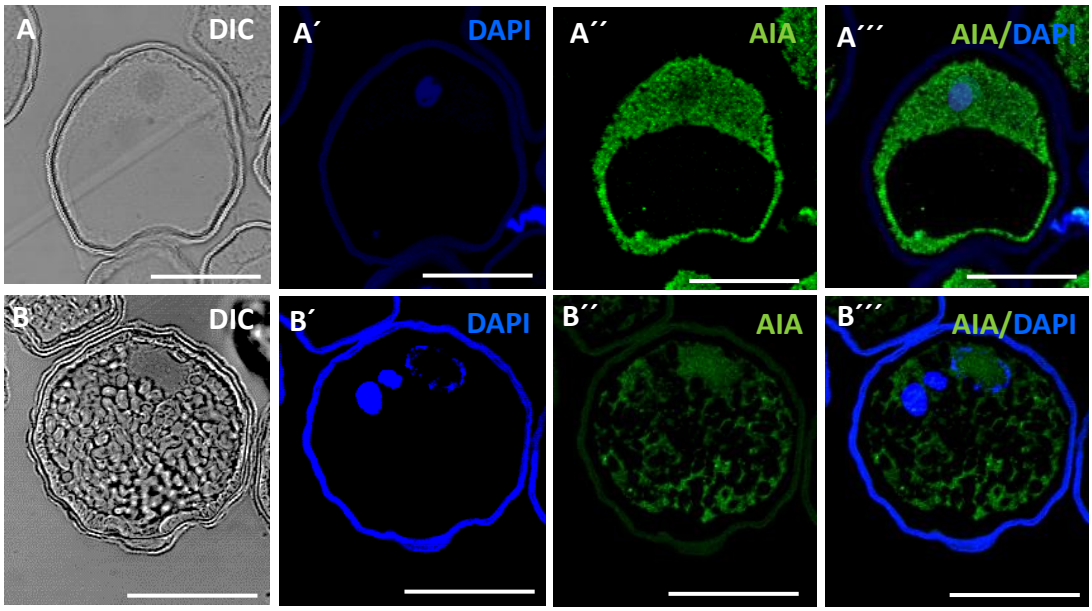


Figura 84. Inmunolocalización de AIA durante el desarrollo del polen de *Hordeum vulgare.* Las imágenes de microscopía confocal muestran la señal de fluorescencia del AIA (verde), la tinción de núcleos con DAPI (azul) y el DIC (contraste de interferencia diferencial). **(A- A´´´)** Microspora vacuolada. **(B- B´´´)** Polen tricelular. V= vacuola. Barras: 20 µm.

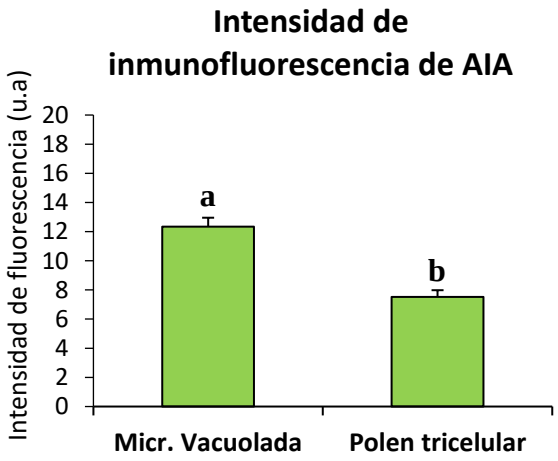


Figura 85. Cuantificación de la intensidad de la señal de inmunofluorescencia durante el desarrollo del polen de *Hordeum vulgare*. El histograma muestra el nivel de intensidad de fluorescencia medida en unidades arbitrarias utilizando el programa Image-J. Los datos se obtuvieron a partir del análisis de imágenes de microscopía confocal en proyección máxima de dos etapas del desarrollo: microspora vacuolada y polen tricelular. Las barras representan la media de la intensidad de fluorescencia (±SEM) de imágenes procedentes de al menos tres experimentos de inmunofluorescencia y tres réplicas biológicas. Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$.

Estos resultados indicaron una acumulación de auxina endógena al final de la microsporogénesis, en el estadio de microspora vacuolada, y un descenso de la misma con la maduración del polen.

4.2.5.c Patrones de expresión de los genes *HvTAR2-like* y *HvPIN1-like* durante el desarrollo del polen de *H. vulgare*

También se analizó la expresión de genes relacionados con la auxina en las mismas etapas del desarrollo utilizadas en los experimentos de inmunofluorescencia: microspora vacuolada y polen tricelular. Para ello se seleccionaron los mismos genes utilizados previamente en el estudio del desarrollo embriogénico: *HvTAR2-like*, gen implicado en la biosíntesis de AIA, y *HvPIN1-like*, gen implicado en el transporte polar de AIA.

Los resultados mostraron un patrón de expresión similar para ambos genes. La expresión del gen *HvTAR2-like* fue significativamente superior en la etapa de microspora vacuolada, con valores de más del doble en comparación con los obtenidos en la etapa de polen maduro (Fig. 86A). Del mismo modo, al analizar los datos de expresión del gen *HvPIN1-like* se observaron de nuevo valores de expresión muy superiores (hasta 3 veces más expresión) en la etapa de microspora vacuolada, en comparación con los valores obtenidos en la etapa de polen maduro (Fig. 86B).

Analizando en conjunto los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia y con los análisis de expresión génica, ambas técnicas indican que hay síntesis *de novo* de AIA en las primeras etapas del desarrollo del polen, en paralelo con la activación de PAT, mientras que existe una regulación negativa de ambas a medida que progresa la maduración del grano de polen.

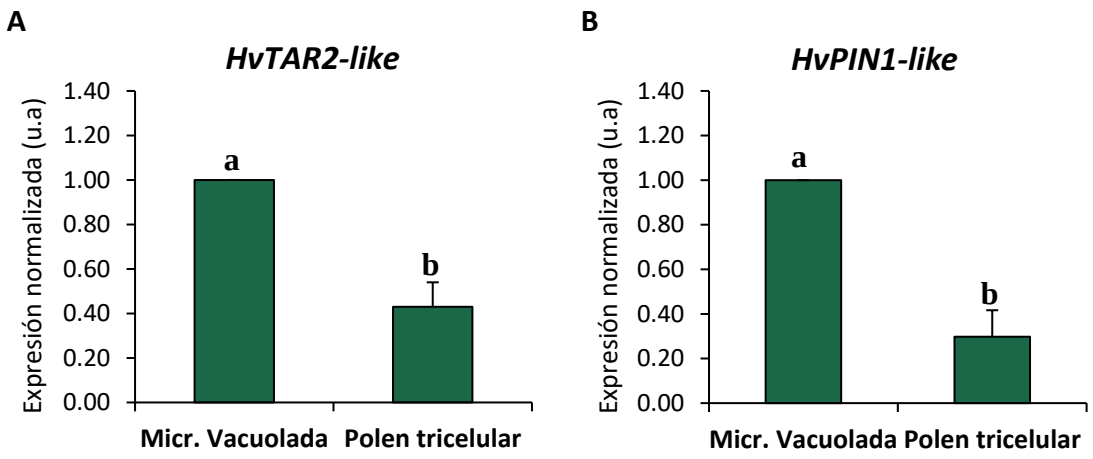


Figura 86. Patrones de expresión génica por qRT-PCR de *HvTAR2-like* (gen de biosíntesis de auxina) y *HvPIN1-like* (gen de transporte polar de auxina) durante el desarrollo del polen de *Hordeum vulgare*. **(A)** Patrón de expresión temporal del gen *HvTAR2-like*. **(B)** Patrón de expresión temporal del gen *HvPIN1-like*. Los histogramas muestran cambios en los niveles de mRNA mediante qRT-PCR los estadios de microspora vacuolada y polen tricelular. Cada columna representa el valor promedio de al menos tres muestras biológicas diferentes y tres réplicas técnicas. Los niveles de transcripción fueron normalizados utilizando los valores del gen endógeno de referencia *HvCiclofilina*. Los datos muestran los niveles de expresión (en unidades arbitrarias: u.a) normalizados a la etapa de microspora vacuolada. Las barras representan el error estándar de la media (*SEM*). Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$.

4.3 DINÁMICA DE LA CITOQUININA DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS DE *BRASSICA NAPUS* y *HORDEUM VULGARE*

A pesar de que son muchas las hormonas que pueden estar implicadas en la regulación del proceso de embriogénesis de microsporas, los avances más recientes destacan la interacción de auxinas y citoquininas en la coordinación de múltiples aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas (Hurný *et al*., 2020). Por ello, tras estudiar la dinámica de la auxina durante el desarrollo embriogénico y gametofítico de la microspora en colza y cebada, nos planteamos realizar un estudio similar con la citoquinina. Las citoquininas endógenas son derivados de la adenina y se clasifican en dos grupos dependiendo de si poseen una cadena lateral de naturaleza isoprenoide o aromática, siendo las primeras las más abundantes. Dentro de las citoquininas de tipo isoprenoide se encuentra la isopenteniladenina (iP), la *trans*-zeatina (*t*Z), la *cis*-zeatina (*c*Z) y la dihidrozeatina (DHZ).

Aunque según la bibliografía existe mucha variación dependiendo de la especie vegetal, el tejido y la etapa de desarrollo, la *trans*- zeatina ha sido descrita como una de las formas más abundantes de citoquinina en la planta, destacando además por su alta actividad.

En esta tesis se ha procedido a analizar la dinámica y posible implicación de la citoquinina en su forma *trans*-zeatina durante el inicio y progresión de la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Brassica napus* y *Hordeum vulgare*.

4.3.1 Patrón temporal de concentración y localización de citoquinina durante la embriogénesis de microsporas de *B. napus*

En primer lugar, se utilizó la técnica de cromatografía de líquidos de alta definición acoplada a espectrometría de masas (U-HPLC-MS) para evaluar el cambio en los niveles de *trans*-zeatina (*t*Z) endógena de distintos estadios del desarrollo embriogénico de microsporas de *Brassica napus*: microspora vacuolada aislada, proembrión, embrión globular y embrión cotiledonar. Este análisis se realizó en el servicio de Análisis de Hormonas del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS) del CSIC, en colaboración con el grupo del Dr. Alfonso Albacete.

Los resultados mostraron una concentración baja de *t*Z en etapas tempranas de la embriogénesis, tanto en el momento previo a la inducción (en el estadio de microspora vacuolada aislada), como en las primeras fases del desarrollo (en proembrión), donde se detectó la concentración de *t*Z más baja. Según avanzamos en el desarrollo se observó un gran aumento en la concentración de la hormona, alcanzándose niveles de casi 300 ng de *t*Z por gramo de peso fresco (gFW) de muestra en la etapa de embrión globular, y más de 1000 ng/gFW en embriones cotiledonares, siendo esta última fase del desarrollo la que presentó una mayor concentración de *t*Z (Fig.87).

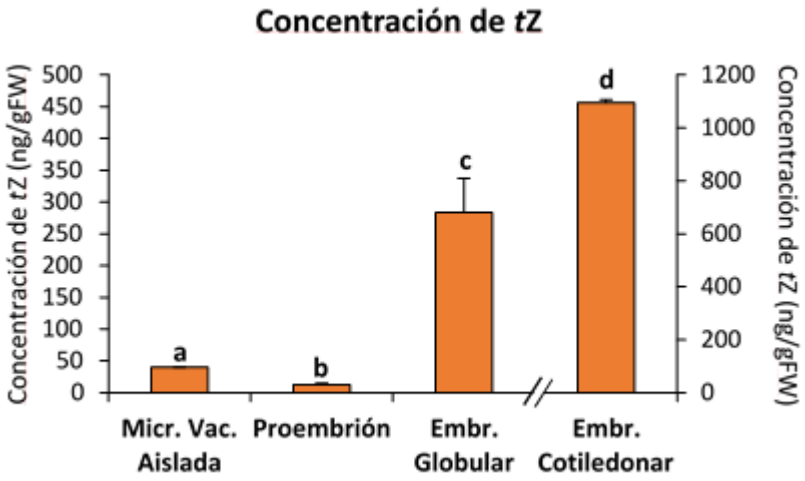


Figura 87. Cuantificación de la concentración de citoquinina endógena de tipo zeatina en su forma *trans* (*trans*-zeatina; *t*-Z) durante el desarrollo embriogénico de *Brassica napus,* utilizando cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray (LC-ESI-MS/MS). Las columnas muestran el valor promedio de la concentración de *t*Z de muestras de distintas etapas del desarrollo: microspora vacuolada aislada (Micr. Vac. Aislada), proembrión, embrión globular y embrión cotiledonar. Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$.

Estos resultados sugieren una relación entre bajas concentraciones de *t*Z en fases tempranas de la embriogénesis, donde predomina una alta actividad proliferativa, a la vez que una asociación entre altos niveles de *t*Z y la diferenciación embriogénica en etapas avanzadas.

Para analizar los patrones de distribución de *trans*-zeatina durante el desarrollo, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-*t*Z.

Los resultados mostraron ausencia de señal tanto al inicio del proceso, en la fase de microspora vacuolada aislada (Fig. 88A-A´´), como en fases iniciales tras la inducción, en la fase de proembrión (Fig. 88B-B´´), mientras que etapas posteriores del desarrollo, en el estadio de embrión globular/corazón, sí se pudo observar una señal de fluorescencia de intensidad media localizada de forma heterogénea en el citoplasma de algunas células del embrión (Fig. 88C-C´´). Al analizar los resultados obtenidos en etapas más avanzadas del desarrollo, pudo observarse un incremento de la intensidad de la señal tanto en la fase de embrión torpedo (Fig. 89A-A´´) como en la fase de embrión cotiledonar (Fig. 89B-B´). En el embrión torpedo, la señal de *t*Z aparecía más intensa en las células en diferenciación de la epidermis y en el eje vascular, mientras que las zonas más proliferantes de los primordios de los cotiledones y el córtex presentaban menor intensidad de la señal. En la fase de embrión cotiledonar, la señal aparecía principalmente y con un marcado muy intenso en el citoplasma de las células localizadas en la periferia del embrión, las cuales se encuentran formando la capa de epidermis (Fig. 89B´).

También se realizaron experimentos de control negativo por inmunodeplección, con el fin de demostrar la especificidad del anticuerpo y de los resultados de inmunolocalización. Esta técnica consistió en incubar previamente el anticuerpo anti-*t*Z con una solución concentrada del antígeno, de forma que el anticuerpo quedara bloqueado, y fue esta solución de anticuerpo pre-bloqueado la que se utilizó en el ensayo de inmunofluorescencia. Los resultados de este experimento no revelaron señal de fluorescencia en ninguna estructura celular del embrión en ninguna de las fases (Fig. 89C-C´), lo cual apoya la especificidad del anticuerpo y los resultados obtenidos mediante esta técnica.

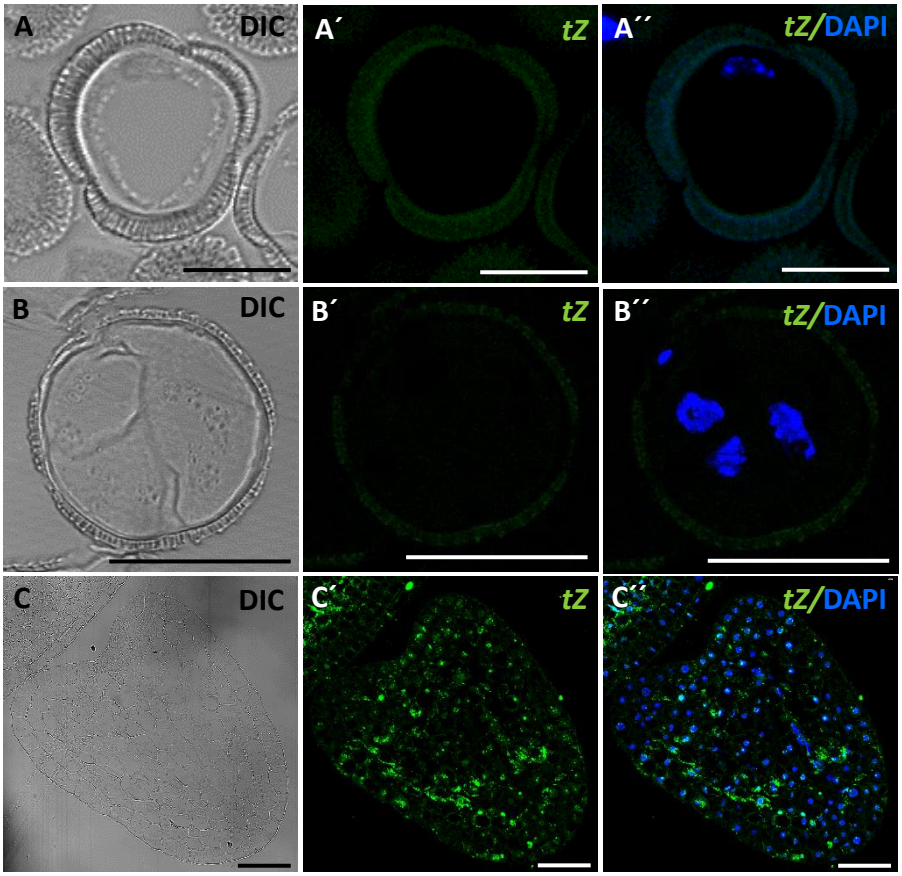


Figura 88. Inmunolocalización de citoquinina de tipo zeatina en su forma *trans* (*trans*-zeatina; *t*Z) durante las primeras etapas de la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Brassica napus*. Las imágenes de microscopía confocal muestran la señal de fluorescencia de *t*Z (verde), la tinción de núcleos con DAPI (azul) y el DIC (contraste de interferencia diferencial). **(A-A´´)** Microspora vacuolada. **(B-B´´)** Proembrión. **(C-C´´)** Embrión globular/corazón. Barras **(A-A´´)**: 10 µm, **(B-B´´):** 25 µm, **(C-C´´)**: 50 µm.

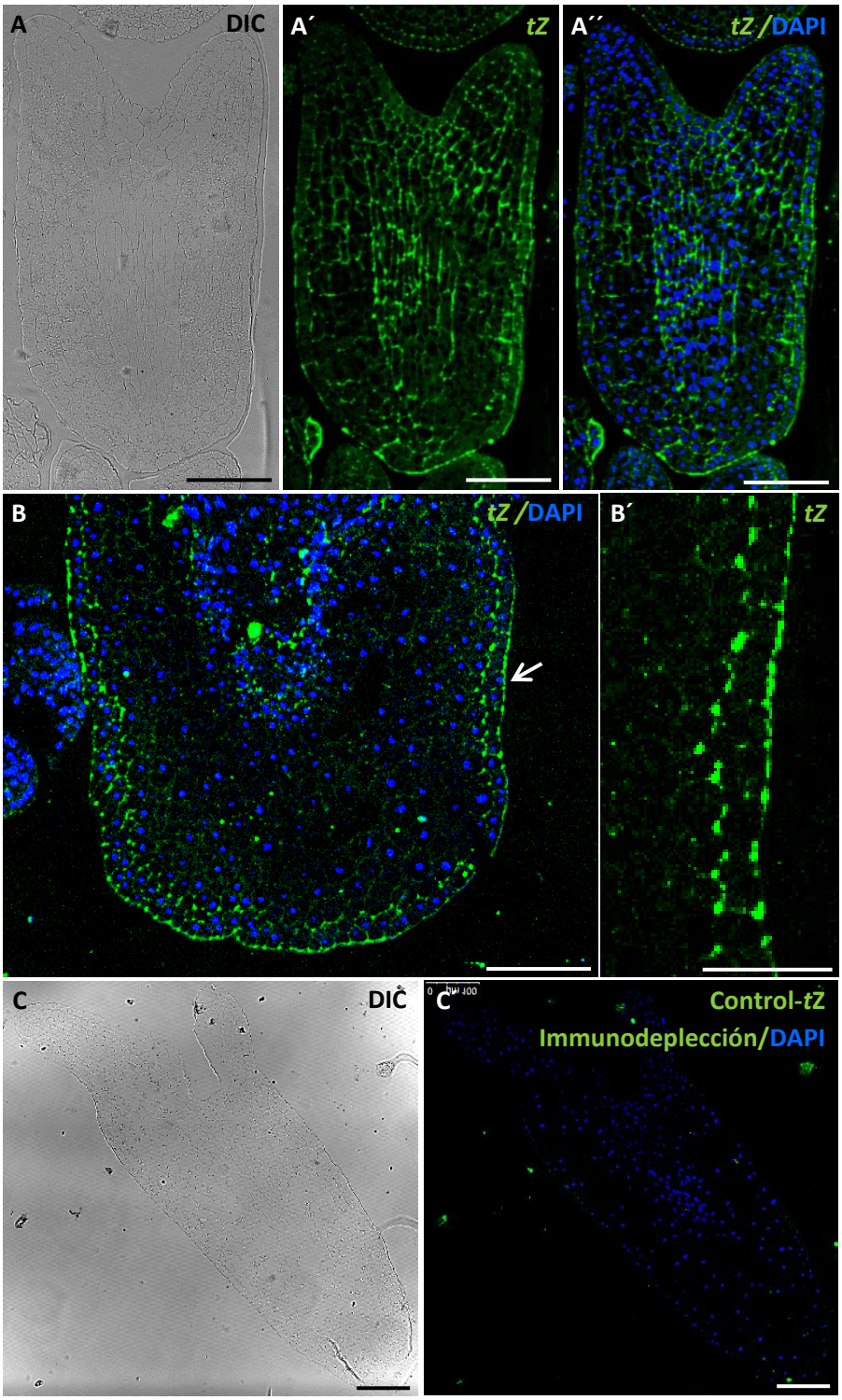


Figura 89. Inmunolocalización de citoquinina de tipo zeatina en su forma *trans* (*trans*-zeatina; *t*Z) en etapas avanzadas de la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Brassica napus*. Las imágenes de microscopía confocal muestran la señal de fluorescencia de *t*Z (verde), la tinción de núcleos con DAPI (azul) y el DIC (contraste de interferencia diferencial). **(A-A´´)** Embrión torpedo. **(B-B´)** Embrión cotiledonar, **(B´)** detalle de la señal de *t*Z en la zona de la epidermis y los tejidos adyacentes. **(C-C´)** Control negativo por inmunodeplección de la inmunofluorescencia del anticuerpo anti-*t*Z, previamente bloqueado con la citoquinina sintética 6-Bencilaminopurina (BAP), en la fase de embrión cotiledonar. Barras **(A-A´´, B, C-C´)**: 100 µm, **(B´):** 50 µm.

4.3.2 Patrones de expresión de genes de biosíntesis, señalización y degradación de citoquininas durante la embriogénesis de microsporas de *B. napus*

A pesar del importante papel que juega la citoquinina a lo largo de numerosos procesos del desarrollo de la planta, hoy en día aún se desconoce en gran medida la forma en que participan los distintos componentes de sus rutas de biosíntesis, transporte, señalización o degradación. En este estudio se llevó a cabo un análisis de expresión por qRT-PCR de distintos genes implicados en la biosíntesis, señalización y degradación de citoquininas, durante la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Brassica napus*. La justificación de los genes seleccionados se detalla a continuación.

La biosíntesis *de novo* de citoquininas implica la actividad en cascada de tres familias de genes: isopenteniltransferasas (IPT), citocromo monooxigenasas P450 (CYP735A) y fosforibohidrolasas 5´-monofosfato o *LONELY GUY* (LOG). El primer paso, y también el limitante de la velocidad de biosíntesis de citoquinina, es catalizado por las enzimas IPT. En *Arabidopsis thaliana* se han identificado nueve genes dentro de la familia de los IPT, siete de ellos codifican para ATP/ADP-IPTs (*IPT1*, *IPT3*, *IPT4*, *IPT5*, *IPT6*, *IPT7* e *IPT8*) y los otros dos codifican para tRNA-IPTs (*IPT2* e *IPT9*). En este trabajo se han analizado los niveles de expresión de los homólogos en *Brassica napus* de dos de estos genes IPT: *BnIPT9* y *BnIPT1-2.*

En este estudio también se han tenido en cuenta componentes de la ruta de señalización y degradación de citoquinina. Las citoquininas presentan una vía de señalización que implica la activación de proteínas de tipo histidina kinasa (HK, *Histidin kinase*), encargadas a su vez de activar a los reguladores de respuesta a citoquinina (RR, *Response Regulators*), que pueden ser de tipo A o de tipo B. En *Arabidopsis*, el grupo de los ARR de tipo A agrupa a las proteínas ARR3-9 y ARR15-17, mientras que el grupo de los ARR de tipo B incluye las proteínas ARR1-2, ARR10-14 y ARR18-21. La activación por fosforilación de los reguladores de respuesta de tipo A bloquea la fosforilación de ARR tipo B, mientras que la fosforilación de reguladores de respuesta de tipo B induce su unión al DNA e inicia la transcripción de genes de respuesta a citoquinina, incluyendo los reguladores de respuesta de tipo A, los cuales actúan como inhibidores de señalización de citoquinina. Dentro de los reguladores de respuesta se han seleccionado

para el estudio de expresión los genes *BnARR5*, de tipo A (inhibidor de la señalización de citoquininas), y *BnARR21*, de tipo B (activador de la señalización de citoquininas).

En este proceso de regulación de citoquininas también se debe tener en cuenta el proceso de degradación de la hormona, lo cual implica la actividad de enzimas citoquinina oxidasa/deshidrogenasa (CKX), codificadas por una familia multigénica que en *A. thaliana* comprende siete genes (CKX1-CKX7) y entre los que se ha seleccionado el homólogo en *Brassica napus BnCKX2* para llevar a cabo el análisis de su expresión génica.

Al analizar la expresión de los genes de biosíntesis *BnIPT9* y *BnIPT1-2*, se observó un patrón de expresión similar en ambos genes, con niveles de expresión bajos en las etapas de microspora vacuolada aislada y proembrión, y un aumento significativo de la misma en los estadios más avanzados del desarrollo, en la fase de embrión globular y embrión cotiledonar (Fig. 90A, B). En el caso de *BnIPT9* se obtuvieron niveles de expresión muy bajos antes de la inducción, en la fase de microspora vacuolada aislada, y un aumento significativo de la expresión tras la inducción, en la fase de proembrión, con respecto a la cual se obtuvieron valores hasta 3 veces superiores en las fases de embrión globular y embrión cotiledonar (Fig. 90A). En cuanto a la expresión del gen de biosíntesis *BnIPT1-2*, de nuevo se obtuvieron bajos niveles de expresión en la fase de microspora vacuolada, en este caso similares a los obtenidos en la fase de proembrión, valores que se duplicaron con el avance del desarrollo embriogénico, en las fases de embrión globular y embrión cotiledonar (Fig. 90B).

Los resultados obtenidos al analizar la expresión del gen de degradación *BnCKX2*, mostraron niveles de expresión significativamente mayores en las fases de microspora vacuolada aislada y proembrión, en comparación con una muy baja expresión del gen en la etapa de embrión globular y una expresión no detectada en la etapa más avanzada del desarrollo, en el embrión cotiledonar (Fig. 90C).

Al analizar la expresión del gen regulador de respuesta a citoquinina de tipo A, *BnARR5* (inhibidor de la señalización de citoquininas), tan solo se detectó expresión del mismo antes de la inducción embriogénica, en la etapa de microspora vacuolada aislada, no detectándose amplificación génica en ningunas de las etapas posteriores a la inducción (en proembrión, embrión globular o embrión cotiledonar) (Fig. 90D).

Por el contrario, la expresión del gen regulador de respuesta a citoquinina de tipo B, *BnARR21* (activador de la señal de citoquininas), mostró un patrón opuesto al observado en el gen regulador de respuesta a citoquinina de tipo A *BnARR5*, no detectándose expresión del gen en la etapa de microspora vacuolada aislada y sí en el resto de las fases del desarrollo. Los niveles de expresión en la etapa de proembrión fueron significativamente superiores con respecto a la microspora vacuolada, pero muy inferiores a los obtenidos en las etapas más avanzadas del desarrollo. En la etapa de embrión globular se alcanzaron valores más de nueve veces superiores a los obtenidos en la fase de proembrión y, en la fase más avanzada, en el embrión cotiledonar, los valores de expresión aumentaron hasta en 12 veces (Fig. 90E), con respecto a la etapa de proembrión.

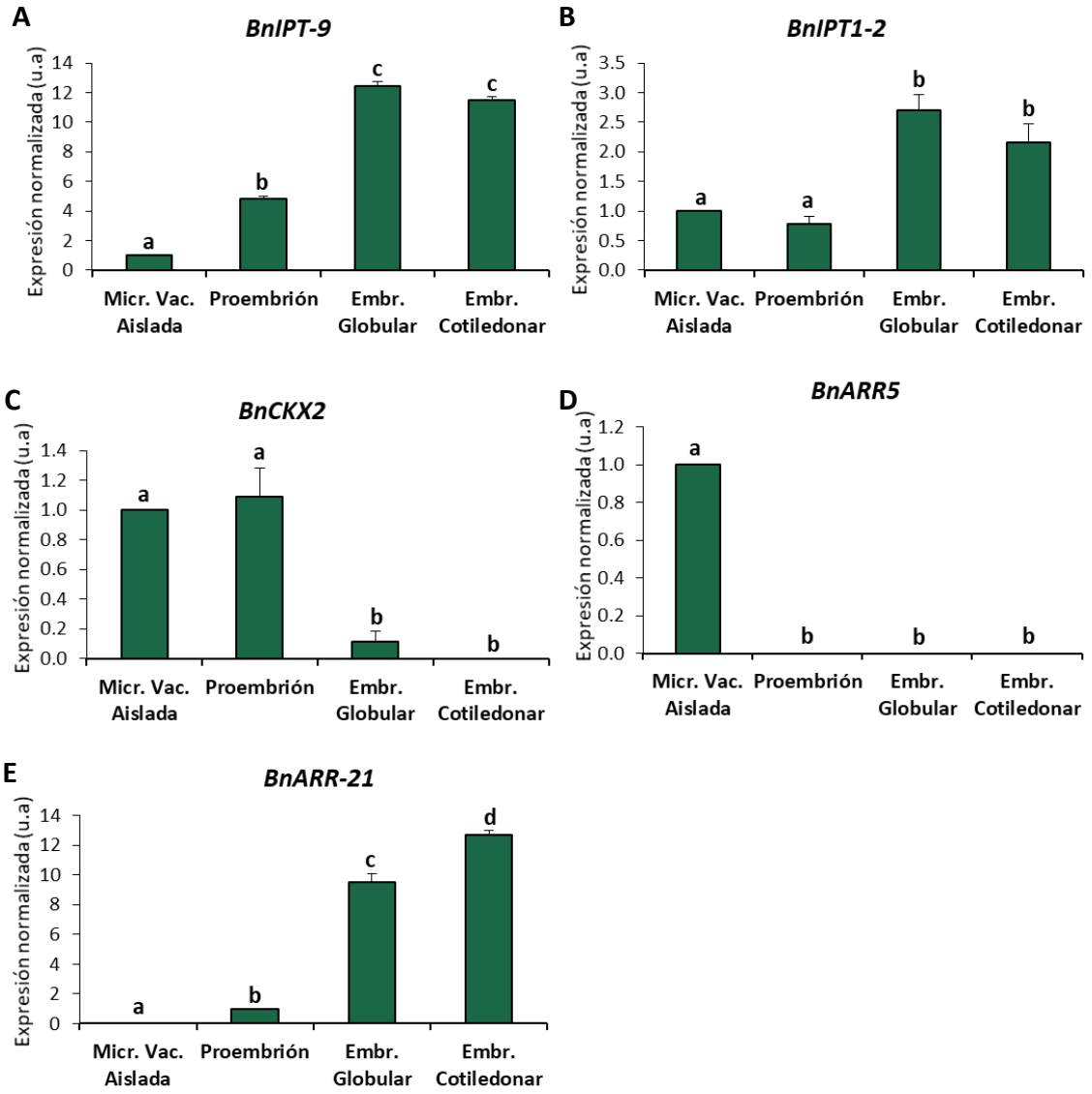


Figura 90. Patrones de expresión génica por qRT-PCR de genes relacionados con la citoquinina, durante la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Brassica napus*. Los histogramas muestran la expresión génica en cuatro etapas seleccionadas del desarrollo embriogénico: microspora vacuolada aislada (Micr. Vac. Aislada), proembrión, embrión globular y embrión cotiledonar. **(A, B)** Patrón de expresión temporal de dos genes implicados en biosíntesis *de novo* de citoquinina: *BnIPT-9* **(A)** y *BnIPT1-2* **(B)**. **(C)** Patrón de expresión temporal del gen *BnCKX2*, implicado en la degradación de citoquininas. **(D, E)** Patrón de expresión temporal de dos genes reguladores de respuesta a citoquinina (RR, *Response Regulators*): *BnARR5*, regulador tipo A que actúa como inhibidor de la ruta de señalización de citoquinina **(D)** y *BnARR21*, regulador tipo B que actúa como regulador positivo de la señalización de citoquininas e inicia la transcripción de genes de respuesta a esta hormona **(E).** Cada columna representa el valor promedio de al menos tres muestras biológicas diferentes y tres réplicas técnicas. Los niveles de transcripción fueron normalizados utilizando los valores del gen endógeno de referencia *BnHELICASA*. Los datos muestran los niveles de expresión (en unidades arbitrarias: u.a) normalizados a la etapa de microspora vacuolada aislada. Las barras representan el error estándar de la media (*SEM*). Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$.

Los patrones de expresión analizados indican en conjunto un aumento de la biosíntesis y una activación de la señalización de CKs tras la inducción embriogénica, especialmente en las etapas avanzadas.

4.3.3 Patrón temporal de concentración del precursor del etileno ACC durante la embriogénesis de microsporas de *B. napus*

Dada la interconexión que se ha demostrado entre las rutas de la citoquinina y el etileno (Liu *et al*., 2017), se realizó un análisis complementario sobre los niveles del precursor del etileno ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), utilizando la técnica de cromatografía de líquidos de alta definición acoplada a espectrometría de masas (U-HPLC-MS). Este análisis se realizó en el servicio de Análisis de Hormonas del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS) del CSIC, en colaboración con el grupo del Dr. Alfonso Albacete.

Los resultados mostraron una baja concentración de ACC en todas las etapas del desarrollo embriogénico, a excepción de la fase de proembrión, donde los niveles de ACC multiplicaron hasta en 60 veces el valor obtenido en el resto de fases (Fig. 91). Esta gran acumulación de ACC en el proembrión podría explicar los bajos niveles de expresión del gen inhibidor de la señalización de citoquinina *BnARR5* obtenidos en esta fase, en la cual se esperarían niveles más elevados, similares a los obtenidos en la fase de microspora vacuolada aislada, habiéndose descrito previamente en la bibliografía la regulación negativa del gen *ARR5* como consecuencia de una elevada actividad de la ruta de señalización del etileno (Liu *et al*., 2017).

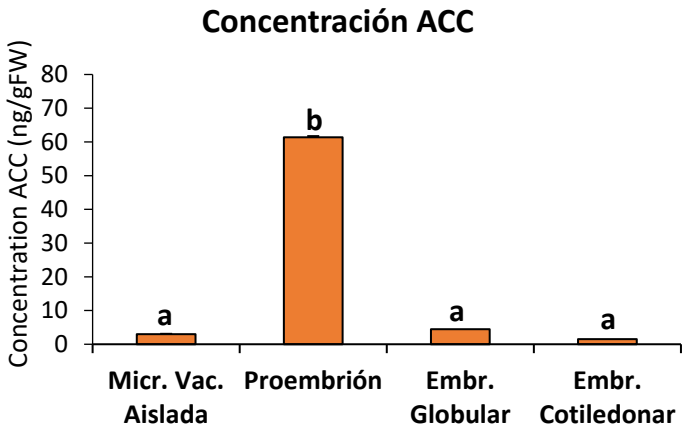


Figura 91. Cuantificación de la concentración del precursor del etileno ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) durante el desarrollo embriogénico de *Brassica napus,* utilizando cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray (LC-ESI-MS/MS). Las columnas muestran el valor promedio de la concentración de ACC de muestras de distintas etapas del desarrollo: microspora vacuolada aislada (Micr. Vac. Aislada), proembrión, embrión globular y embrión cotiledonar. Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$.

4.3.4 Efecto de inhibidores de la ruta de señalización de la citoquinina sobre la inducción y progresión de la embriogénesis de microsporas *de B. napus*

Con el fin de conocer el grado de implicación que tiene la citoquinina en la inducción y la progresión de la embriogénesis de microsporas de *Brassica napus*, se procedió a evaluar el efecto del compuesto PI-55 (6-(2-hidroxi-3-metillbencilamino) purina) en los cultivos de microsporas aisladas. El PI-55 es una molécula muy similar a la citoquinina 6-bencilaminopurina pero con propiedades antagónicas, ya que actúa inhibiendo de forma competitiva la unión del ligando natural *trans*-zeatina a los receptores de citoquinina HKs (Spíchal *et al*., 2009).

Este experimento se llevó a cabo añadiendo el compuesto PI-55 al inicio del cultivo de microsporas aisladas a distintas concentraciones: 0,5, 1, 2,5, 5 y 10 µM. En las placas control se añadió la concentración correspondiente del disolvente en que se preparó la droga, en este caso DMSO.

En primer lugar, se evaluó el efecto del tratamiento en la inducción embriogénica mediante la cuantificación del porcentaje de proembriones (primer signo morfológico del inicio de la embriogénesis) presentes en los cultivos control y en los cultivos tratados

con las diferentes concentraciones de PI-55, trascurridos 6 días desde la inducción. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de proembriones obtenidos en el cultivo control y los cultivos tratados con PI-55 (Fig.92A).

Trascurridos 30 días de cultivo, se procedió a cuantificar el número de embriones diferenciados en las placas control y tratadas, con el fin de evaluar el efecto de la droga durante la progresión de la embriogénesis. En este caso sí se obtuvieron diferencias entre las placas control y las tratadas con el inhibidor, observándose una reducción importante de los embriones diferenciados a medida que aumentaba la dosis de la droga (Fig. 92B-G).

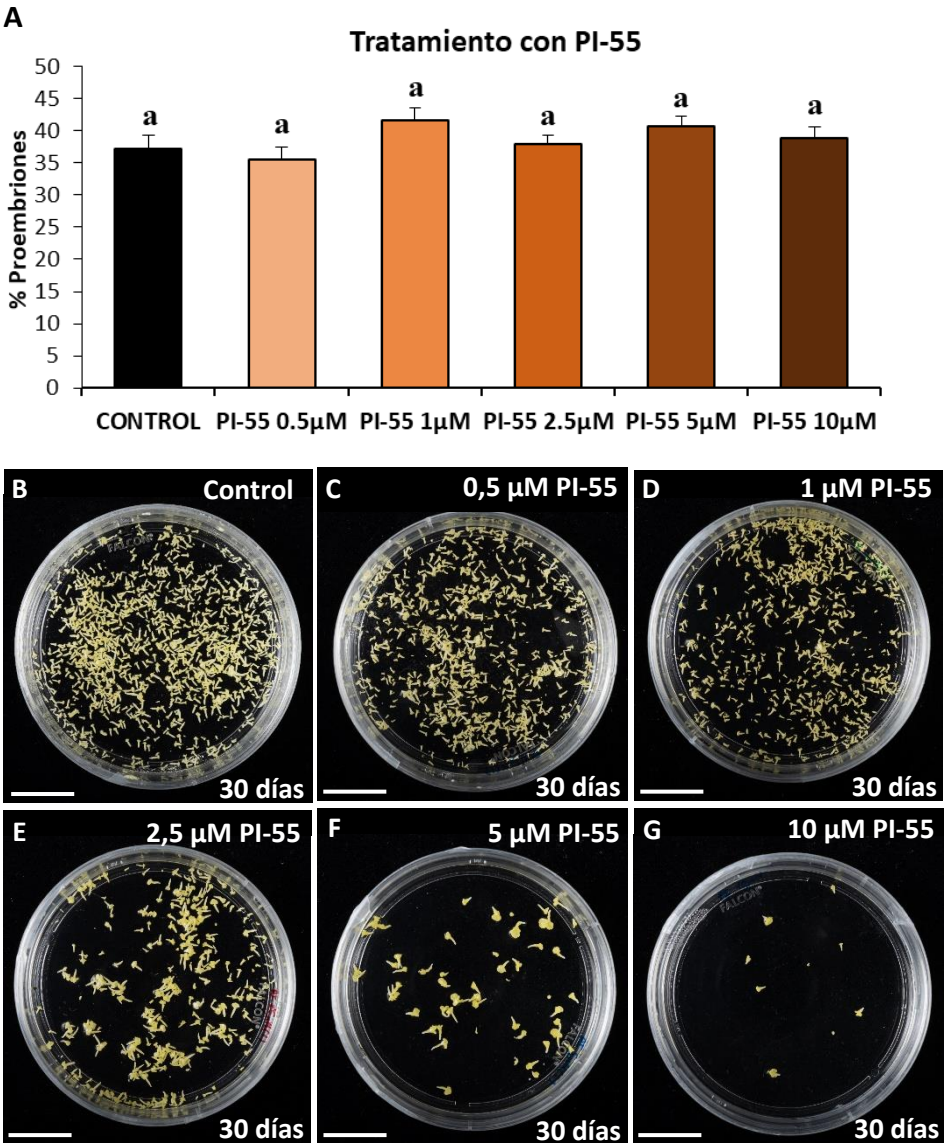


Figura 92. Efecto del tratamiento con PI-55 (6-(2-hidroxi-3-metillbencilamino) purina), inhibidor de la ruta de señalización de citoquininas, en cultivos de embriogénesis de microsporas de *Brassica napus*. **(A)** Cuantificación de la inducción embriogénica, medida a través del porcentaje de proembriones presentes en los cultivos control y tratados con PI-55 a concentraciones de 0,5, 1, 2,5, 5 y 10 µM. Los histogramas muestran el valor promedio del porcentaje de proembriones en cultivos control y tratados, después de 6 días de cultivo. Cada columna representa la media de tres repeticiones y tres réplicas biológicas. Las barras representan el error estándar de la media (*SEM*). Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$. **(B-G)** Placas Petri donde se muestran embriones procedentes de embriogénesis de microsporas tras 30 días en medio de cultivo control **(B)** y tratado con PI-55 a concentraciones de 0,5 µM **(C), 1** µM **(D), 2,**5 µM **(E),** 5 µM **(F),** y 10 µM **(G)**. Barras: 20 µm.

Estos resultados indicaron que la inhibición de la ruta de señalización de citoquininas con el compuesto PI-55 no afectó a la inducción embriogénica, sugiriendo un papel menor de la citoquinina al principio de la ruta, lo que correlacciona con los resultados de localización, acumulación y expresión de genes de citoquinina en exprimentos anteriores. Sin embargo, se pudo apreciar claramente el efecto del inhibidor durante la progresión de la embriogénesis, observándose un menor desarrollo de embriones diferenciados a medida que se aumenta la concentración del tratamiento en el cultivo, lo que indica la implicación de la citoquinina en las etapas más avanzadas.

4.3.5 Patrón temporal de concentración y localización de citoquinina durante la embriogénesis de microsporas de *H. vulgare*

Para comprobar si este comportamiento de la dinámica de la citoquinina observado en *Brassica napus* era común a otras especies, se procedió a analizar la concentración y localización de citoquinina en su forma *trans*-zeatina durante el desarrollo embriogénico de microsporas aisladas de otra planta herbácea, la especie monocotiledónea *Hordeum vulgare*.

Con el fin de evaluar el cambio en los niveles de *trans*-zeatina durante la embriogénesis de microsporas de *Hordeum vulgare*, se recogieron muestras de cuatro etapas clave en el desarrollo embriogénico de esta especie: microspora vacuolada aislada antes del estrés inductor, microspora vacuolada aislada después del estrés inductor, proembrión tras 6 días de cultivo y embrión coleoptilar después de 30 días de cultivo. A continuación, las muestras fueron analizadas por cromatografía de líquidos de alta definición acoplada a espectrometría de masas (U-HPLC-MS). Este análisis se realizó en el servicio de Análisis de Hormonas del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS) del CSIC, en colaboración con el grupo del Dr. Alfonso Albacete.

Los resultados obtenidos con esta técnica mostraron una menor concentración de *t*Z en las etapas de microspora vacuolada, tanto antes como después de aplicar el estrés inductor, y un aumento significativo de la hormona tras la inducción embriogénica, en la etapa de proembrión. Del mismo modo se obtuvo una concentración significativamente mayor en la etapa más avanzada de la embriogénesis, en la fase de embrión coleoptilar, con respecto al resto de estadios del desarrollo (Fig.93).

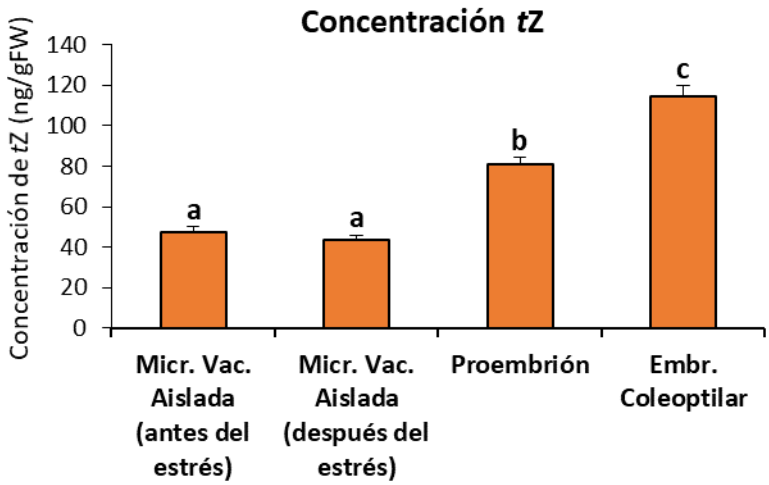


Figura 93. Cuantificación de la concentración de citoquinina endógena de tipo zeatina en su forma *trans* (*trans*-zeatina; *t*-Z) durante el desarrollo embriogénico de *Brassica napus*, utilizando cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray (LC-ESI-MS/MS). Las columnas muestran el valor promedio de la concentración de *t*Z de muestras de cuatro etapas del desarrollo embriogénico: microspora vacuolada aislada antes y después del estrés inductor, proembrión y embrión coleoptilar. Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$.

A continuación, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia para conocer el patrón de distribución de la *trans*-zeatina a lo largo del desarrollo. Para este experimento se obtuvieron cortes semifinos de distintas etapas del desarrollo embriogénico: microspora vacuolada antes y después del tratamiento de estrés inductor, proembrión, embrión globular avanzado y embrión coleoptilar.

Los resultados revelaron un aumento de la intensidad de fluorescencia a medida que avanzaba la embriogénesis, con una localización específica de la señal en el citoplasma de las células. El anticuerpo no reveló señal de *t*Z en las fases iniciales, ni en microsporas vacuoladas antes del estrés inductor (Fig. 94A-A´´) ni en microsporas vacuoladas aisladas después de aplicar el estrés (Fig. 94B-B´´), mientras que, al inicio de la embriogénesis, en la etapa de proembrión, se detectó una señal débil de fluorescencia localizada de forma heterogénea en el citoplasma de las células del embrión (Fig. 94C-C´´). Según avanzamos en el desarrollo, en la fase de embrión globular avanzado, la señal de *t*Z aumentó (Fig. 94D-D´´), en comparación con las etapas más tempranas de la embriogénesis.

Al analizar la fluorescencia en etapas más avanzadas, en el embrión coleoptilar, se detectó un aumento aún mayor de la intensidad de fluorescencia (Fig. 95A).

Del mismo modo que en experimentos de inmunofluorescencia anteriores con el anticuerpo anti-*t*Z, se realizaron ensayos de control negativo por inmunodeplección con la citoquinina sintética 6-Bencilaminopurina (BAP). Los resultados no revelaron en ningún caso señal de fluorescencia de la muestra (Fig. 95B-B´´), lo que demostró la especificidad del anticuerpo y de los resultados obtenidos.

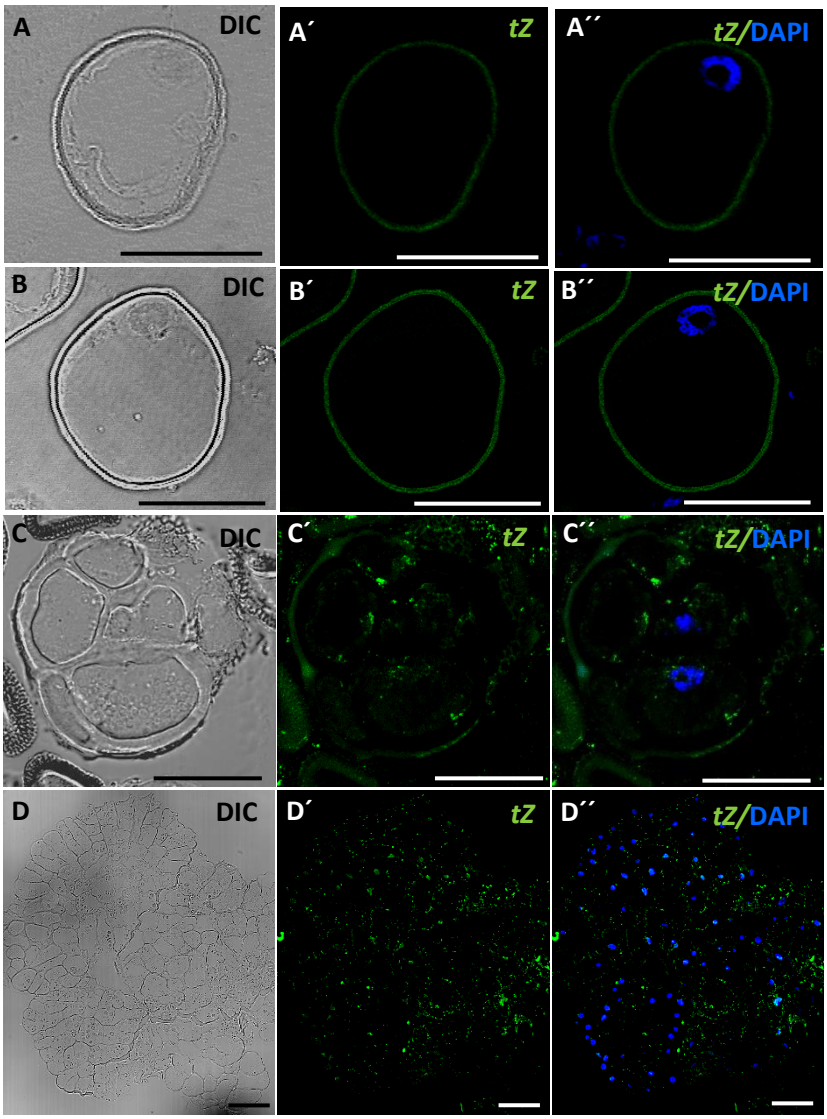


Figura 94. Inmunolocalización de citoquinina de tipo zeatina en su forma *trans* (*trans*-zeatina; *t*-Z) durante las primeras etapas de la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Hordeum vulgare.* Las imágenes de microscopía confocal muestran la señal de fluorescencia de *t*Z (verde), la tinción de núcleos con DAPI (azul) y el DIC (contraste de interferencia diferencial). **(A-A´´)** Microspora vacuolada aislada antes del estrés **(B-B´´)** Microspora vacuolada aislada después del estrés. **(C-C´´)** Proembrión. **(D-D´´)** Embrión globular avanzado. Barras **(A-A´´, B-B´´, C-C´´)**: 25 µm, **(D-D´´)**: 50 µm.

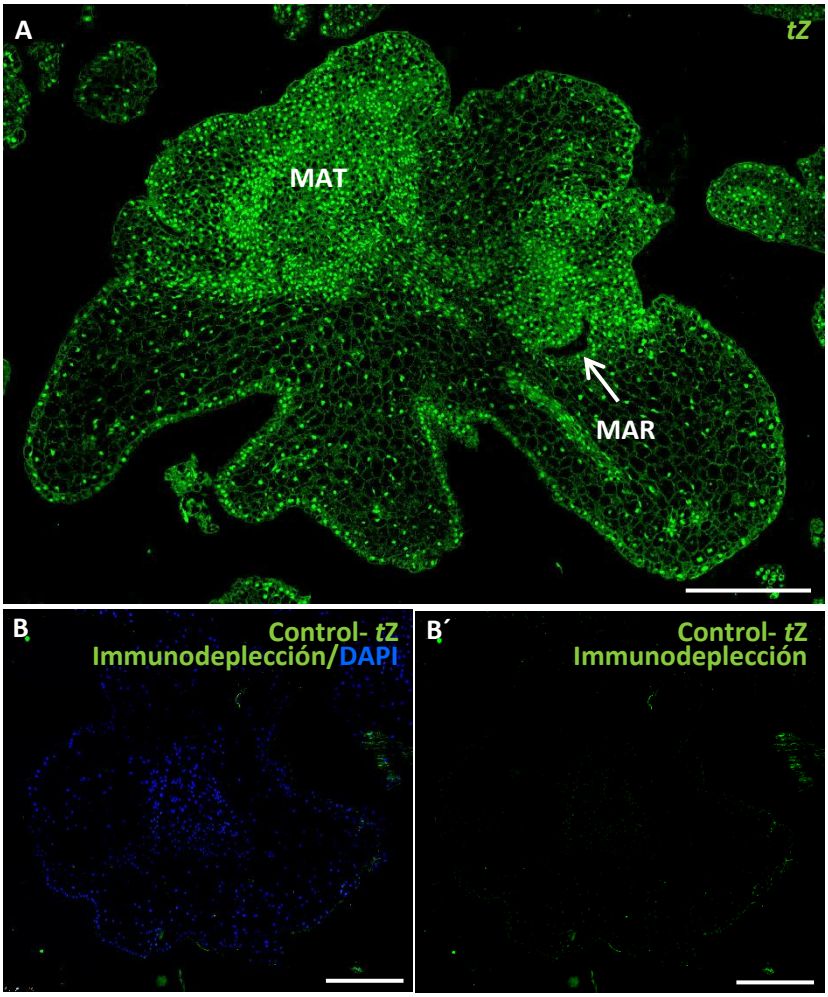


Figura 95. Inmunolocalización de citoquinina de tipo zeatina en su forma *trans* (*trans*-zeatina; *t*-Z) en la fase avanzada de embrión coleoptilar de la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Hordeum vulgare*. Las imágenes de microscopía confocal muestran la señal de fluorescencia de *t*Z (verde) y la tinción de núcleos con DAPI (azul). **(A)** Embrión coleoptilar con el marcado de *t*Z. **(B-B´)** Control negativo por inmunodeplección de la inmunofluorescencia del anticuerpo anti-*t*Z, previamente bloqueado con la citoquinina sintética 6-Bencilaminopurina (BAP). MAT: meristemo apical del tallo; MAR: meristemo apical de la 256aíz. Barras: 100 µm.

Los datos obtenidos en *Hordeum vulgare* correlacionan con los obtenidos previamente en la especie *Brassica napus*, lo cual indica un comportamiento similar de la dinámica de esta hormona durante la embriogénesis de microsporas inducida por estrés en ambas especies, sin una gran implicación al inicio del proceso, pero jugando un papel crucial en etapas avanzadas del desarrollo. Estos resultados, además, permiten pensar en la posibilidad de una dinámica de citoquininas homóloga y aplicable a otras especies de interés en el campo de la embriogénesis.

4.4 DINÁMICA DE DESESTERIFICACIÓN DE PECTINAS DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *Q. SUBER* Y LA EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS DE *H. VULGARE* Y *B. NAPUS*

Los cambios en la dinámica de la pared celular controlada por la metilesterificación de pectinas, mediados por enzimas pectinmetilesterasas (PME) e inhibidores de pectinmetilesterasas (PMEI), subyacen en muchos procesos del desarrollo de las plantas. Con la finalidad de conocer el grado de implicación de estos mecanismos durante el proceso de embriogénesis somática, se ha procedido a analizar los cambios en la metilesterificación de las pectinas durante la embriogénesis somática de *Quercus suber*, una especie forestal de alto valor ecológico y económico.

4.4.1 Caracterización de las principales etapas de la embriogénesis somática de *Q. suber*

Como paso previo al estudio de las pectinas, se llevó a cabo la caracterización del proceso. La embriogénesis somática fue inducida a partir de embriones cigóticos inmaduros, aislados de bellotas inmaduras recolectadas de árboles seleccionados en la localidad de El Pardo (Madrid). Los detalles del procedimiento del cultivo *in vitro* de estos embriones se detallan en el apartado 3.4 de esta tesis.

Tras la inducción embriogénica en este material, se obtuvieron embriones directamente del explanto o indirectamente a partir de masas proembriogénicas (MPE) formadas previamente a partir de explantos. Debido al desarrollo asincrónico que presentan los cultivos de embriogénesis somática, es habitual encontrar en una misma placa de cultivo diferentes estructuras correspondientes a varios estadios del desarrollo (Fig. 96A). Las MPE aparecen formando grupos de masas redondeadas compuestas por grupos celulares que son, en su mayoría, células embriogénicas en proliferación (Fig. 96B). Estas MPE, surgidas de los explantos tras la inducción embriogénica, pueden diferenciarse a embriones somáticos o seguir proliferando para formar nuevas MPE (Fig. 96A).

Durante el cultivo *in vitro*, los embriones somáticos continuaron desarrollándose hacia estadios de embrión globular, embrión corazón (Fig. 96C), embrión torpedo (Fig. 96D) y embrión cotiledonar (Fig. 96E). Las estructuras correspondientes a los distintos

estadios del desarrollo pudieron observarse en las placas de cultivo, junto con nuevas MPE (Fig. 96A). Adicionalmente, algunos embriones somáticos en diferentes estadios del desarrollo experimentaron embriogénesis recurrente, produciendo nuevas MPE y embriones. Los embriones cotiledonares más avanzados en el desarrollo acumularon sustancias nutritivas de reserva en los cotiledones, volviéndose opacos y adquiriendo un color marfil a la vez que aumentaron de peso, dando lugar a embriones somáticos maduros (Fig. 96F).



Figura 96. Principales etapas de la embriogénesis somática de *Quercus suber*. **(A)** Vista panorámica de una placa de cultivo donde se muestran distintas estructuras correspondientes a varios estadios del desarrollo. **(B)** Agrupación de masas proembriogénicas. **(C)** Embrión corazón. **(D)** Embrión torpedo. **(E)** Embrión cotiledonar. **(F)** Embrión cotiledonar maduro. Barras **(A)**: 1 cm, **(B-F)**: 1 mm.

Con el fin de caracterizar la organización celular de las diferentes etapas del desarrollo embriogénico, se obtuvieron cortes semifinos de las distintas estructuras, se realizó una tinción de azul de toluidina y se procedió a su análisis por microscopía óptica.

Estos análisis revelaron que las MPE estaban formadas por agregados de pequeñas células embriogénicas, las cuales aparecían formando grupos en la periferia de las MPE (Fecha gruesa en la Fig. 97A, y su aumento en la Fig. 97D) o en el interior de las mismas (flecha estrecha en la Fig. 97A, y su aumento en la Fig. 97E). Estas células mostraban un gran núcleo central y un nucleolo prominente, además de una baja vacuolización y una alta proporción del volumen celular ocupado por el núcleo en relación con el volumen ocupado por el citoplasma (Fig. 97D, E), siendo esta la estructura típica de las células en proliferación. Por el contrario, a medida que avanzaba el desarrollo, los embriones somáticos en los diferentes estadios de diferenciación como corazón, torpedo (Fig. 97B) y embriones cotiledonares (Fig. 97C), mostraron células mucho más grandes, con grandes vacuolas que ocupaban la mayor parte del volumen celular y pequeños núcleos ubicados en la periferia de la célula (Fig. 97F, G, correspondientes a aumentos de regiones del embrión indicadas con recuadros en las Fig. 97B, C). En la zona periférica de los embriones corazón, torpedo y cotiledonar, se pudo observar la epidermis en diferenciación, la cual aparece en secciones trasversales como una capa formada por una única fila de pequeñas células poligonales (Fig. 97F, G).

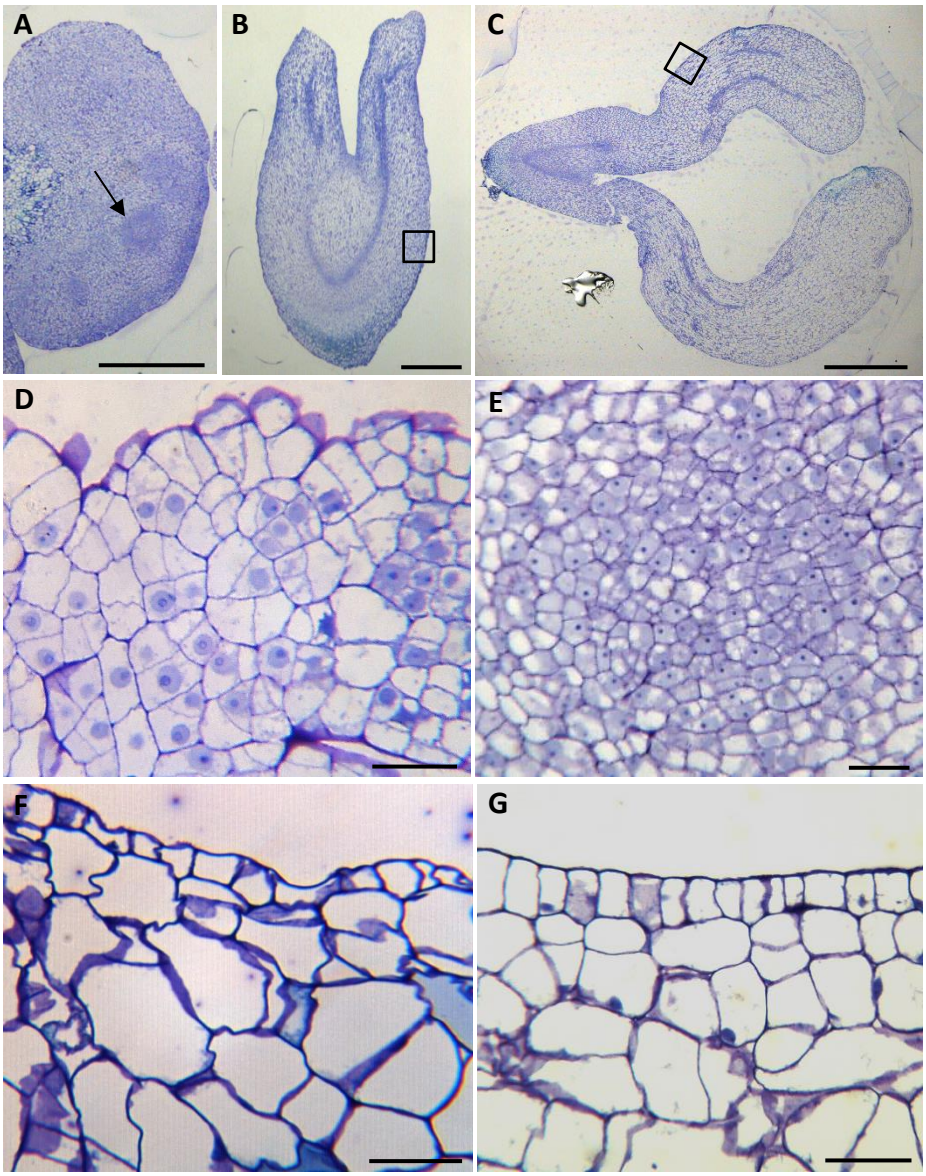


Figura 97. Organización celular de las principales etapas de embriogénesis somática de *Quercus suber*. Imágenes de cortes semifinos teñidos con azul de toluidina. **(A)** Vista panorámica de una agrupación de masas proembriogénicas. **(B)** Embrión torpedo. **(C)** Embrión cotiledonar. **(D-G)** Detalles a un mayor aumento de regiones representativas de **(A-C)**, indicándose con flechas y recuadros el área aumentada. **(D, E)** MPE mostrando agrupaciones de células embriogénicas en la zona periférica **(D)**, esta región aumentada se corresponde a la indicada con la flecha delgada negra en **(A)**; y en el interior **(E)**, cuyo aumento corresponde a la región señalada con la flecha gruesa en **(A)**. **(F)** Embrión torpedo. **(G)** Embrión cotiledonar. Barras **(A, B)**: 0,5 mm**, (C)**: 1 mm, **(D-G)**: 20 µm.

4.4.2 Patrones temporales y de localización subcelular de pectinas esterificadas y no esterificadas durante la embriogénesis somática de *Q. suber*

Con el fin de analizar las variaciones en el estado de metilesterificación (a menudo abreviada como esterificación) de pectinas durante la embriogénesis somática, se procedió a la localización de pectinas esterificadas y no esterificadas (o desesterificadas) mediante técnicas de inmuno *dot blot* y ensayos de inmunofluorescencia con posterior análisis de microscopía confocal.

Para los ensayos de *dot blot* se seleccionaron cuatro anticuerpos monoclonales que fueron utilizados en tres etapas secuenciales del desarrollo: (1) "masas proembriogénicas" (muchas de ellas con embriones globulares tempranos emergiendo de las mismas); (2) embriones corazón y torpedo, etapas de diferenciación embrionaria; y (3) embriones cotiledonares maduros. En todas las etapas se utilizó el mismo volumen de extracto y concentración de proteínas. El experimento se llevó a cabo utilizando un anticuerpo capaz de reconocer de forma específica pectinas altamente metilesterificadas (a las que denominaremos esterificadas): JIM7; y dos anticuerpos que reconocen pectinas con un nivel de metilesterificación muy bajo (a las que llamaremos pectinas desesterificadas): JIM5 y LM19.

La señal de inmuno *dot blot* de JIM7 reveló la presencia de pectinas esterificadas en todas las etapas del desarrollo, viéndose ésta significativamente disminuida en las etapas más avanzadas del proceso, representadas por el embrión cotiledonar maduro (Fig. 98). Por el contrario, los inmuno *dot blot*s en los que se utilizaron los anticuerpos de reconocimiento de pectinas desesterificadas, JIM5 y LM19, mostraron un aumento en la intensidad de la señal a medida que avanza el desarrollo embriogénico, alcanzándose la señal más alta en el estadio de embrión cotiledonar maduro (Fig. 98).

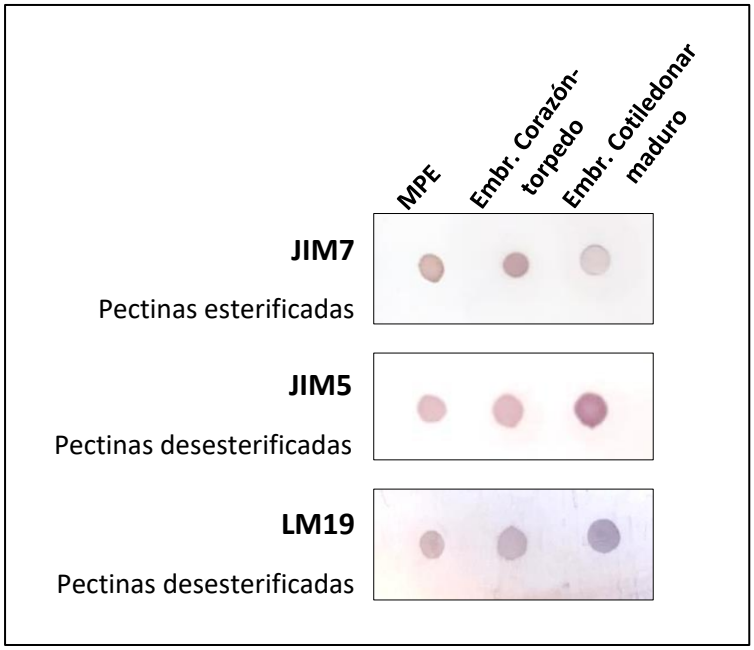


Figura 98. Patrón temporal de pectinas esterificadas y desesterificadas durante la embriogénesis somática de *Quercus suber*. Ensayo de inmuno *dot blot* con el anticuerpo JIM7 (específico de pectinas esterificadas), JIM5 y LM19 (ambos específicos de pectinas desesterificadas). Se aplicó el mismo volumen y concentración de extracto proteico para cada una de las etapas del desarrollo: masas proembriogénicas (MPE), embriones corazón-torpedo y embriones cotiledonares maduros.

Con el fin de analizar los patrones de distribución de pectinas con diferente grado de metilesterificación presentes en la pared celular, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia utilizando los mismos anticuerpos monoclonales previamente testados en los experimentos de *dot blot*, además de un nuevo anticuerpo que reconoce pectinas esterificadas (LM20). Los resultados obtenidos mediante esta técnica fueron analizados con microscopía confocal, manteniendo en todo momento los valores de excitación y emisión en el mismo rango para todas las muestras, en cada uno de los anticuerpos ensayados. Estas condiciones permitieron comparar de forma precisa la intensidad de la señal de fluorescencia entre las distintas etapas del desarrollo.

La señal se localizó en todos los casos en las paredes celulares, mostrándose el resto de estructuras negativas. Los resultados obtenidos con esta técnica revelaron de forma precisa los patrones de distribución de pectinas esterificadas y desesterificadas durante el inicio y la progresión de la embriogénesis somática. En las etapas iniciales, las masas proembriogénicas mostraron una intensa señal de inmunofluorescencia con los anticuerpos de pectinas esterificadas JIM7 y LM20, en todas las células de la pared (Fig.

99A, C). Por el contrario, la señal de pectinas desesterificadas detectadas con los anticuerpos JIM5 y LM19 fue muy baja en las paredes celulares de las masas proembriogénicas (Fig. 99B, D), sobre todo en aquellas células embriogénicas localizadas en la periferia (Fig. 99B) y en los grupos de células embriogénicas del interior de las masas (Fig. 99D), las cuales mostraron solamente una leve señal en algunas intersecciones de las paredes de varias células. Estos resultados indicaron que las paredes celulares de las masas proembriogénicas contenían una gran cantidad de pectinas esterificadas y unos niveles muy bajos de pectinas desesterificadas.

Como controles de este experimento, se procedió a realizar el mismo ensayo en ausencia del anticuerpo primario correspondiente. En ningún caso se observó el marcado fluorescente de ningún compartimento celular en ninguna de las etapas del desarrollo estudiadas (Fig. 99E, F y Fig. 100), lo que respalda la especificidad de los resultados de inmunofluorescencia a la vez que revela la ausencia de autofluorescencia de las muestras en las paredes celulares o en cualquier otra estructura subcelular.

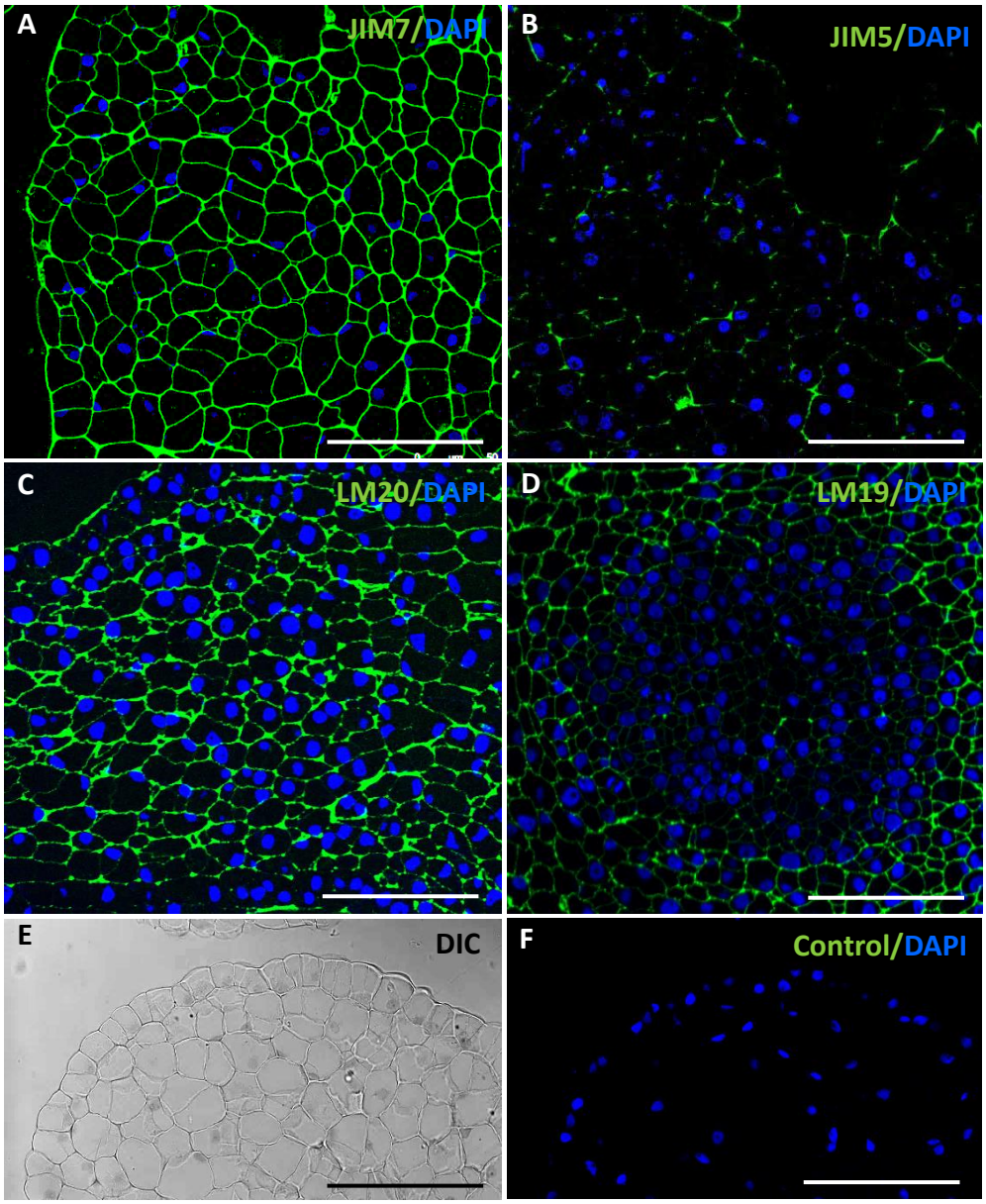


Figura 99. Inmunolocalización de pectinas esterificadas y desesterificadas en masas proembriogénicas, etapa temprana de la embriogénesis somática de *Quercus suber*. Imágenes de microscopía confocal con la combinación de la señal de fluorescencia las pectinas (verde) y la tinción de núcleos con DAPI (azul). **(A, C)** Inmunofluorescencia de pectinas esterificadas marcadas con el anticuerpo JIM7 **(A)** y LM20 **(C)**. **(B, D)** Inmunofluorescencia de pectinas desesterificadas marcadas con el anticuerpo JIM5 **(B)** y LM19 **(D)**. **(A, C)** Agrupaciones de células proembriogénicas de la región periférica, similar a la **figura 97D**. **(D)** Agrupaciones de células proembriogénicas en el interior, similar a la **figura 97E**. **(E, F)** Control negativo sin anticuerpo primario, misma masa proembriogénica visualizada en DIC (contraste de interferencia diferencial) **(E)** y en microscopía confocal con la combinación de fluorescencia del anticuerpo (verde) y de la tinción con DAPI (azul) **(F)**. Barras: 20µm.

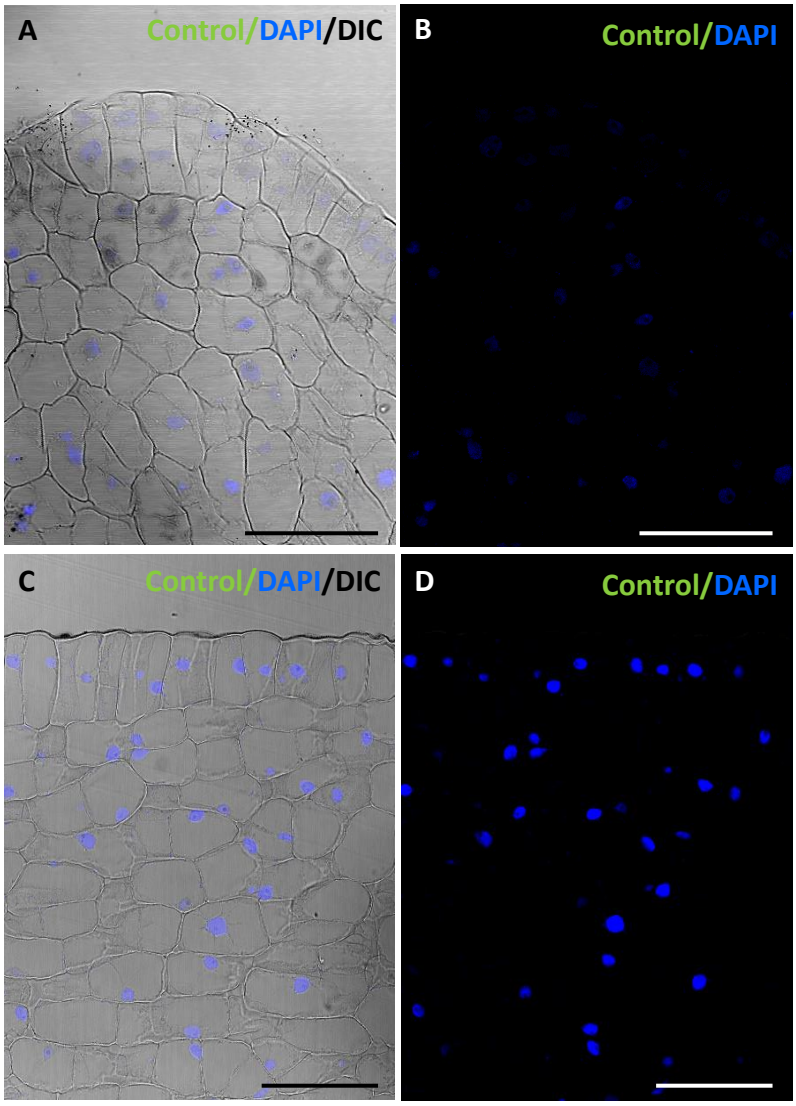


Figura 100. Controles negativos de los experimentos de inmunofluorescencia con los anticuerpos JIM5, JIM7, LM19 y LM20 en etapas avanzadas de la embriogénesis somática de *Quercus suber.* Las mismas regiones del embrión aparecen visualizadas bajo diferentes modos de microscopía. **(A, B)** Embrión torpedo. **(C, D)** Embrión cotiledonar. **(A, C)** Imágenes de microscopía confocal con la combinación de la señal de fluorescencia del anticuerpo secundario (verde), la tinción de núcleos con DAPI (azul) y el DIC (contraste de interferencia diferencial). **(B, D)** Imágenes de microscopía confocal con la combinación de la señal de fluorescencia del anticuerpo secundario (verde) y la tinción de núcleos con DAPI (azul). Barras: 50 µm.

A medida que avanzaba la embriogénesis somática en las diferentes etapas seleccionadas de embrión corazón, embrión torpedo y embrión cotiledonar, los patrones de localización subcelular de pectinas esterificadas se vieron modificados en comparación con las masas proembriogénicas. Los resultados revelaron una señal de intensidad media para pectinas esterificadas (localizadas con los anticuerpos JIM7 y LM20) en las paredes de la mayoría de las células de los embriones en estadio de

corazón-torpedo y cotiledonar, mientras que las células en diferenciación, como por ejemplo las células de la epidermis del embrión, prácticamente no mostraron señal de inmunofluorescencia (Fig. 101A, C, E).

En esas mismas etapas de embriones en desarrollo, se detectó una señal de inmunofluorescencia muy intensa de pectinas desesterificadas (localizadas con los anticuerpos JIM5 y LM19). La señal estaba presente en todas las paredes celulares de los embriones corazón, torpedo (Fig. 101B, D) y cotiledonar (Fig. 101F), incluyendo las paredes celulares de la epidermis (Fig. 101B, D, F), la cual aparece formando una capa de pequeñas células poligonales alrededor del cuerpo del embrión.

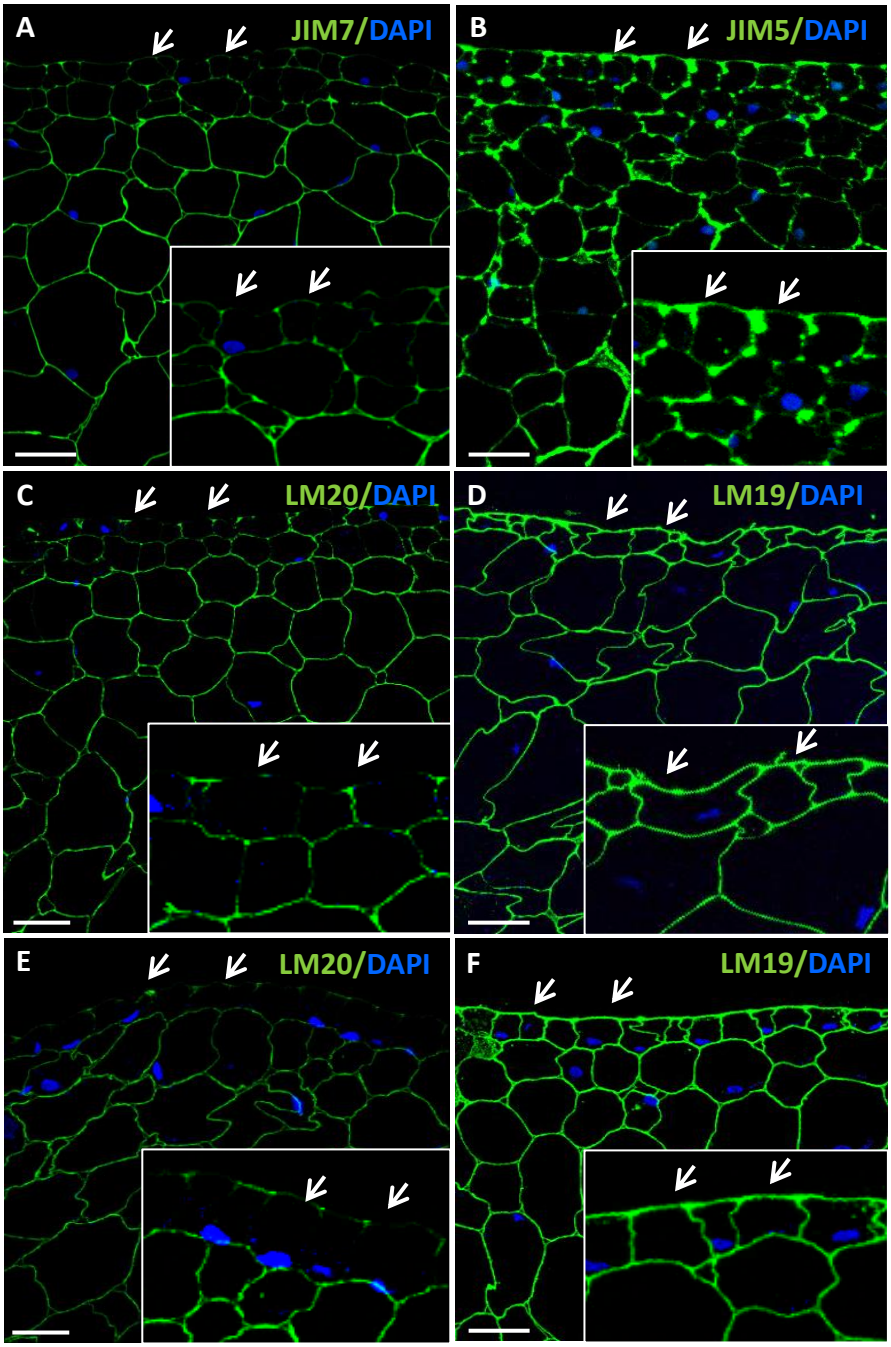


Figura 101. Inmunolocalización de pectinas esterificadas y desesterificadas en etapas avanzadas de la embriogénesis somática de *Quercus suber*. Imágenes de microscopía confocal con la combinación de la señal de fluorescencia las pectinas (verde) y la tinción de núcleos con DAPI (azul). **(A, C, E)** Inmunofluorescencia de pectinas esterificadas marcadas con el anticuerpo JIM7 **(A)** y LM20 **(C, E)**. **(B, D, F)** Inmunofluorescencia de pectinas desesterificadas marcadas con el anticuerpo JIM5 **(B)** y LM19 **(D, F)**. **(A-D)** Embrión torpedo, región similar a la mostrada en la **figura 97F**. **(E, F)** Embrión cotiledonar, región similar a la mostrada en la **figura 97G**. Las imágenes insertadas en los recuadros muestran un mayor aumento de la zona de la epidermis y los tejidos adyacentes. Las flechas señalan las células epidérmicas. Barras: 20µm.

Los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia, junto con la información mostrada en los ensayos de inmuno *dot blot*, indican un aumento en la demetilesterificación de pectinas en etapas avanzadas del desarrollo del embrión somático de *Quercus suber*, asociada con la diferenciación celular que tiene lugar a medida que avanza el proceso de embriogénesis.

4.4.3 Expresión de la pectinmetilesterasa *QsPME* y el inhibidor de pectinmetilesterasa *QsPMEI* durante la embriogénesis somática de *Q. suber*

Con el objetivo de estudiar los cambios en la metilesterificación de pectinas durante la embriogénesis somática, se procedió a analizar la expresión génica de *QsPME* y *QsPMEI*, dos genes que aparecen en la base de datos del alcornoque (CorkOakDatabase) como codificantes de una pectinmetilesterasa (PME), enzima encargada de catalizar la demetilesterificación de pectinas, y un PMEI, un inhibidor proteico endógeno de la actividad de las PME.

Estos análisis se llevaron a cabo en los estadios del desarrollo de masas proembriogénicas, embriones corazón-torpedo y embriones cotiledonares maduros. Los resultados mostraron unos niveles bajos de expresión del gen *QsPME* en la etapa de masas proembriogénicas, mientras que su expresión aumentó durante la progresión de la embriogénesis somática (Fig. 102A), siendo la expresión *QsPME* tres veces mayor en embriones corazón-torpedo que en masas proembriogénicas. A su vez, los embriones cotiledonares mostraron el mayor nivel de expresión, con valores de expresión hasta 50 veces más altos que los de las masas proembriogénicas.

Por el contrario, el gen *QsPMEI* mostró una alta expresión en las primeras etapas de la embriogénesis somática (en masas proembriogénicas), y una expresión muy reducida en etapas más avanzadas del desarrollo (embriones corazón-torpedo y cotiledonares), donde apenas se detectó expresión del gen (Fig. 102B).

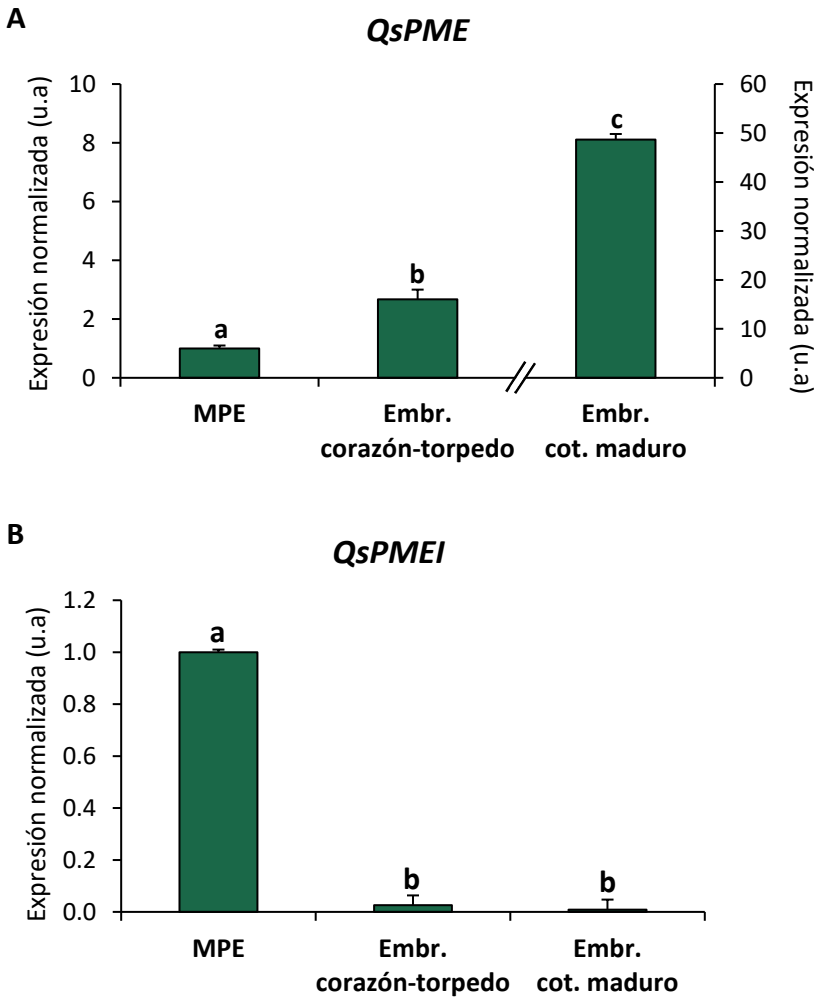


Figura 102. Patrón de expresión génica por qRT-PCR de *QsPME* (gen de pectinmetilesterasa) y *QsPMEI* (gen inhibidor de pectinmetilesterasa) durante la embriogénesis somática de *Quercus suber*. Los histogramas muestran la expresión génica en tres etapas de la embriogénesis somática: masas proembriogénicas (MPE), embriones corazón-torpedo y embriones cotiledonares maduros. **(A)** Patrón de expresión temporal del gen *QsPME*. **(B)** Patrón de expresión temporal del gen *QsPMEI*. Cada columna representa el valor promedio de al menos tres muestras biológicas diferentes y tres réplicas técnicas. Los niveles de transcripción fueron normalizados utilizando los valores del gen endógeno de referencia *QsACTINA*. Los datos muestran los niveles de expresión (en unidades arbitrarias: u.a) normalizados a la etapa de MPE. Las barras representan el error estándar de la media (*SEM*). Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$.

4.4.4 Actividad enzimática PME durante la embriogénesis somática de *Q. suber*

El ensayo de actividad enzimática de pectinmetilesterasas se cuantificó en extractos de proteínas de las mismas etapas mencionadas en el análisis anterior: masas proembriogénicas, embriones corazón y torpedo y embriones cotiledonares maduros. Los resultados mostraron que la actividad PME era muy baja en las etapas iniciales, en masas embriogénicas, mientras que ésta aumentaba considerablemente en los embriones en desarrollo, en la etapa de embrión corazón-torpedo (Fig. 103). Del mismo modo, los resultados mostraron un nuevo aumento de la actividad de PME en los embriones cotiledonares, los cuales presentaron el mayor nivel de actividad PME durante la embriogénesis somática (Fig. 103).

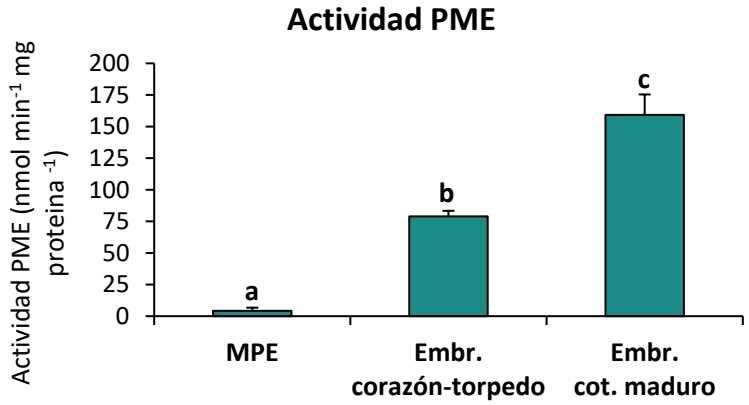


Figura 103. Actividad enzimática PME durante la embriogénesis somática de *Quercus suber*. El histograma expresa los niveles de actividad enzimática en tres etapas de la embriogénesis somática: masas proembriogénicas (MPE), embriones corazón-torpedo y embriones cotiledonares maduros. Las columnas representan el valor promedio y las barras indican el error estándar de la media (*SEM*). Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$.

Este perfil temporal de la actividad PME durante la embriogénesis somática se correlaciona con los patrones de expresión génica obtenidos para *QsPME*, mostrándose un aumento de ambos parámetros a medida que avanza el desarrollo.

4.4.5 Efectos de la inhibición de la actividad PME durante la embriogénesis somática de *Q. suber*

Los resultados obtenidos en los análisis de expresión génica de *QsPME* y *QsPMEI*, el ensayo de actividad enzimática PME y los experimentos de inmuno *dot blot* e inmunofuorescencia, indicaron un aumento en la desesterificación de pectinas de las paredes celulares asociado a la progresión de la embriogénesis somática. Con el objetivo de analizar la posible implicación de la desesterificación de pectinas en el proceso de la embriogénesis somática, se llevaron a cabo análisis funcionales tratando los cultivos de embriogénesis somática con un conocido inhibidor de la actividad PME, la catequina PP60.

La catequina PP60 o *polyphenon* 60, es una catequina procedente de extractos de té verde que ha sido descrita como un eficaz inhibidor de la actividad PME en un gran número de especies vegetales. Se trata de pequeñas moléculas con una alta estabilidad y una vida útil larga, propuestos como potentes inhibidores de PME al aplicarse de manera exógena en cultivo *in vitro* de tejidos (Lewis *et al*., 2008).

El experimento se llevó a cabo seleccionando un número determinado de masas proembriogénicas, inducidas a partir de embrión cigótico inmaduro, las cuales se transfirieron a un medio de cultivo control o a uno al que se añadió previamente 1,5 mg/ml de catequina PP60 (Fig. 104A y Fig. 105A, C). De este modo se pudo evaluar el desarrollo de los cultivos tratados, en comparación con los cultivos control. Transcurridos 30 días, los cultivos control produjeron nuevas masas proembriogénicas y embriones en distintos estadios del desarrollo como globulares, corazones, torpedos, cotiledonares, e incluso algunos embriones maduros (Fig. 104A y Fig. 105B). Por el contrario, después de 30 días, los cultivos tratados con catequina mostraron numerosas nuevas masas proembriogénicas producidas como consecuencia de la proliferación de las masas iniciales, y solo algunos pequeños embriones en etapa de embrión globular temprano. Sin embargo, no se observó en estos cultivos ningún embrión en diferenciación hacia un estadio más avanzado del desarrollo (Fig. 104A y Fig. 105D).

Para evaluar de forma cuantitativa el efecto del tratamiento, se procedió a contar el número de embriones cotiledonares que se habían desarrollado en los cultivos control y tratados, trascurridos 30 días del experimento. Los resultados, tal y como se observó

de manera cualitativa, mostraron cómo el tratamiento con catequina redujo severamente el número de embriones cotiledonares formados, en comparación con los cultivos control (Fig. 104B).

A continuación, para saber si era posible revertir el efecto del tratamiento, se procedió a transferir las masas embriogénicas tratadas a un medio de cultivo sin catequina. Como resultado, tras 30 días más en medio de cultivo sin el tratamiento, se produjo una recuperación del desarrollo de la embriogénesis somática, observándose la formación de numerosos embriones en distintas etapas de diferenciación (Fig. 105F).

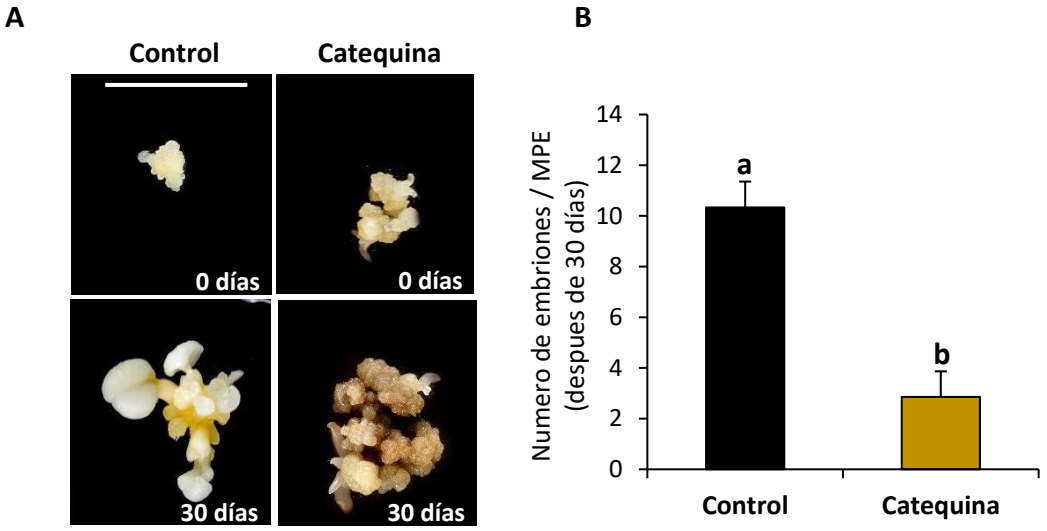


Figura 104. Efecto de la inhibición de la actividad PME en la embriogénesis somática *de Quercus suber* por el tratamiento con catequina. **(A)** En la imagen superior izquierda se muestra un cultivo sin tratamiento al inicio del ensayo, 0 días, donde aparecen masas proembriogénicas (MPE) con algún pequeño embrión surgiendo de las mismas; en la esquina inferior izquierda se muestra esa misma masa transcurridos 30 días de cultivo, donde aparecen numerosos embriones en distintos estadios del desarrollo; en la esquina superior derecha se muestra una MPE de un cultivo tratado con catequina, similar a la MPE del cultivo sin tratamiento; en la imagen inferior se muestra esa misma masa después de 30 días en tratamiento, donde se visualiza un alto nivel de proliferación de nuevas MPE pero apenas se aprecia diferenciación embriogénica. Barras: 1 cm, en todas las imágenes. **(B)** Cuantificación de la producción de embriones en cultivos sin tratar y tratados con catequina. Las columnas representan el valor promedio del número de embriones diferenciados por masa embriogénica, tras 30 días de cultivo; las barras representan el error estándar de la media (*SEM*). Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$.

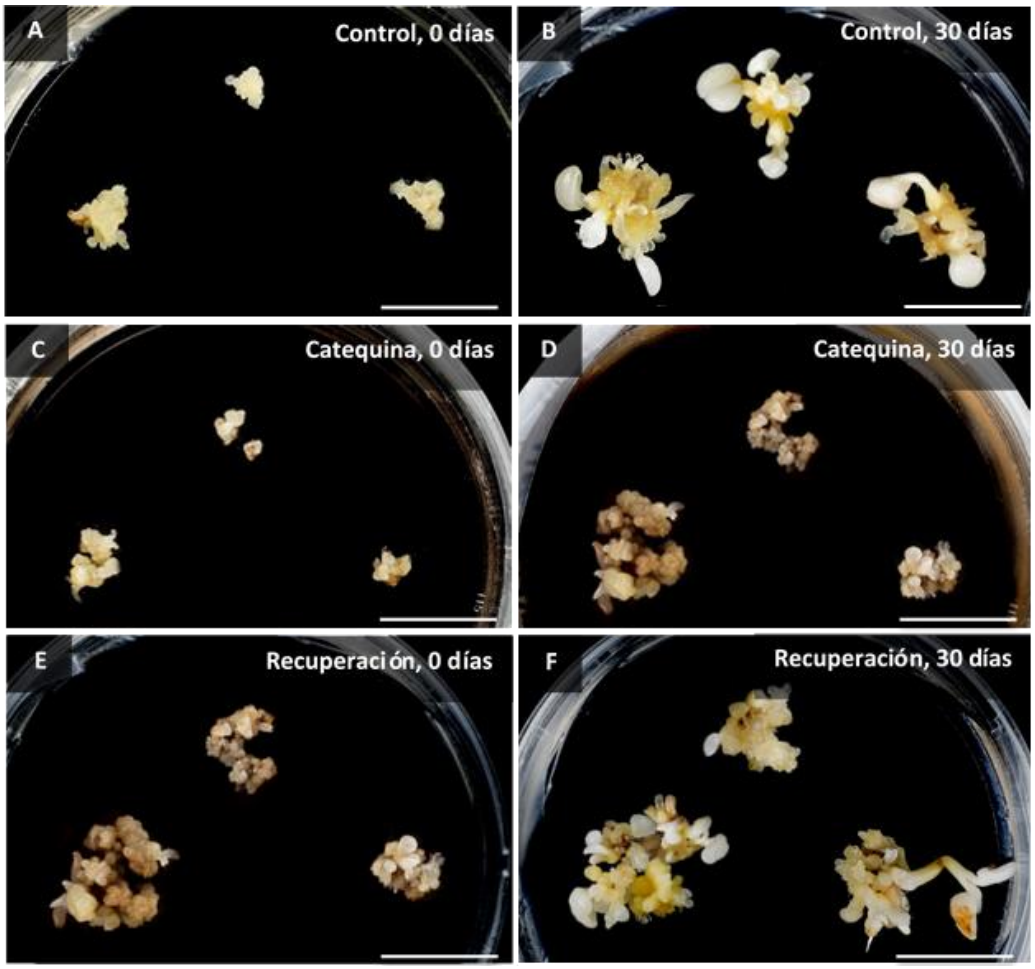


Figura 105. Efecto de la inhibición de la actividad PME en la embriogénesis somática de *Quercus suber* por el tratamiento con catequina y posterior recuperación del desarrollo tras la eliminación del tratamiento. **(A, B)** Cultivo sin tratar: **(A)** Imágenes tomadas al inicio del experimento, día 0, mostrando masas proembriogénicas con algún pequeño embrión en estadio temprano surgiendo de ellas; y **(B)** cultivo al cabo de 30 días donde se observan numerosos embriones diferenciados, en distintos estadios del desarrollo. **(C, D)** Cultivo tratado con catequina: **(C)** Imagen tomada a día 0 del experimento, con masas proembriogénicas similares a las del cultivo control **(C)**; y **(D)** cultivo después de 30 días donde se observa un alto nivel de proliferación de nuevas masas proembriogénicas, pero los embriones a penas se han diferenciado. **(E, F)** Recuperación del cultivo en medio control (sin catequina) después de 30 días en el medio con catequina. **(E)** Mismas muestras que en **(D)**, a día 0 de la recuperación en el medio control. **(H)** Recuperación del cultivo después de 30 días en el medio control. Barras: 1 cm.

Estos resultados indicaron que la inhibición de la actividad PME y, por tanto, la reducción en la desesterificación de pectinas no afectó a las etapas iniciales de la embriogénesis somática, las cuales tuvieron incluso la capacidad de promover la formación de nuevas masas proembriogénicas. Sin embargo, esta inhibición afectó en gran medida al proceso de diferenciación embrionaria y posteriores etapas de

maduración, lo que reveló el importante papel que juegan las PME durante el proceso de la embriogénesis somática de *Quercus suber*.

4.4.6 Desesterificación de pectinas en etapas avanzadas de la embriogénesis de microsporas de *B. napus* y *H. vulgare*

Con el fin de conocer si los cambios en la esterificación de pectinas también tienen lugar en otros sistemas de embriogénesis *in vitro* y en otras especies, se llevó a cabo el estudio de las modificaciones de las pectinas durante etapas avanzadas de la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de dos plantas herbáceas: la especie dicotiledónea *Brassica napus* y la especie monocotiledónea *Hordeum vulgare*. Se seleccionaron etapas avanzadas de la embriogénesis por ser el momento del desarrollo con mayor actividad PME, según los resultados obtenidos previamente en la especie *Quercus suber* (Apartados 4.4.1-4.4.5).

4.4.6.a Inmunolocalización de pectinas esterificadas y no esterificadas en etapas avanzadas de la embriogénesis de microsporas de *Brassica napus*

Para estudiar los patrones de distribución de pectinas con diferente grado de metilesterificación presentes en la pared celular, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia utilizando para ello los anticuerpos testados previamente en la especie *Quercus suber*: LM20, para el reconocimiento de pectinas esterificadas, y LM19 para la detección de pectinas desesterificadas.

Para este estudio se seleccionaron etapas avanzadas del desarrollo embriogénico de *Brassica napus* procedente de embriogénesis de la microspora inducida por estrés: embrión globular, embrión corazón y embrión cotiledonar. Los ensayos de inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal sobre cortes semifinos de 2 µm revelaron un patrón de distribución de pectinas esterificadas y desesterificadas similar al obtenido previamente en etapas avanzadas del ensayo con la especie *Quercus suber*.

En estos análisis se vio cómo las pectinas esterificadas (marcadas con el anticuerpo LM20) se localizaban en las paredes celulares de la mayoría de las células del embrión, a excepción de las células en diferenciación situadas en la zona de la epidermis que

rodea al embrión, las cuales no mostraron señal de fluorescencia, este patrón se observó en la etapa de embrión globular (Fig. 106A-A´), embrión corazón (Fig. 107A-A´) y embrión cotiledonar (Fig. 108A-A´). En estas mismas etapas, el marcado de pectinas desesterificadas con el anticuerpo LM19 se localizó en todas las paredes celulares del embrión globular (Fig. 106B-B´), corazón (Fig. 107B-B´) y cotiledonar (Fig. 108B-B´), incluyendo una alta señal de fluorescencia en las células en diferenciación que forman la epidermis.

Se realizaron experimentos control de este ensayo eliminando el paso de incubación de las muestras con anticuerpo primario. Como resultado, no se observó en ningún caso señal fluorescente de las células (Fig. 107C-C´), lo que demuestra la especificidad de los resultados de inmunofluorescencia obtenidos, así como la ausencia de autofluorescencia de las muestras analizadas.

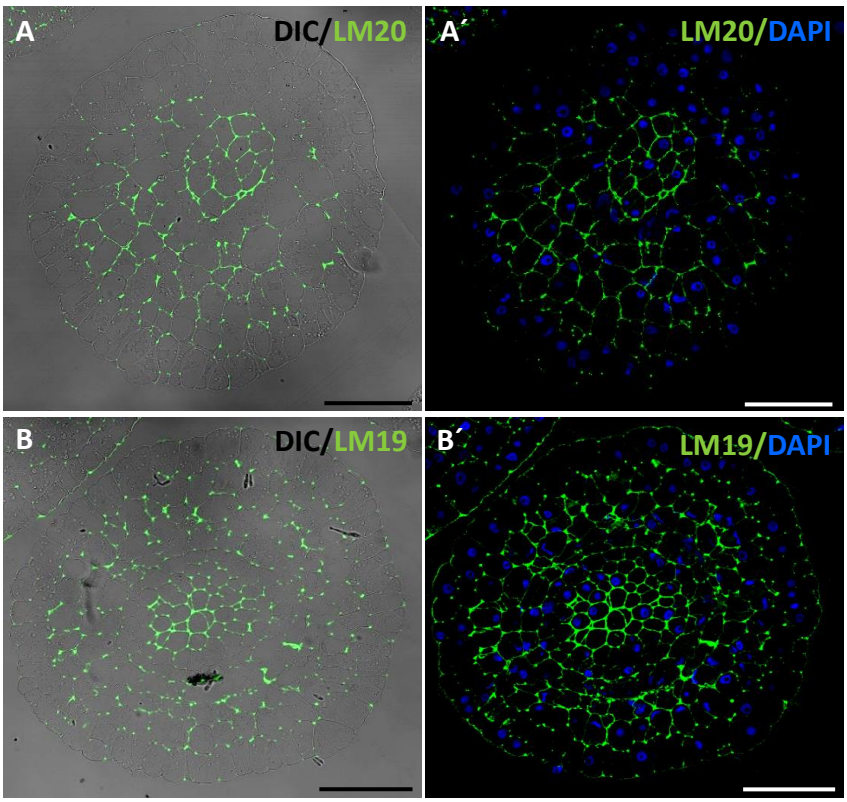


Figura 106. Inmunolocalización de pectinas esterificadas y desesterificadas en etapas avanzadas de la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Hordeum vulgare*. Imágenes de microscopía confocal del estadio de embrión globular. **(A, B)** Combinación del DIC (contraste de interferencia diferencial) y la señal de fluorescencia de las pectinas (verde). (**A´, B´)** Combinación de la tinción de núcleos con DAPI (azul) y la señal de fluorescencia de las pectinas (verde). **(A, A´)** Inmunofluorescencia de pectinas esterificadas marcadas con el anticuerpo LM20. **(B, B´)** Inmunofluorescencia de pectinas desesterificadas marcadas con el anticuerpo LM19. Barras: 50 µm.

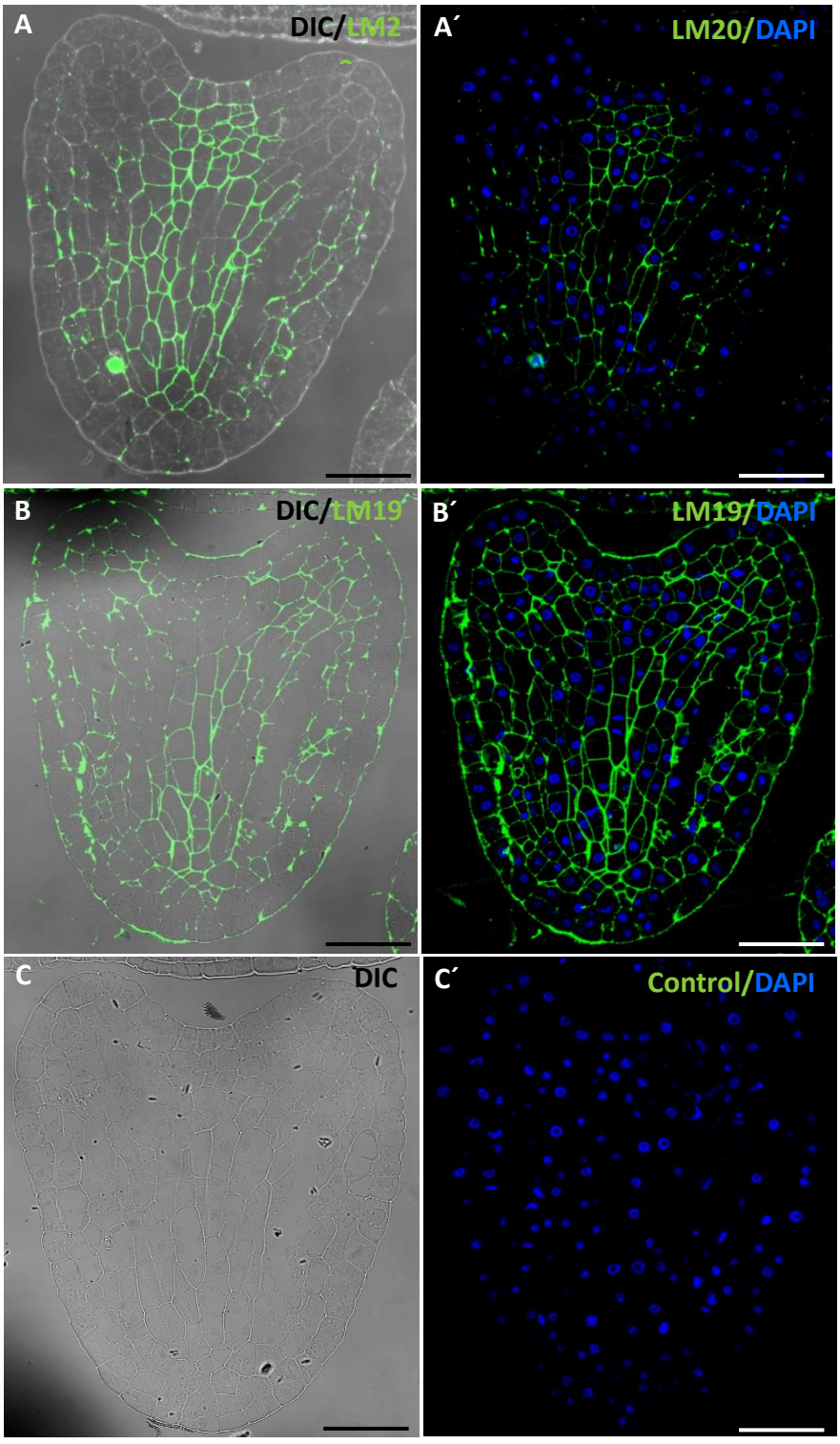


Figura 107. Inmunolocalización de pectinas esterificadas y desesterificadas en etapas avanzadas de la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Hordeum vulgare.* Imágenes de microscopía confocal del estadio de embrión corazón. **(A, B)** Combinación del DIC (contraste de interferencia diferencial) y la señal de fluorescencia de las pectinas (verde). **(A´, B´, C´)** Combinación de la tinción de núcleos con DAPI (azul) y la señal de fluorescencia de las pectinas (verde). **(C)** DIC (contraste de interferencia diferencial). **(A, A´)** Inmunofluorescencia de pectinas esterificadas marcadas con el anticuerpo LM20. **(B, B´)** Inmunofluorescencia de pectinas desesterificadas marcadas con el anticuerpo LM19. **(C, C´)** Control negativo sin anticuerpo primario. Barras: 50 µm.

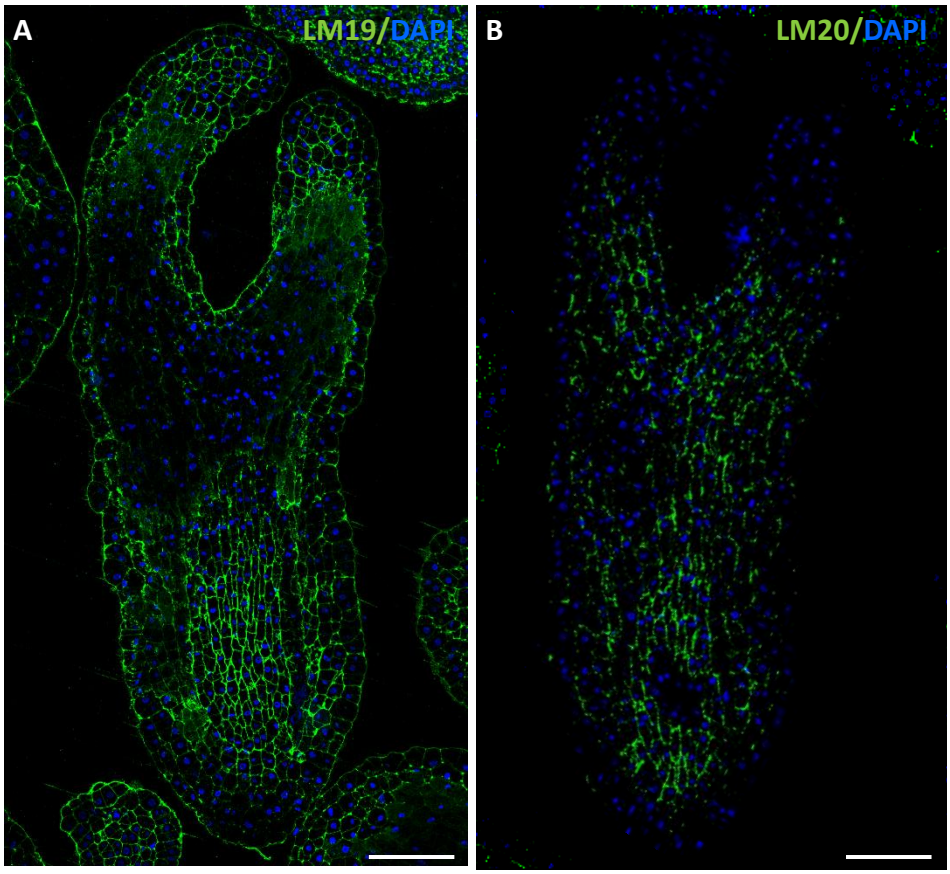


Figura 108. Inmunolocalización de pectinas esterificadas y desesterificadas en etapas avanzadas de la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Hordeum vulgare.* Imágenes de microscopía confocal del estadio de embrión cotiledonar con combinación de la tinción de núcleos con DAPI (azul) y la señal de fluorescencia de las pectinas (verde). **(A)** Inmunofluorescencia de pectinas esterificadas marcadas con el anticuerpo LM20. **(B)** Inmunofluorescencia de pectinas desesterificadas marcadas con el anticuerpo LM19. Barras: 75 µm.

4.4.6.b Expresión de la pectinmetilesterasa *BnPME* y del inhibidor de pectinmetilesterasa *BnPMEI* durante la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Brassica napus*

A continuación, se analizó la expresión de genes implicados en la demetilesterificación de pectinas, la pectinmetilestesaa *BnPME*, y en la inhibición de la actividad de las PME, el inhibidor *BnPMEI*, durante la embriogénesis de microsporas de *B. napus*. Este estudio se llevó a cabo en las etapas seleccionadas de (1) microspora vacuolada aislada (etapa inicial del proceso), (2) proembrión, (3) embrión globular y (4) embrión cotiledonar.

Los resultados obtenidos por qRT-PCR mostraron un aumento progresivo de los niveles de expresión del gen *BnPME* a medida que se avanzaba en el desarrollo (Fig. 100A). Por el contrario, el gen *BnPMEI* mostró niveles de expresión muy bajos en etapas avanzadas del desarrollo, así como en el estadio de microspora vacuolada aislada antes del tratamiento de estrés, mostrando sin embargo valores de expresión génica muy elevados en la etapa de proembrión (Fig. 109B).

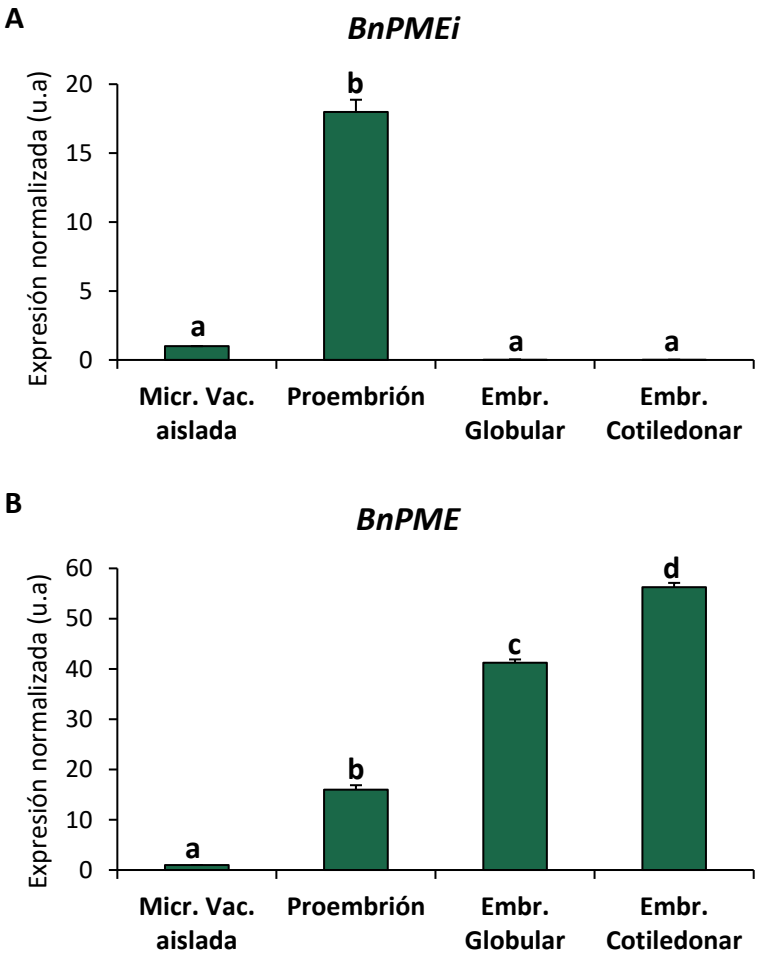


Figura 109. Patrón de expresión génica por qRT-PCR de *BnPME* (gen de pectinmetilesterasa) y *BnPMEI* (gen inhibidor de pectinmetilesterasa) durante la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Brassica napus*. El histograma muestra la expresión génica en cuatro etapas del desarrollo embriogénico de microsporas: microspora vacuolada aislada (Micr. Vac. Aislada), proembrión, embrión globular y embrión cotiledonar. **(A)** Patrón de expresión temporal del gen *BnPME*. **(B)** Patrón de expresión temporal del gen *BnPMEI*. Los niveles de transcripción fueron normalizados utilizando los valores del gen endógeno de referencia *AtHELICASA* Los datos muestran los niveles de expresión (en unidades arbitrarias: u.a) normalizados a la etapa de microspora vacuolada aislada. Las barras representan el error estándar de la media (*SEM*). Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$.

Estos resultados indican un aumento en la demetilesterificación de pectinas en etapas avanzadas del desarrollo embriogénico de *B. napus*, tal y como se vio que también ocurría en los estadios avanzados de la embriogénesis somática de *Quercus suber*.

4.4.6.c Efectos de la inhibición de la actividad pectinmetilesterasa con catequina PP60 en la progresión de la embriogénesis de microsporas de *Brassica napus*

Con el objetivo de analizar si la desesterificación de pectinas está implicada en la progresión de la embriogénesis de la microspora de *B. napus*, se llevaron a cabo análisis funcionales con el compuesto PP60, un conocido inhibidor específico de la actividad PME. Para llevar a cabo el experimento se seleccionaron cultivos de *B. napus* en un momento concreto del desarrollo, el estadio de embrión globular, a los que se les añadió distintas concentraciones de PP60. A las placas control que se les añadió el mismo volumen de DMSO, el disolvente utilizado para preparar el tratamiento. Todas las placas se mantuvieron en las condiciones habituales de cultivo para este estadio (25^{o}C, oscuridad y agitación) y, transcurridos 30 días desde la inducción, se procedió a evaluar el efecto del tratamiento.

Después de 30 días, se llevó a cabo la cuantificación del número total de embriones diferenciados en las placas control y tratadas con catequina PP60 (Fig. 110A). Los resultados obtenidos mostraron un menor número de embriones diferenciados en los cultivos tratados y, además, se pudo apreciar como este efecto inhibitorio de la diferenciación de los embriones resultó ser dependiente de la dosis, observándose menor número de embriones diferenciados a medida que aumenta la concentración del tratamiento (Fig. 110A).

Este experimento nos permitió apreciar no solo el menor número de embriones diferenciados de los cultivos tratados con respecto a los cultivos control, sino que también se observó que los embriones tratados con las concentraciones más elevadas del tratamiento tenían un estadio menos avanzado de desarrollo (Fig. 110B-G). Este efecto en el grado de diferenciación de los embriones se empezó a observar más claramente al añadir la catequina a la concentración de 200 µg/ml en el cultivo (Fig.

110F) donde, tras 30 días de cultivo, los embriones presentes en el cultivo no avanzaron en el desarrollo más allá del estadio de embrión torpedo o cotiledonar temprano. Este efecto se hizo aún más patente cuando se aumentó la concentración del tratamiento hasta 1 mg/ml, donde tras 30 días de cultivo solo se observaron dos embriones diferenciados en el estadio de embrión corazón (Fig. 110G).

Estos resultados indican que la inhibición de la actividad PME, y por tanto la reducción en la desesterificación de pectinas, afecta negativamente al proceso de diferenciación embriogénica de *Brassica napus*, demostrándose así el importante papel que juegan las PME en las etapas finales de la embriogénesis en esta especie.

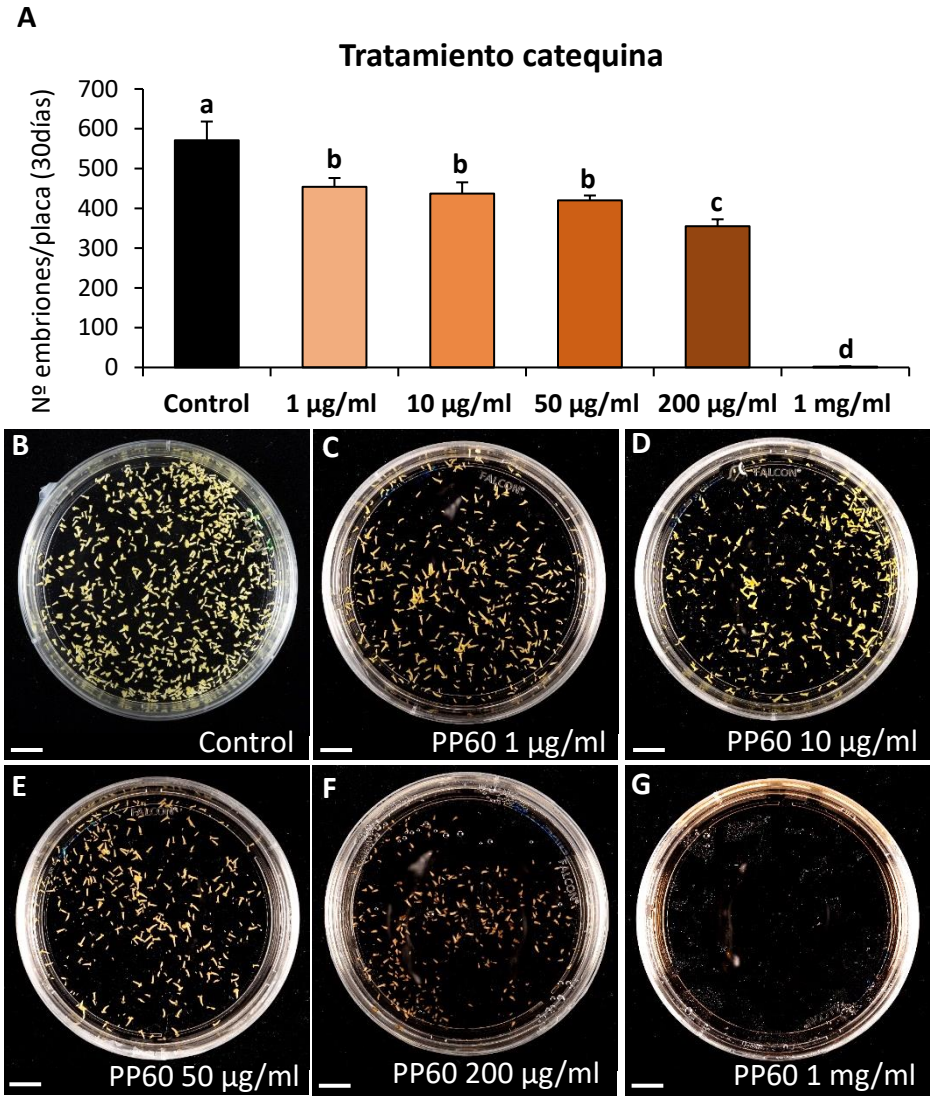


Figura 110. Efecto de la inhibición de la actividad PME en la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Brassica napus*, por el tratamiento con catequina. **(A)** Cuantificación de la producción de embriones en cultivos sin tratar y tratados con distintas concentraciones de catequina (1 µg/ml, 10µg/ml, 50µg/ml, 200µg/ml y 1 mg/ml). Las columnas representan el valor promedio del número de embriones diferenciados por placa Petri en cultivos control y tratados con las distintas concentraciones de catequina, tras 30 días de cultivo. Las barras representan el error estándar de la media (*SEM*). Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$. **(B-G)** Imágenes de cultivos en placa Petri donde se muestran los embriones maduros derivados de microsporas tras 30 días de cultivo en medio control **(B)** y tratado con catequina a las concentraciones de 1 µg/ml **(C)**, 10µg/ml **(D)**, 50µg/ml **(E)**, 200µg/ml **(F)** y 1 mg/ml **(G)**. Barras: 1 cm.

4.4.6.d Inmunolocalización de pectinas esterificadas y no esterificadas durante la embriogénesis de microsporas de *Hordeum vulgare*

En este ensayo, se analizó el patrón de distribución subcelular de pectinas esterificadas (reconocidas por el anticuerpo LM20) y desesterificadas (reconocidas por el anticuerpo LM19) en cortes semifinos del estadio de embrión coleoptilar, etapa avanzada de la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *H. vulgare*.

En esta especie, al igual que se observó previamente en *Brassica napus* y *Quercus suber*, la inmunofluorescencia con el anticuerpo LM20 mostró una distribución de pectinas esterificadas en todas las células del embrión coleoptilar, siendo esta señal más intensa en las células con altos niveles de proliferación (Fig. 111D-F). Del mismo modo que ocurría en los análisis previos de inmunofluorescencia con LM20, en las células epidérmicas, las cuales aparecen como una única capa de células rodeando la estructura del embrión, no se aprecia ninguna señal fluorescente. Del mismo modo, el marcado de pectinas desesterificadas con el anticuerpo LM19 mostró la localización de las mismas en las paredes de todas las células del embrión, destacando la elevada intensidad del marcado en la capa de células epidérmicas, con altos niveles de diferenciación (Fig. 111A-C).

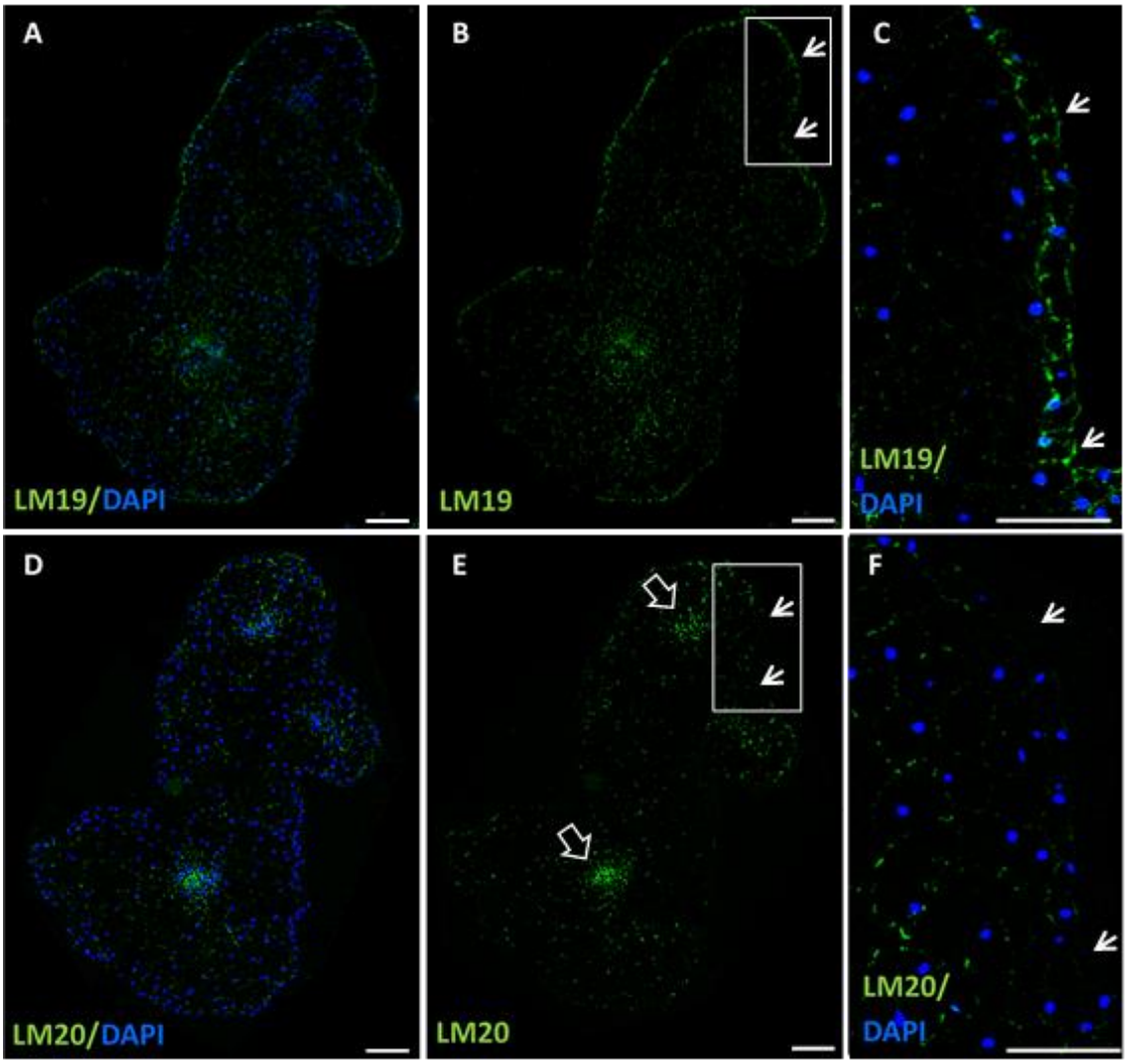


Figura 111. Inmunolocalización de pectinas esterificadas y desesterificadas en etapas avanzadas de la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Hordeum vulgare.* Imágenes de microscopía confocal donde se distingue la señal de fluorescencia de las pectinas (verde) y la tinción de núcleos con DAPI (azul). **(A, B, C)** Inmunofluorescencia de pectinas esterificadas marcadas con el anticuerpo LM20. **(D, E, F)** Inmunofluorescencia de pectinas desesterificadas marcadas con el anticuerpo LM19. **(C, F)** Aumento de la zona de la epidermis y los tejidos adyacentes. Los recuadros en **(B, E)** muestran la zona ampliada en **(C, F)**. Las flechas gruesas señalan células con alto nivel de proliferación. Las flechas finas señalan las células epidérmicas. Barras: 75 µm.

4.4.6.e Expresión de la pectinmetilesterasa *HvPME* durante la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Hordeum vulgare*

Se llevaron a cabo estudios de expresión génica por qRT-PCR del gen *HvPME* en distintos estadios del desarrollo: (1) microspora vacuolada aislada (etapa previa a la inducción embriogénica), proembrión trascurridos 6 días de cultivo y (3) embrión

coleoptilar, tras 30 días de cultivo. Los resultados mostraron un aumento progresivo de los niveles de expresión a medida que se avanza en el desarrollo (Fig. 112).

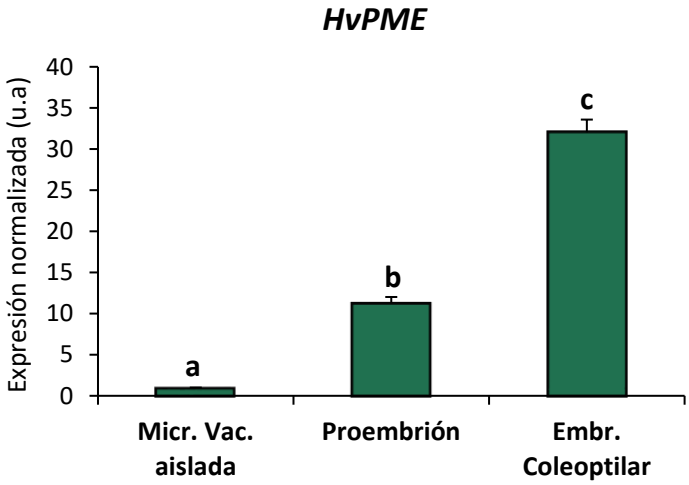


Figura 112. Patrón de expresión génica por qRT-PCR de *HvPME* (gen de pectinmetilesterasa) durante la embriogénesis de microsporas inducida por estrés de *Hordeum vulgare*. El histograma muestra la expresión génica en tres etapas del desarrollo embriogénico de microsporas: microspora vacuolada aislada (Micr. Vac. Aislada), proembrión y embrión coleoptilar. Los niveles de transcripción fueron normalizados utilizando los valores del gen endógeno de referencia Hvciclofilina. Los datos muestran los niveles de expresión (en unidades arbitrarias: u.a) normalizados a la etapa de microspora vacuolada aislada. Las barras representan el error estándar de la media (*SEM*). Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$.

Analizando de forma conjunta los resultados obtenidos en las tres especies: *Quercus suber, Brassica napus* y *Hordeum vulgare*, los datos indican que los cambios en la dinámica de la pared celular controlada por la metilesterificación de pectinas, mediados por enzimas pectinmetilesterasas (PME) e inhibidores de pectinmetilesterasas (PMEI), juegan un importante papel en los tres sistemas de embriogénesis, destacando especialmente su importancia en etapas avanzadas del desarrollo, donde la actividad PME juega un papel relevante en el proceso de diferenciación embriogénica.

4.5 CAMBIOS EN LAS AGPs DE LA PARED CELULAR DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *Q. SUBER* Y LA EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS DE *H. VULGARE*

Con el objetivo de continuar con la caracterización de factores implicados en la remodelación de la pared celular durante la embriogénesis somática de *Quercus suber y Hordeum vulgare*, se procedió a analizar los cambios en las proteínas de arabinogalactano o AGPs, un grupo de proteínas estructurales que forman parte de la matriz de la pared celular, con la finalidad de conocer su posible papel regulador en el proceso embriogénico.

4.5.1 Patrones temporales y de localización subcelular de las AGPs durante la embriogénesis somática de *Q. suber*

Con el fin de analizar las variaciones en los niveles de AGPs durante la embriogénesis somática, se procedió a la localización de estas proteínas mediante técnicas de *dot blot* y ensayos de inmunofluorescencia.

Los ensayos de *dot blot* se llevaron a cabo utilizando por un lado los anticuerpos monoclonales LM6 y LM2 específicos de AGPs (ensayo de inmuno *dot blot*); y por otro lado reactivos Yariv. Los reactivos Yariv son sondas sintéticas que fueron inicialmente desarrolladas como antígenos de carbohidratos para la purificación de anticuerpos antiglucósidos y proteínas de unión a azúcares (Yariv *et al*., 1962). Más tarde, se observó que estos reactivos precipitaban AGPs en una gran variedad de extractos vegetales (Yariv *et al*., 1967), utilizándose a partir de entonces en gran medida para la purificación de AGPs (Paulsen *et al*., 2014). En este ensayo se han utilizado dos tipos de reactivos Yariv para analizar cambios en el contenido total de AGPs en diferentes etapas de la embriogénesis somática de *Quercus suber*: β-Glucosyl-Yariv, descrito como reactivo de reconocimiento y agregación de AGPs; y β-Mannosyl-Yariv, el cual no reacciona con AGPs y se ha utilizado como control negativo del ensayo (Tang *et al*., 2006; Paulsen *et al*., 2014).

En todos los ensayos de *dot blot*, tanto con los reactivos Yariv como con los anticuerpos monoclonales LM6 y LM2, se aplicó el mismo volumen de extracto proteico, ajustado con la misma concentración de proteínas totales para cada una de las etapas del desarrollo estudiadas: (1) “masas proembriogénicas” (MPE), (2) embriones corazón-

torpedo y (3) embriones cotiledonares maduros. En el *dot blot* con β-Glucosyl-Yariv y β-Mannosyl-Yariv se utilizó también goma arábiga (la cual contiene una mezcla de AGPs en su composición) como control positivo del ensayo, y PBS como control negativo.

El experimento de *dot blot* con β-Glucosyl-Yariv mostró precipitados/puntos de coloración rojiza en todas las etapas de la embriogénesis, así como en la muestra de goma arábiga, lo cual indica la presencia de AGPs en las muestras (Fig. 113A). Por otro lado, el *dot blot* con β-Mannosyl-Yariv no mostró reacción colorimétrica en ninguna de las muestras (Fig. 113A), lo que demuestra la especificidad del ensayo con β-Glucosyl-Yariv. La intensidad de la señal en el *dot blot* con β-Glucosyl-Yariv fue menor en la etapa de masas proembriogénicas, incrementándose en las etapas más avanzadas del desarrollo de embriones corazón-torpedo y embriones cotiledonares maduros (Fig. 113A). Estos resultados indican que el contenido total de AGPs aumenta a medida que progresa la embriogénesis somática. El control negativo con PBS no mostró ninguna señal (Fig. 113A).

Para completar la información obtenida en el *dot blot* con los reactivos Yariv, se realizaron ensayos adicionales de inmuno *dot blot* utilizando los anticuerpos monoclonales LM6 y LM2, los cuales reconocen diferentes epítopos dentro de la compleja estructura glicosilada de las AGPs. El anticuerpo LM2 reacciona específicamente con el β-GlcA (ácido glucurónico) de AGP-glicanos (Smallwood *et al*., 1996), mientras que LM6 reconoce el α-(1-5)-L-arabinano y por tanto tiene afinidad por las arabinosas de las AGPs y también puede unirse a algunas cadenas del domino ramnogalacturonano I y II de las pectinas(Willats *et al*., 1998; Verhertbruggen *et al*., 2009). Ambos anticuerpos mostraron señal colorimétrica en el inmuno *dot blot* en todas las etapas analizadas y un aumento de la intensidad de la señal a medida que avanza la embriogénesis somática (Fig. 113B). El estadio de masas proembriogénicas fue el que presentó menor intensidad de señal, mientras que la etapa de embrión cotiledonar maduro fue la etapa que mostró mayor intensidad para ambos anticuerpos (Fig. 113B). Estos resultados indican que ambos epítopos de AGPs aumentan en etapas avanzadas de la embriogénesis somática. En la etapa de embriones corazón-torpedo se detectó un

aumento de la intensidad de la señal en los epítopos de LM6, mientras que en esta etapa la señal de los epítopos de LM2 fue ligeramente menor (Fig. 113B).

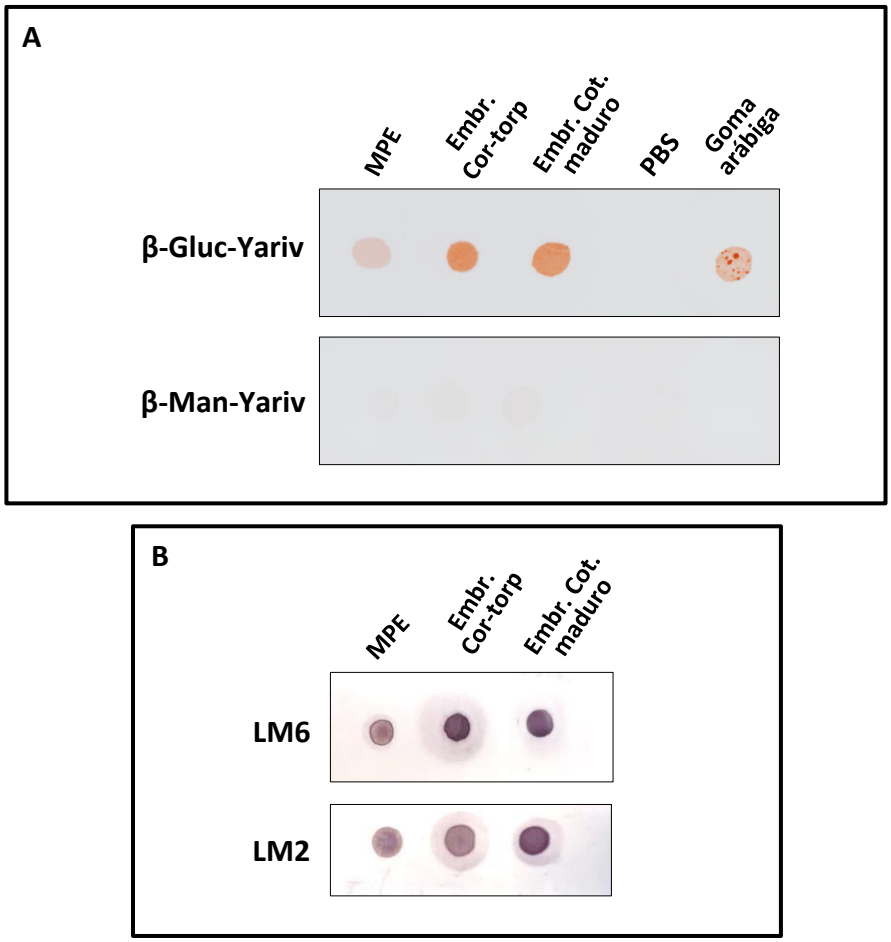


Figura 113. Patrón temporal de AGPs durante la embriogénesis somática de *Quercus suber*. Se aplicó el mismo volumen y concentración de extracto proteico para cada una de las etapas del desarrollo: masas proembriogénicas (MPE), embriones corazón-torpedo y embriones cotiledonares maduros. **(A)** Ensayos de inmuno *dot blot* teñidos con el reactivo β-Glucosyl-Yariv, secuestrador de AGPs, y el reactivo β-Mannosyl-Yariv, el cual no se une a AGPs; de izquierda a derecha se encuentran las muestras correspondientes a MPE, embriones corazón-torpedo, embriones cotiledonares maduros, PBS (control negativo) y goma arábiga (control positivo). La membrana teñida con β-Gluc-Yariv muestra un incremento en la intensidad de color (lo cual indica un incremento del contenido en AGPs) a medida que progresa la embriogénesis somática. La membrana control, teñida con β-Man-Yariv, no muestra señal de color en ningún punto. **(B)** Ensayos de inmuno *dot blot* con los anticuerpos LM6 y LM2, específicos en el reconocimiento de epítopos de AGPs.

También se procedió a estudiar la localización de AGPs mediante ensayos de inmunofluorescencia y análisis de microscopía confocal con los anticuerpos monoclonales LM6 y LM2, utilizados previamente en los experimentos de inmuno *dot blot*. Con ambos anticuerpos se pudo visualizar un marcado específico, tanto en las

etapas más tempranas como en las más avanzadas de la embriogénesis somática, mostrando ambos anticuerpos menor intensidad de fluorescencia en etapas tempranas en comparación con la señal más intensa observada en los estadios más avanzados del desarrollo (Fig. 114). La intensidad de inmunofluorescencia con LM6 y LM2 fue menor en las masas proembriogénicas (Fig. 114A, D) que en los embriones somáticos en desarrollo, aumentando en embriones corazón-torpedo (Fig. 114B, E) y embriones cotiledonares maduros (Fig. 114C, F). El patrón de localización de AGPs reconocido por el anticuerpo LM6 fue ligeramente distinto al mostrado con LM2. La señal con LM6 fue localizada de forma homogénea en las paredes de todas las células de las masas proembriogénicas (Fig. 114A), mientras que la señal con LM2 mostró mayor intensidad en algunas células de las masas proembriogénicas que en otras (Fig. 114D). En los estadios más avanzados del desarrollo, las paredes de los embriones corazón-torpedo (Fig. 105B, E) y embriones cotiledonares maduros (Fig. 114C, F) mostraron una intensa señal de fluorescencia con ambos anticuerpos. En algunos casos, la señal de inmunofluorescencia de LM6 y LM2 no solo aparecía en las paredes celulares, sino también en ciertas zonas del citoplasma de las células (Fig. 114C, E, F), siendo esta localización más evidente con el anticuerpo LM2. Específicamente, este marcado con LM2 en el citoplasma mostraba un patrón de localización en pequeños spots citoplásmicos (Fig. 114F, imagen insertada dentro del recuadro blanco), que podría ser compatible con la presencia de AGPs en estructuras de la ruta secretora, responsables de la liberación de AGPs recién sintetizadas a la pared celular, tal y como se ha descrito previamente para los epítopos de LM2 (Šamaj *et al*., 2000; El-Tantawy *et al*., 2013).

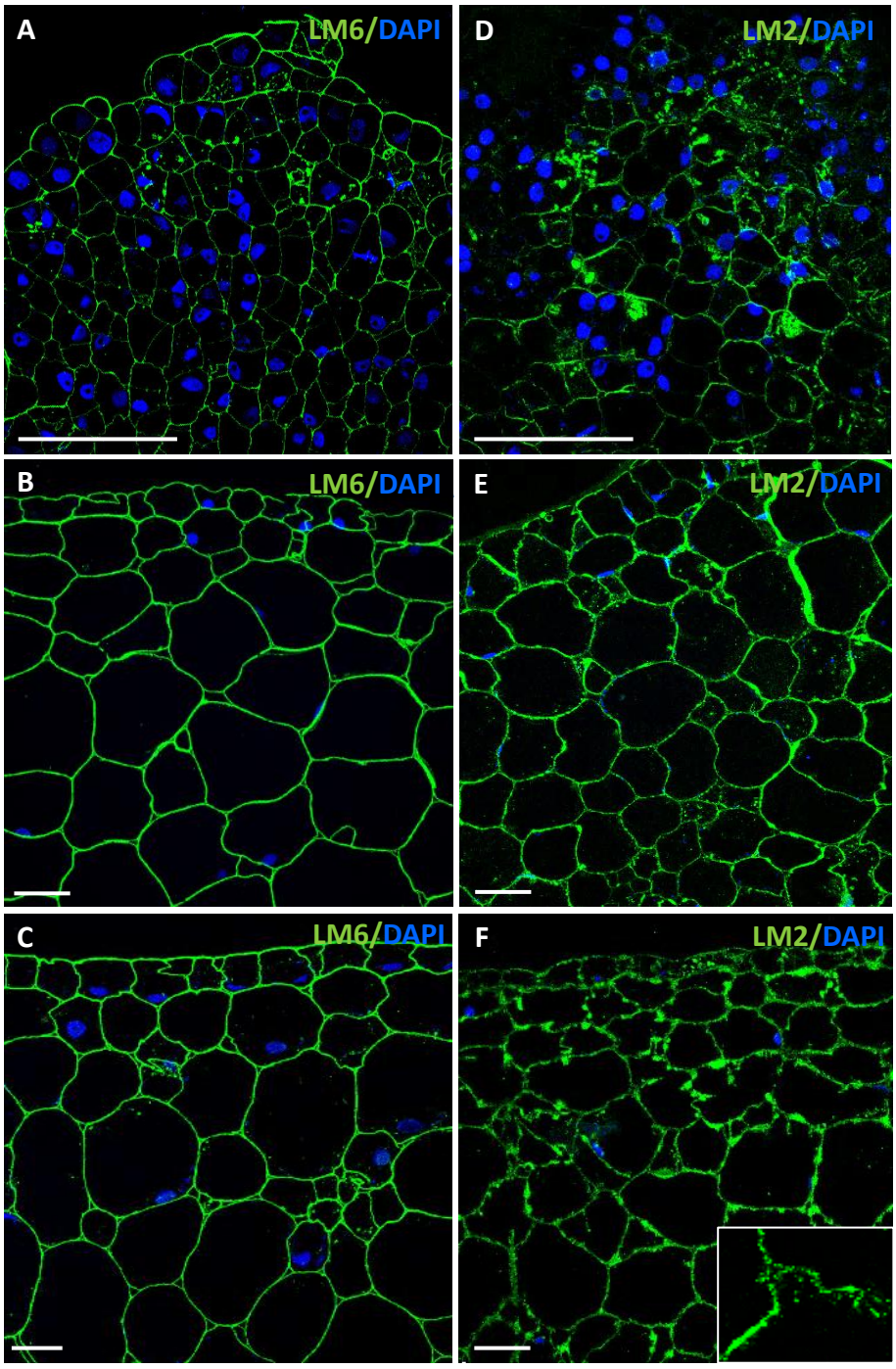


Figura 114. Inmunolocalización de AGPs durante la embriogénesis somáticade *Quercus suber*. La inmunofluorescencia de los epítopos de AGPs están marcados con los anticuerpos LM6 y LM2. Las imágenes de microscopía confocal muestran la combinación de la señal de fluorescencia las AGPs (verde) y la tinción de núcleos con DAPI (azul). **(A-C)** Inmunofluorescencia de epítopos de AGPs marcados con anticuerpo LM6. **(D-F)** Inmunofluorescencia de epítopos de AGPs marcados con el anticuerpo LM2. **(A, D)** Masas proembriogénicas donde se muestra una región similar a la de la figura 97D. **(B, E)** Embrión torpedo, región similar a la de la figura 97F. **(C, F)** Embrión cotiledonar, región similar a la de la mostrada en la figura 97G. **(F)** La imagen insertada en el recuadro muestra un mayor aumento de esa zona para ilustrar el marcado de las paredes celulares y los pequeños spots citoplásmicos. Barras: 20µm.

4.5.2 Expresión génica de las AGPs *QsLys-rich-AGP17*, *QsLys-rich-AGP18* y *QsAGP16L1* durante la embriogénesis somática de *Q. suber*

Con el fin de conocer el posible papel que juegan las AGPs durante la embriogénesis somática del alcornoque, se procedió a analizar los patrones temporales de expresión génica de tres genes de AGPs en tres etapas secuenciales del desarrollo: masas proembriogénicas, embriones corazón-torpedo y embriones cotiledonares maduros (Fig. 97). A pesar de que existe muy poca información sobre AGPs en la base de datos del alcornoque, para seleccionar los genes a analizar se tuvo en cuenta la información descrita para algunas de estas secuencias y su posible relación con la formación de embriones, seleccionándose algunas de ellas con la idea de que también pudieran estar expresándose durante la embriogénesis somática. Entre las secuencias de posibles de AGPs recogidas en la base de datos del alcornoque, se seleccionaron tres secuencias que codifican para dos familias/grupos de AGPs diferentes: *QsLys-rich-AGP17* y *QsLys-rich-AGP18* que pertenecen al grupo de las AGPs ricas en lisina; y *QsAGP16L1* que pertenece al grupo de los denominados péptidos AG, tratándose de una secuencia previamente identificada y caracterizada en *Q. suber* (Costa *et al*., 2015b). Se ha documentado la expresión génica de *AGP17*, *AGP18* y *AGP16* en silicuas, las cuales contienen embriones (Han *et al*., 2017), y *AGP18* ha sido también descrito como un gen esencial en la formación de gametos femeninos (Acosta-García y Vielle-Calzada, 2004).

Estos ensayos de expresión, llevados a cabo mediante análisis de qRT-PCR, proporcionaron información sobre los perfiles temporales de expresión génica, mostrando un aumento en los niveles de expresión para los tres genes analizados según avanza el desarrollo (Fig. 115A-C). En las etapas iniciales, representadas con la fase de masas proembriogénicas, se mostraron niveles bajos de expresión, mientras que el nivel de transcripción aumentó notablemente durante las etapas posteriores del desarrollo, en los embriones corazón-torpedo (Fig. 115). La expresión génica de *QsLys-rich-AGP18* y *QsAGP16L1* en esta etapa aumentó alrededor de ocho veces en comparación con la mostrada en la etapa de masas proembriogénicas (Fig. 115A y B), y la expresión del gen *QsLysrich-AGP17* fue cerca de cuatro veces mayor en embriones corazón-torpedo que en las masas proembriogénicas (Fig. 115C). En los estadios más avanzados, en embriones cotiledonares maduros, de nuevo se aprecia un aumento de la expresión

génica en dos de los genes analizados: *QsLys-rich-AGP18* y *QsAGP16L1* (Fig. 115A, B); mientras que la expresión del gen *QsLys-rich-AGP17* disminuyó ligeramente en comparación con los niveles mostrados en la etapa de embriones corazón-torpedo, manteniéndose aun así unos niveles de expresión significativamente más elevados que los mostrados en la etapa de masas proembriogénicas (Fig. 115C).

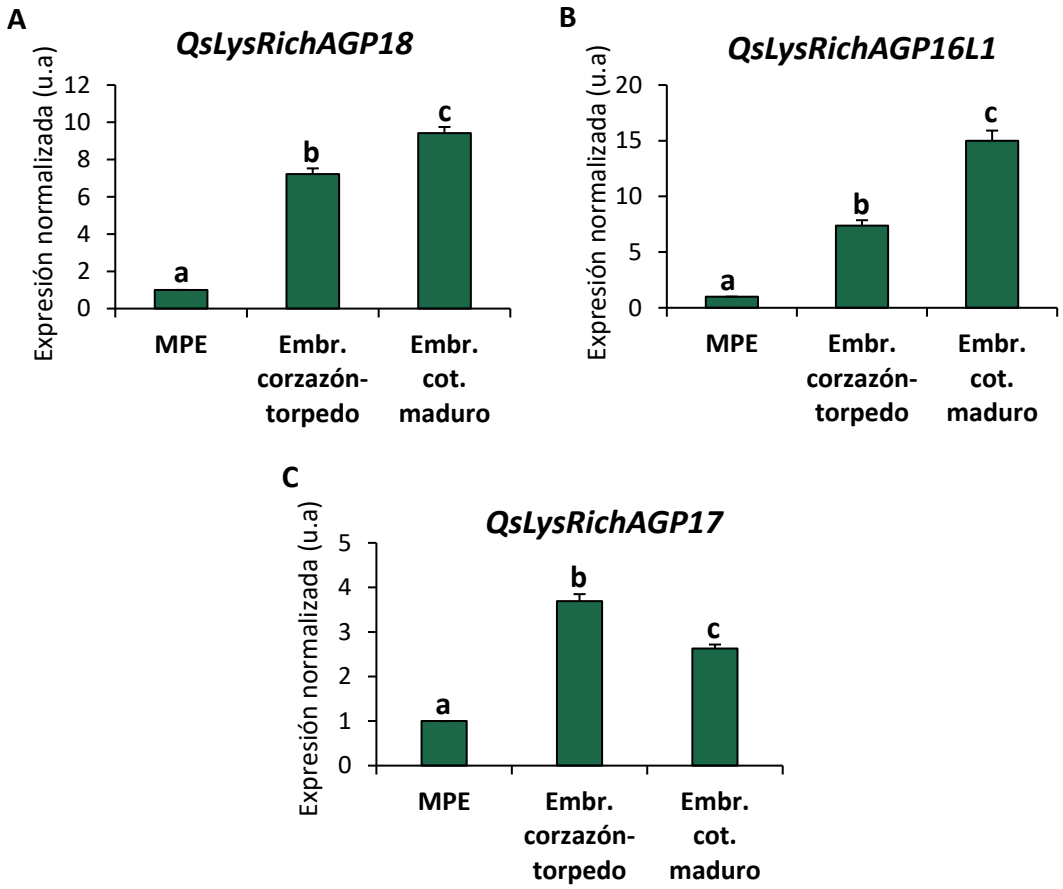


Figura 115. Patrones de expresión génica por qRT-PCR de tres genes de AGPs durante la embriogénesis somática de *Quercus suber*. Los histogramas muestran la expresión génica en tres etapas de la embriogénesis somática: masas proembriogénicas (MPE), embriones corazón-torpedo y embriones cotiledonares maduros. **(A)** Patrón de expresión temporal del gen *QsLys-rich-AGP18*. **(B)** Patrón de expresión temporal del gen *QsAGP16L1*. (C) Patrón de expresión temporal del gen *QsLys-rich-AGP17*. Cada columna representa el valor promedio de al menos tres muestras biológicas diferentes y tres réplicas técnicas. Los niveles de transcripción fueron normalizados utilizando los valores del gen endógeno de referencia *QsACTINA*. Los datos muestran los niveles de expresión (en unidades arbitrarias: u.a) normalizados a la etapa de MPE. Las barras representan el error estándar de la media (*SEM*). Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$.

4.5.3 Efectos del bloqueo de AGPs por precipitación con Yariv en la embriogénesis somática de *Q. suber*

Los resultados obtenidos en los análisis de expresión génica de tres secuencias de AGPs junto con los experimentos de inmuno *dot blot* e inmunofuorescencia, indicaron un aumento progresivo en el contenido de AGPs de las paredes celulares a medida que avanza la embriogénesis somática. Con el fin de analizar la posible implicación de las AGPs endógenas en el proceso de la embriogénesis somática de *Quercus suber*, se llevaron a cabo análisis funcionales tratando los cultivos con el reactivo β-Glucosyl-Yariv, el cual bloquea y precipita específicamente las AGPs.

Para estos ensayos se utilizaron dos reactivos Yariv: β-Glucosyl-Yariv, el cual actúa agregando moléculas de AGP; y β-Mannosyl-Yariv con una estructura molecular similar pero carente de esta función (Tang *et al*., 2006; Paulsen *et al*., 2014). El experimento se llevó a cabo seleccionando un número determinado de masas proembriogénicas y transfiriéndolas a un medio de cultivo control o a un medio al que se añadió previamente β-Gluc-Yariv o β-Man-Yariv a una concentración 50 µM, concentración usada previamente en ensayos *in vitro* (El-Tantawy, 2016; Makowska *et al*., 2017). Al cabo de 30 días, los cultivos control y los tratados con β-Man-Yariv se desarrollaron de forma similar, mostrando la proliferación de nuevas masas proembriogénicas y la formación de numerosos embriones en distintos estadios del desarrollo (Fig 116A y Fig. 117A-D). Por el contrario, las masas proembriogénicas cultivadas en el medio con β-Gluc-Yariv mostraron mucho menor grado de desarrollo tras los 30 días de cultivo, produciendo escasas masas proembriogénicas nuevas y solamente algún embrión más desarrollado (Fig. 116B y Fig. 117E-F). Se distinguió mucho menor avance de la embriogénesis somática en las placas tratadas con β-Gluc-Yariv en comparación con las placas control y las placas tratadas con β-Man-Yariv (Fig. 116 y Fig. 117F en comparación con Fig. 117B, D), lo que indica que la precipitación de AGPs por β-Gluc-Yariv inhibió la embriogénesis somática desde las etapas iniciales del desarrollo.

Para evaluar de forma cuantitativa el efecto del tratamiento, se procedió a cuantificar el número de embriones cotiledonares que se habían desarrollado en los cultivos control y los tratados con β-Man-Yariv y β-Gluc-Yariv, después de 30 días. Los

resultados revelaron que el tratamiento con β-Man-Yariv no mostró diferencias significativas en cuanto a la producción de embriones cotiledonares con respecto a los cultivos no tratados, mientras que el número de embriones cotiledonares desarrollados en cultivos tratados con β-Gluc-Yariv fue significativamente menor que en los cultivos no tratados o tratados con β-Man-Yariv (Fig. 116B).

A continuación, se procedió a evaluar la posibilidad de revertir el efecto del tratamiento con β-Gluc-Yariv. Para ello se transfirieron las masas embriogénicas tratadas con este reactivo a un medio de cultivo control. Después de 30 días de cultivo, se pudo apreciar una recuperación de la progresión de la embriogénesis somática, observándose numerosos embriones en distintas etapas de diferenciación (Fig. 117G, H).

Estos resultados indicaron que la inhibición de AGPs impidió en gran medida el proceso de diferenciación embrionaria y posteriores etapas de maduración, recuperándose el desarrollo una vez eliminado el reactivo del medio de cultivo.

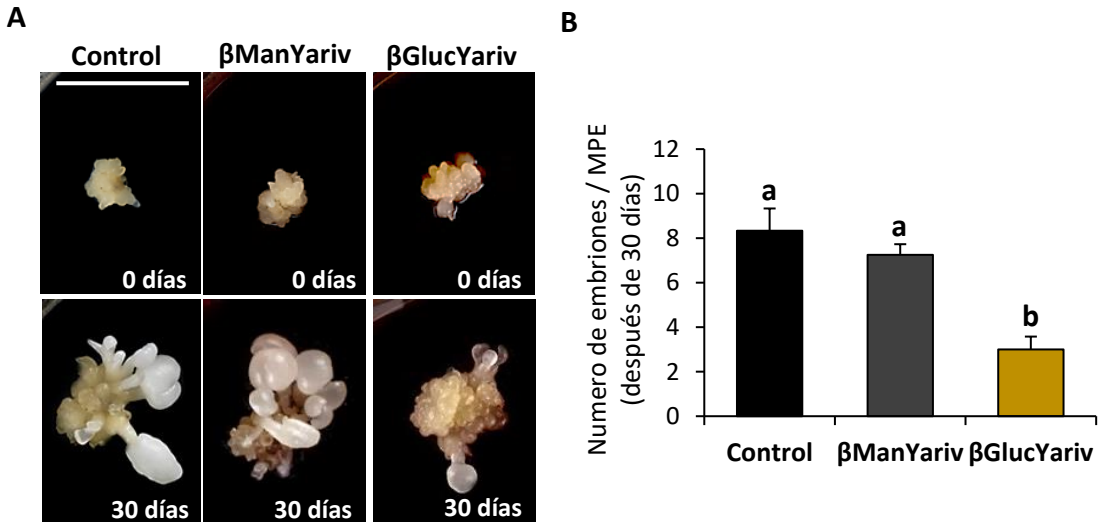


Figura 116. Efecto del bloqueo de AGPs en la embriogénesis somática de *Quercus suber* por el tratamiento con reactivos Yariv. **(A)** De izquierda a derecha se muestra el cultivo control, cultivo tratado con β-Mannosyl Yariv (que no se une a AGPs) y cultivo tratado con β-Glucosyl Yariv (el cual se une a AGPs). Al inicio del experimento (0 días) todos los cultivos mostraban grupos de masas proembriogénicas con algún pequeño embrión surgiendo de las mismas. Transcurridos 30 días del ensayo los cultivos control y con el tratamiento de βManYariv mostraron numerosos embriones en distintos estadios del desarrollo, mientras que los cultivos tratados con βGlucYariv mostraron MPE que habían crecido muy poco y a partir de las cuales solo se habían desarrollado unos pocos embriones. Barras: 1 cm, en todas las imágenes. (B) Cuantificación de la producción de embriones en cultivos sin tratar y tratados con los reactivos YARIV. Las columnas representan el valor promedio del número de embriones diferenciados por masa embriogénica, tras 30 días de cultivo; las barras representan el error estándar de la media (*SEM*). Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$.

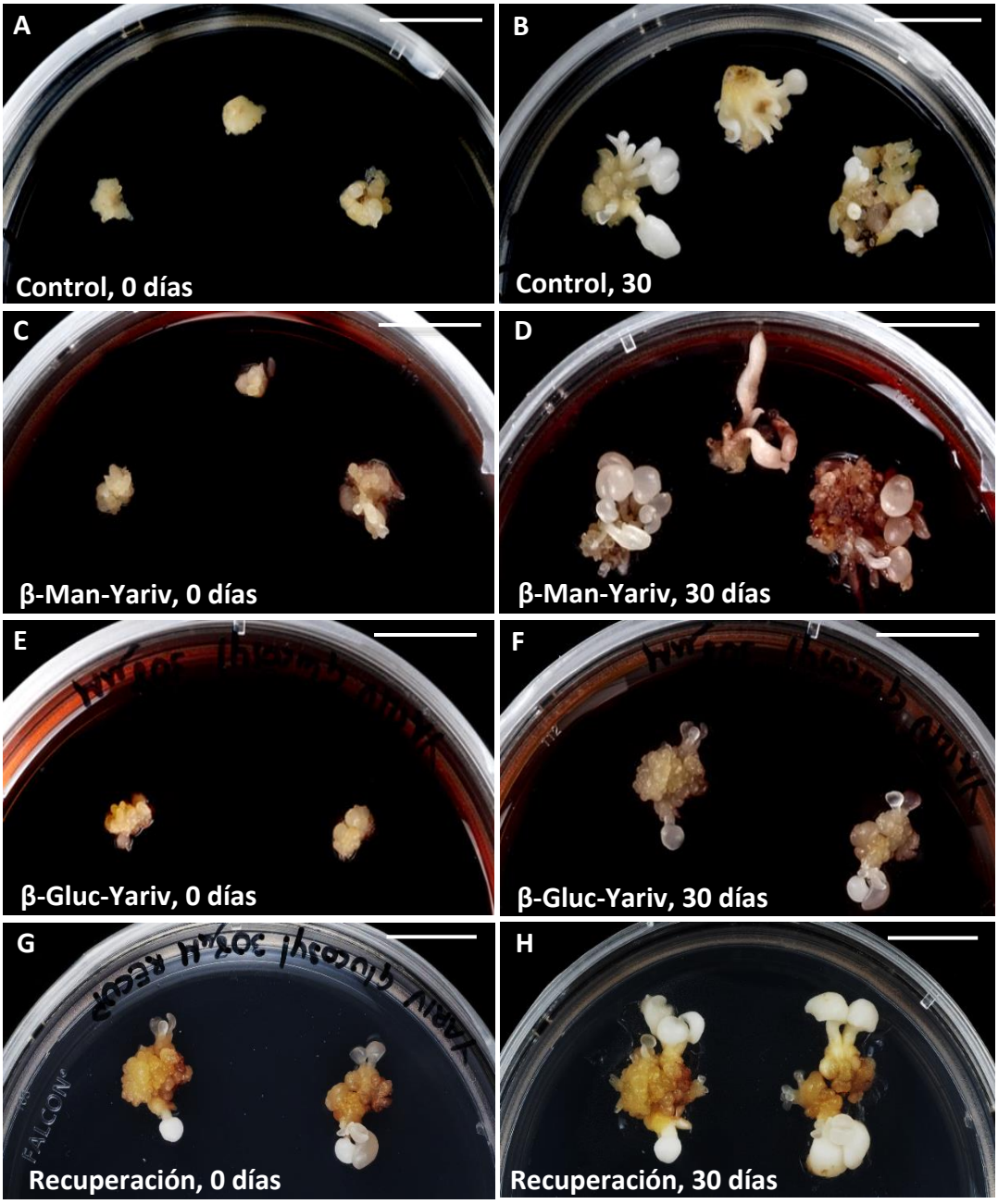


Figura 117. Efecto del bloqueo de AGPs en la embriogénesis somática de *Quercus suber* por el tratamiento con reactivos Yariv y posterior recuperación del desarrollo tras la eliminación del tratamiento. **(A, B)** Cultivo sin tratar. **(C, D)** Cultivo tratado con β-Mannosyl Yariv, el cual no se une a AGPs. **(E, F)** Cultivo tratado con β-Glucosyl Yariv, el cual se une a AGPs. **(A, C, E)** Imágenes tomadas al inicio del experimento, día 0, mostrando masas proembriogénicas con algún pequeño embrión en estadio temprano surgiendo de ellas; y **(B, D, F)** Cultivos al cabo de 30 días. El cultivo control **(B)** y el cultivo tratado con β-Man-Yariv **(D)** mostraron numerosos embriones diferenciados, en distintos estadios del desarrollo. El cultivo tratado con β-Gluc-Yariv **(F)** mostró masas proembriogénicas que habían experimentado proliferación, pero en ellas apenas se habían desarrollado algunos embriones. **(G, H)** Recuperación del cultivo en medio control (sin β-Gluc-Yariv) después de 30 días en el medio con el reactivo β-Gluc-Yariv. **(G)** Mismas muestras que en **(E)**, a día 0 de la recuperación en el medio control. **(H)** Recuperación del cultivo después de 30 días en el medio control, los embriones han continuado desarrollándose y se han diferenciado hacia los distintos estadios embriogénicos. Barras: 1cm.

Estos resultados indican que la precipitación de AGPs endógenas con el reactivo β-Gluc-Yariv afectó negativamente a la progresión de la embriogénesis somática de *Quercus suber*, lo que sugiere que las AGPs juegan un importante papel durante este proceso.

4.5.4 Cambios en las AGPs de la pared celular durante la embriogénesis de microsporas de *H. vulgare*

Con el fin de conocer la implicación de las AGPs en otro sistema modelo de embriogénesis y comparar los resultados con los obtenidos previamente en la embriogénesis somática de *Quercus suber*, se procedió a analizar el patrón de expresión génica de AGPs durante la embriogénesis de microsporas inducida por estrés en la especie monocotiledónea *Hordeum vulgare*. Estudios previos de transcriptómica realizados en el laboratorio con microarrays de DNA (Affimetrix), permitieron identificar cuatro secuencias de AGPs con expresión en cultivos de microsporas de cebada, entre las que se seleccionó la secuencia nombrada en el microarray como Contig6782_at por ser la que presentó los mayores niveles de expresión de las cuatro en embriones derivados de microsporas. Tras realizar un alineamiento de la secuencia de Contig6782_at con las secuencias de la base de datos de cebada IPK Gatersleben (https://webblast.ipk-gatersleben.de), se obtuvo una homología del 100% con la secuencia HORVU1Hr1G087570.1, identificada como FASCICLIN-like arabinogalactan 6, a partir de la cual se diseñaron los oligonucleótidos utilizados en el análisis de qRT-PCR.

Se analizó el patrón temporal de expresión génica de *HvAGP* en tres etapas seleccionadas del desarrollo embriogénico de microsporas: microspora vacuolada aislada, proembrión y embrión coleoptilar.

El resultado del ensayo mostró un aumento de la expresión génica de *HvAGP* a medida que avanza el desarrollo (Fig. 118), mostrando un patrón de expresión temporal análogo al obtenido en la embriogénesis somática de *Quercus suber* para los genes *QsLys-rich-AGP17* y *QsLys-rich-AGP18* y *QsAGP16L1* (Fig. 115).

En etapas iniciales, en la microspora vacuolada aislada, los niveles de expresión fueron bajos, mientras que los niveles de transcripción aumentaron significativamente

en etapas posteriores, la expresión génica de *HvAGP* fue cerca de cuatro veces mayor en la etapa de proembrión y aumentó más de ciento cincuenta veces en la etapa de embrión coleoptilar, comparando los niveles de expresión con la etapa de microspora vacuolada aislada, al inicio del proceso (Fig. 118).

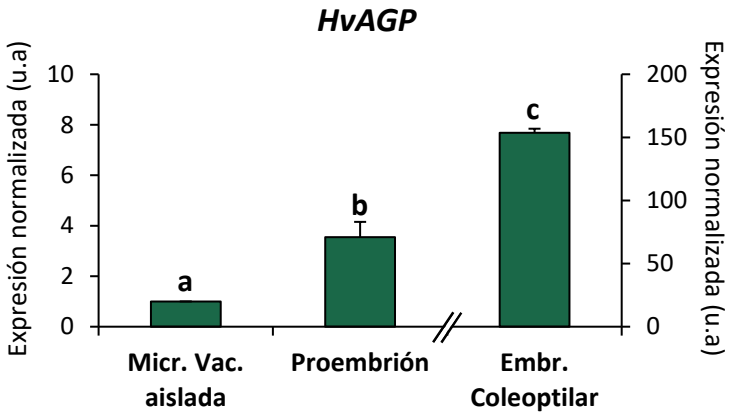


Figura 118. Patrón de expresión génica por qRT-PCR de *HvAGP* durante la embriogénesis de microsporas de *Hordeum vulgare* inducida por estrés. El histograma muestra la expresión génica en tres etapas del desarrollo embriogénico de microsporas: microspora vacuolada aislada (Micr. Vac. Aislada), proembrión y embrión coleoptilar. Los niveles de transcripción fueron normalizados utilizando los valores del gen endógeno de referencia *HvCiclofilina*. Los datos muestran los niveles de expresión (en unidades arbitrarias: u.a) normalizados a la etapa de microspora vacuolada aislada. Las barras representan el error estándar de la media (*SEM*). Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$.

Este resultado correlaciona con resultados previos obtenidos en el laboratorio mediante inmunofluorescencia y *dot blot* de AGPs en la embriogénesis de microsporas de cebada (El-Tantawy, 2016). En conjunto, estos datos indican un aumento en el contenido de AGPs de las paredes celulares a medida que avanza la embriogénesis de microsporas de *Hordeum vulgare*. Además, la realización de este ensayo nos permitió comparar el papel que juegan las AGP en dos sistemas tan diferentes como pueden ser una especie forestal (*Quercus suber*) y un cereal (*Hordeum vulgare*) durante el proceso de embriogénesis somática y embriogénesis de microsporas, respectivamente. Con los resultados obtenidos en ambas especies, se revelan unos cambios en los patrones temporales de las AGPs similares en ambos desarrollos embriogénicos, lo que sugiere una posible conservación de mecanismos y factores implicados en la embriogénesis que

puede apoyar la extrapolación de resultados entre especies con el fin de avanzar cada vez más en el conocimiento de los factores implicados en los procesos de embriogénesis.

4.6 AUTOFAGIA Y PROTEASAS DURANTE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR ESTRÉS EN LA EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS DE *HORDEUM VULGARE*

En la embriogénesis de microsporas, el estrés inductor necesario para la reprogramación e inicio la embriogénesis produce elevados niveles de muerte celular que reducen el rendimiento del proceso. Múltiples estudios han demostrado la implicación de la autofagia y de cisteín proteasas específicas durante numerosos procesos de muerte celular programada en plantas (Bozhkov y Jansson, 2007; Berenguer, 2020).

En esta tesis se ha analizado la posible participación de la autofagia y de cisteín proteasas en dos procesos de muerte celular: 1) el proceso de muerte celular que tiene lugar durante la embriogénesis de microsporas de *H. vulgare*, tras aplicar el tratamiento de estrés inductor en cultivos de microsporas aisladas; y 2) el proceso de MCP que tiene lugar en las células del tapetum durante el desarrollo del polen de esta especie, un sistema modelo para el estudio de MCP del que, sin embargo, aún se desconocen en gran medida sus mecanismos de regulación.

4.6.1 Muerte celular inducida por estrés en la embriogénesis de microsporas de *H. vulgare*

Para llevara a cabo la embriogénesis de microsporas aisladas de *H. vulgare* es necesario aplicar un tratamiento de estrés por frío (4^{o}C), el cual induce la reprogramación de las microsporas hacia una ruta embriogénica. Sin embargo, después de aplicar el estrés, muchas microsporas mueren, lo cual reduce el número de células viables capaces de desencadenar una respuesta embriogénica, lo que limita la eficiencia del proceso.

Para evaluar y comparar el nivel de muerte celular presente en los cultivos antes de aplicar el estrés inductor y después del estrés tras 6 días de cultivo (en la fase de proembrión), se realizó una tinción de los cultivos con azul de Evans. A continuación, se montaron las preparaciones y, utilizando el campo claro de un microscopio óptico, se llevó a cabo un recuento de las células vivas (sin teñir) y muertas (teñidas de azul) de cada una de las muestras.

Los resultados mostraron un aumento significativo del porcentaje de muerte celular tras haber aplicado el estrés inductor, en la fase de proembrión (66.45 ± 2.47%) (Fig. 119A, B), en comparación con un porcentaje de muerte menor de las microsporas antes de aplicar el tratamiento de estrés (41,92 ± 1.63%) (Fig. 119A, C).

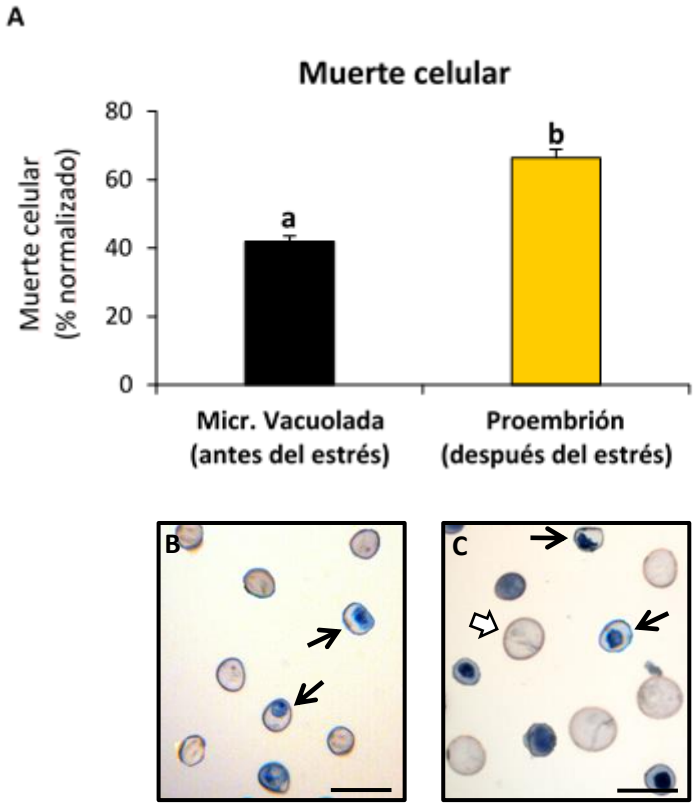


Figura 119. Detección y cuantificación de muerte celular en cultivos de microsporas de *H. vulgare*, utilizando una tinción de azul de Evans. (**A**) Cuantificación del porcentaje de muerte celular. Las barras en las columnas representan el error estándar de la media (*SEM*). Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$. (**B, C**) Detección de muerte celular en los cultivos antes de aplicar el estrés inductor, en microspora vacuolada (**B**) y después de aplicar el estrés, trascurridos 6 días de cultivo, en la fase de proembrión (**C**). Las flechas negras señalan células muertas (teñidas de azul). La flecha blanca señala una estructura de proembrión, formado tras 6 días de cultivo. Barras: 50 µm.

Estos resultados revelan que el estrés inductor aplicado sobre las microsporas para que tenga lugar su reprogramación hacia una ruta embriogénica produce una elevada tasa de muerte celular al inicio del cultivo, lo cual limita la eficiencia de la embriogénesis.

4.6.2 Efectos del tratamiento con inhibidores de ROS, autofagia y proteasas sobre la muerte celular inducida por estrés durante la embriogénesis de microsporas de *H. vulgare*

Estudios previos del grupo han demostrado que el tratamiento de estrés inductor produce estrés oxidativo (ROS) y activa la autofagia y la actividad de proteasas en la embriogénesis de microsporas de *Hordeum vulgare* y *Brassica napus* (Bárány *et al*., 2018; Berenguer, 2020).

Con el fin de evaluar el grado de implicación de la autofagia y de la actividad proteasa en el proceso de muerte celular inducido por el tratamiento de estrés *in vitro* en la embriogénesis de microsporas de *Hordeum vulgare*, se procedió a analizar el efecto de pequeños compuestos bioactivos inhibidores de autofagia y proteasas, sobre los niveles de muerte celular al inicio de la embriogénesis de microsporas de *H. vulgare*.

Para este ensayo se seleccionaron distintos inhibidores de especies reactivas del oxígeno (ROS), autofagia y proteasas (Tabla 21): $MnCl_2$ (inhibidor de ROS), ConcA (inhibidor de autofagia), E-64d (inhibidor de cisteín proteasas), leupeptina (inhibidor de serín y cisteín proteasas) y Ac-DEVD-CHO (N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-al) (inhibidor de caspasa 3).

Tabla 21. Inhibidores de ROS, autofagia y proteasas utilizados como tratamientos en cultivo *in vitro* de microsporas aisladas de *Hordeum vulgare*.

Inhibidor	Diana	Efecto
$MnCl_2$	ROS	Elimina aniones superóxido
Concanamicina A	Bomba de protones vacuolar	Aumenta el pH de la vacuola e inactiva sus enzimas líticas
E-64d	Cisteín proteasas	Inhibe la degradación del contenido de los autofagosomas
Leupeptina	Serín y cisteín proteasas	Inhibe la degradación de autofagosomas
Ac-DEVD-CHO (N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-al)	Caspasa 3	Inhibe la actividad de la Caspasa 3

Se procedió a evaluar el nivel de muerte celular en cultivos de microsporas de *H. vulgare* control (sin tratar) y tratados con los distintos inhibidores. Para ello, se realizó una tinción con azul Evans y se procedió a hacer un recuento de las células vivas (sin teñir) y muertas (teñidas de azul) después del estrés, en la fase de proembrión (Fig. 120A) en cultivos control y tratados con los distintos inhibidores.

Los resultados del recuento mostraron una reducción significativa de los niveles de muerte celular en los cultivos tratados, con respecto a los cultivos control (Fig. 120B-F), con todos los inhibidores testados.

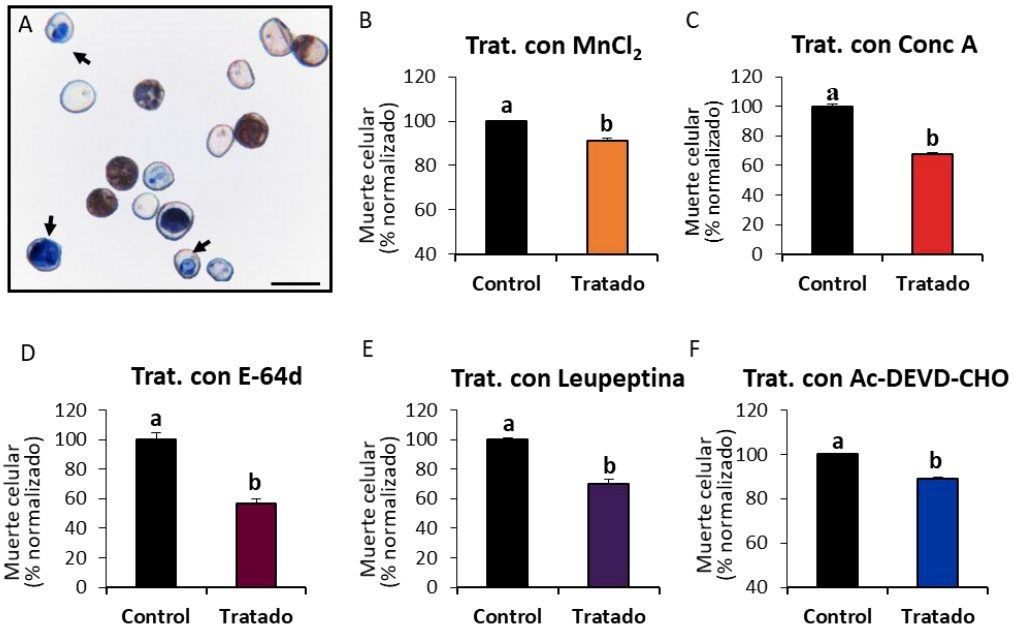


Figura 120. Efecto del tratamiento con $MnCl_2$ (inhibidor de ROS), concanamicina A (inhibidor de autofagia), E-64d (inhibidor de cisteín proteasas), leupeptina (inhibidor de serín y cisteín proteasas) y Ac-DEVD-CHO (N-Acetyl-Asp-Glu- Val-Asp-al) (inhibidor de caspasa-3) sobre la muerte celular inducida por estrés durante la embriogénesis de microsporas de *H. vulgare*. (**B, C, D, E, F**) Cuantificación del porcentaje de muerte celular mediante tinción con azul de Evans de cultivos control (sin tratar) y tratados con los distintos inhibidores, después del estrés (a los 6 días de cultivo, en la fase de proembrión). Los histogramas muestran el porcentaje (cambio porcentual) de muerte celular, referido al porcentaje promedio de células muertas en cultivos sin tratar (al que se le ha otorgado un valor promedio normalizado del 100%). Las barras representan el error estándar de la media (*SEM*). Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$. (**A**) Imagen panorámica de un cultivo de 6 días teñido con azul Evans, donde se distinguen estructuras vivas (sin teñir) y estructuras muertas (teñidas). Las flechas en (**A**) señalan estructuras muertas. Barra (A): 50 µm.

La reducción del porcentaje de muerte celular tras el estrés inductor al añadir cualquiera de los inhibidores seleccionados, sugiere la implicación de las ROS, de la autofagia y de proteasas (principalmente cisteín proteasas), en el proceso de muerte celular que tiene lugar al inicio de la embriogénesis de microsporas de *H. vulgare* como consecuencia de la aplicación del estrés inductor.

4.6.3 Efectos del tratamiento con inhibidores de ROS, autofagia y proteasas sobre el inicio de la embriogénesis de microsporas de *H. vulgare*

También se evaluó el efecto de esos mismos inhibidores ($MnCl_2$, ConcA, E-64d, leupeptina y Ac-DEVD-CHO) sobre los niveles de inducción embriogénica al inicio de la embriogénesis de microsporas de *H. vulgare*. Para ello, se cuantificó el número de proembriones formados en las placas control (sin tratamiento) y tratadas con los distintos inhibidores, tras 6 días de cultivo. A los cuatro días, en las placas de cultivo se pueden distinguir dos tipos de estructura: microsporas vacuoladas, que no han sido reprogramadas con el tratamiento de estrés; y proembriones, estructuras multicelulares en constante proliferación, formados a partir de microsporas vacuoladas que han sido reprogramadas hacia una ruta embriogénica tras aplicar el estrés inductor. Las estructuras de proembrión son consideradas el primer signo morfológico del inicio de la embriogénesis, y se distinguen fácilmente de las microsporas vacuoladas no reprogramadas por su mayor tamaño y un citoplasma más denso (Fig. 121A).

Los resultados del ensayo mostraron un aumento significativo del número de proembriones en los cultivos tratados con cualquiera de los inhibidores, con respecto a los cultivos control (Fig. 121B-F).

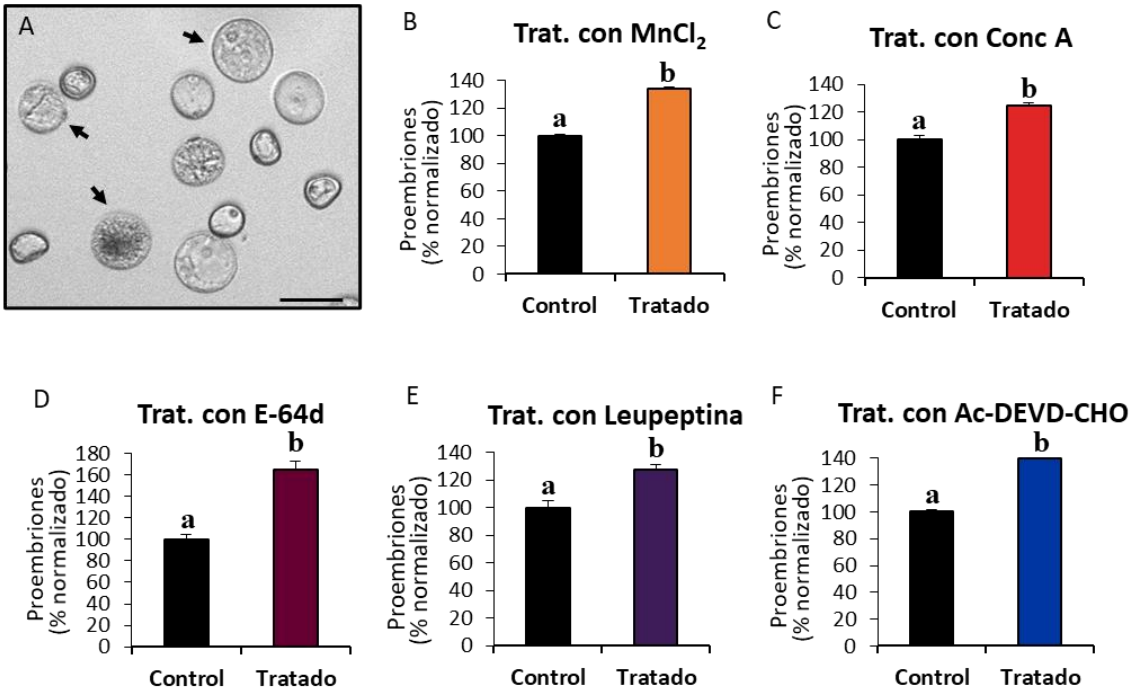


Figura 121. Efecto del tratamiento con $MnCl_2$ (inhibidor de ROS), concanamicina A (inhbidor de autofagia), E-64d (inhbidor de cisteín proteasas), leupeptina (inhbidor de serín y cisteín proteasas) y Ac-DEVD-CHO (N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-al) (inhibidor de caspasa-3) sobre el inicio de la embriogénesis de microsporas de *H. vulgare*. (**B, C, D, E, F**) Cuantificación del porcentaje de proembriones formados tras el estrés inductor en cultivos control (sin tratar) y tratados con los distintos inhibidores, a los 6 días de cultivo. Los histogramas muestran el porcentaje (cambio porcentual) de proembriones, referido al porcentaje promedio de células inducidas en cultivos sin tratar (al que se le ha otorgado un valor promedio normalizado del 100%). Las barras representan el error estándar de la media (*SEM*). Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$. (**A**) Imagen panorámica de un cultivo de 6 días, donde se distinguen microsporas vacuoladas no reprogramadas y proembriones. Las flechas en (**A**) señalan las estructuras de proembrión. Barra (A): 50 µm.

Los resultados obtenidos de estos ensayos funcionales *in vitro* sugieren que tanto las ROS, como la autofagia y distintas proteasas, específicamente cisteín proteasas, participan en el proceso de muerte celular que tiene lugar tras aplicar el estrés inductor de la embriogénesis, y que su inhibición reduce la muerte celular y aumenta la eficiencia del proceso al inicio del cultivo de microsporas aisladas de *H. vulgare*, aumentando el porcentaje de inducción embriogénica.

4.7 AUTOFAGIA Y PROTEASAS DURANTE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA (MCP) DEL TAPETUM DE *H. VULGARE*

4.7.1 Caracterización celular de la MCP del tapetum durante el desarrollo del polen de *H. vulgare*

La antera está formada por distintos tejidos, nombrados desde el exterior hacia el interior encontramos: el exotecio o epidermis, el endotecio, la lámina media y el tapetum, siendo este último el tejido más cercano al lóculo de la antera, en cuyo interior se encuentran las microsporas y los granos de polen en desarrollo (Fig. 122A). Como ya se ha descrito anteriormente, el tapetum es un importante tejido nutricional con un papel crucial en la formación del grano de polen. A lo largo de este proceso, las células del tapetum van degenerando, y lo hacen mediante un proceso de muerte celular programada (MCP) que se inicia, generalmente, en la etapa de microspora vacuolada.

Con el objetivo de caracterizar la MCP de las células del tapetum en anteras de *Hordeum vulgare*, se seleccionaron tres etapas principales a lo largo del desarrollo del polen: una etapa inicial de tapetum activo (Fig. 122B), una etapa intermedia de tapetum en MCP temprana, donde ya ha comenzado el proceso de degradación (Fig. 122C) y una etapa de tapetum en MCP avanzada (Fig. 122D).

En la etapa de tapetum activo, momento de mayor actividad del tejido, se observan células de gran tamaño, con forma poligonal, binucleadas (núcleos grandes y redondeados) y con un citoplasma denso (Fig. 122B). Además, la inmunofluorescencia con anti-RNA en esta fase de tapetum activo, muestra una señal muy intensa en el citoplasma de las células tapetales, lo que indica que se trata de células transcripcionalmente muy activas (Fig. 123A-A´´). En la siguiente etapa, en el tapetum en MCP temprana, ya pueden observarse los primeros signos de muerte celular. En esta etapa, las células tapetales pierden su forma geométrica, y sus núcleos, de menor tamaño, adquieren una forma alargada y presentan una cromatina muy condensada (Fig. 122C). La inmunofluorescencia con anti-RNA en esta etapa muestra una señal muy débil, apenas apreciable en el citoplasma, indicativo de una actividad transcripcional muy baja donde los ribosomas y transcritos se han degradado (Fig. 123B-B´´). En esta etapa se observó una señal autofluorescente inespecífica en la pared del tapetum que

mira al interior del saco polínico y en la exina de las microsporas, la cual también apareció en los experimentos de control negativo de esta fase (Fig. 124B). La última fase, la fase de tapetum en MCP avanzada, coincide con la maduración del grano de polen, momento en el que ya no es necesaria la actividad de este tejido nutricio y, por tanto, aparece prácticamente degradado por completo. La tinción con azul de toluidina en esta fase muestra sólo una fina capa con restos de las células tapetales (Fig. 122D) y, en la inmunofluroescencia con anti-RNA, no se aprecia señal de fluorescencia (Fig. 123C-C´´).

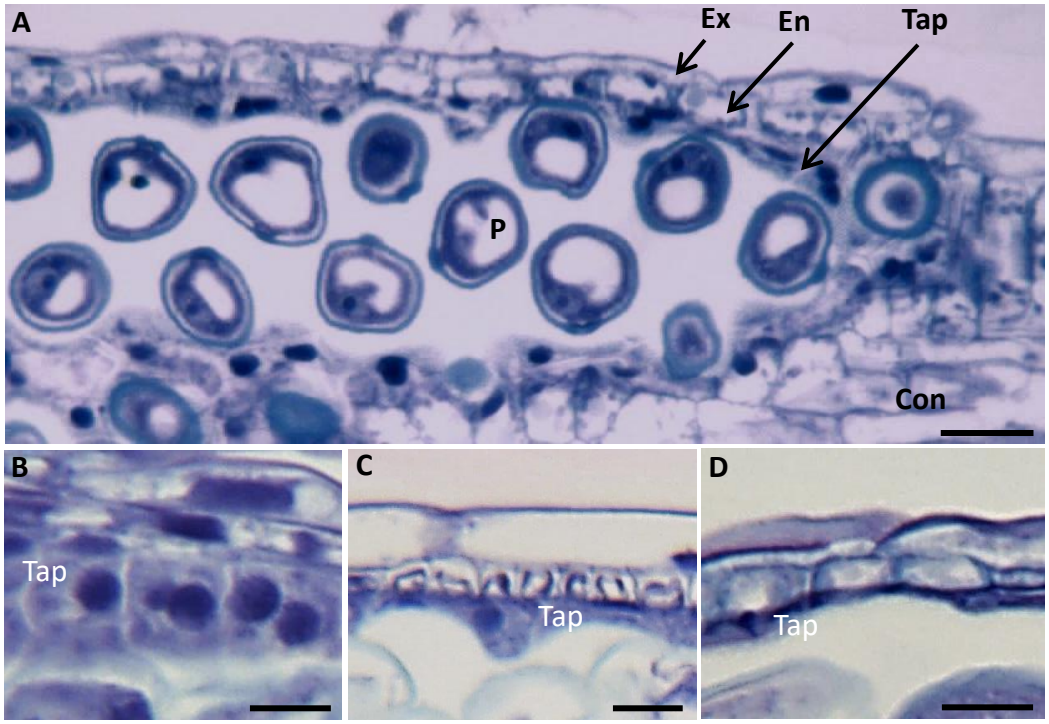


Figura 122. Proceso de muerte celular programada (MCP) del tapetum de *Hordeum vulgare*. Cortes semifinos teñidos con azul de toluidina y fotografiados con microscopía óptica de campo claro. **(A)** Imagen panorámica de un corte longitudinal de una antera de *Hordeum vulgare*, donde se señalan las principales capas celulares de la misma. **(B-D)** Imagen ampliada de una antera en distintos estadios del desarrollo: **(B)** antera con tapetum activo, **(C)** antera con tapetum en MCP temprana, **(D)** antera con tapetum en MCP avanzada. Ex: Exotecio o epidermis; En= Endotecio; P= polen; Tap= tapetum; Con= tejido conectivo. Barras: 10 µm.

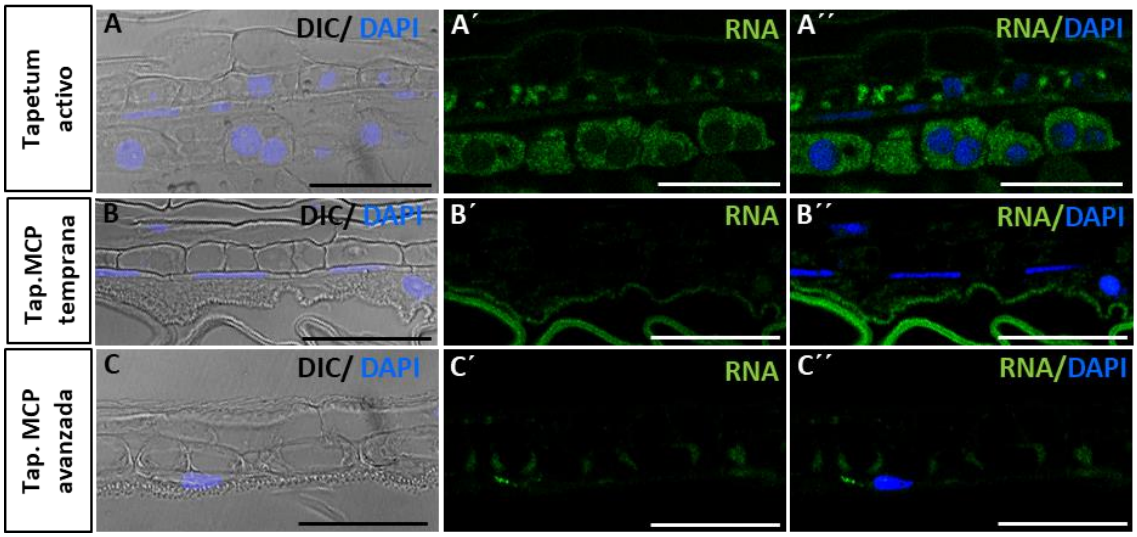


Figura 123. Inmunolocalización de las proteínas ATG5 y ATG8 durante el proceso de muerte celular programada (MCP) del tapetum de *Hordeum vulgare.* Las imágenes de microscopía confocal muestran la señal de fluorescencia del RNA (verde), la tinción de núcleos con DAPI (azul) y el DIC (contraste de interferencia diferencial). **(A-A´´, C-C´´)** Anteras en fase de tapetum activo. **(B-B´´, D-D´´)** Anteras en fase de tapetum en MCP temprana. **(A-A´´, B-B´´)** Inmunofluorescencia de la proteína ATG5. **(C-C´´, D-D´´)** Inmunofluorescencia de la proteína ATG8. Barras: 10 µm.

Los controles negativos de la inmunofluorescencia en cada una de las fases (tapetum activo, tapetum en MCP temprana y tapetum en MCP avanzada), eliminando el anticuerpo primario del experimento, no mostraron señales específicas de RNA. En la fase de tapetum activo (Fig. 124A) y tapetum en MCP temprana (Fig. 124C) no se observó ninguna fluorescencia, mientras que en la fase de tapetum en MCP temprana (Fig. 124B) pudo observarse autofluorescencia inespecífica en la exina de las microsporas y la pared del tapetum que mira al interior del saco polínico. En esta fase tiene lugar una secreción muy activa de componentes de la esporopolenina desde las células del tapetum hacia las microsporas para formar la exina, componentes que pueden ser la fuente de la elevada autofluorescencia de las paredes en esta fase.

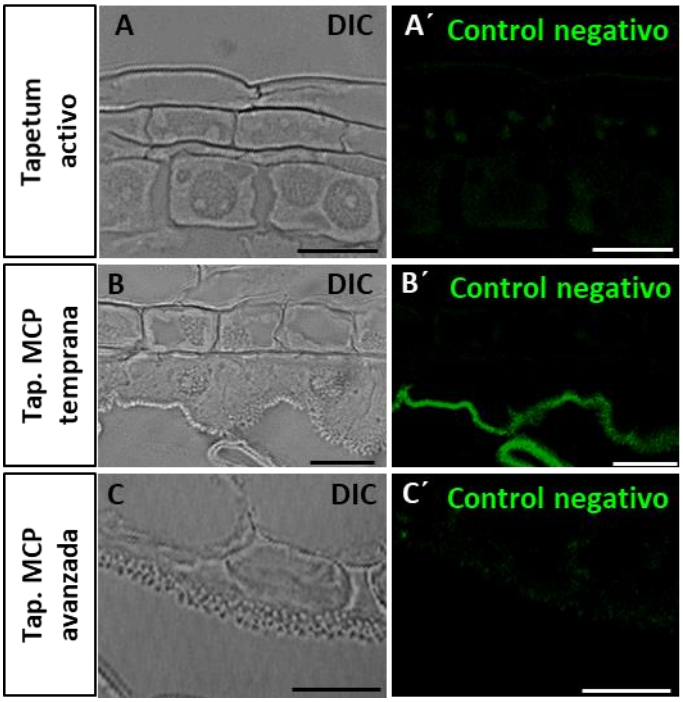


Figura 124. Controles negativos de la inmunofluorescencia eliminando el anticuerpo primario en las distintas fases del proceso de muerte celular programada (MCP) del tapetum de *Hordeum vulgare.* Las imágenes de microscopía confocal muestran la señal de fluorescencia del RNA (verde) y el DIC (contraste de interferencia diferencial). **(A-A´)** Antera en fase de tapetum activo. **(B-B´)** Antera en fase de tapetum en MCP temprana, con autofluorescencia de la pared del tapetum que mira al interior del saco polínico y la exina de las microsporas. **(C-C´)** Antera en fase de tapetum en MCP avanzada. Barras: 10 µm.

Esta caracterización celular, nos permitió seleccionar las fases de tapetum activo y tapetum en MCP temprana (a la se hará referencia desde este momento como "tapetum en MCP") para el desarrollo de experimentos posteriores, ya que en la fase de tapetum en MCP avanzada el tapetum ya es prácticamente inexistente.

4.7.2 Localización subcelular y expresión de genes de autofagia durante la MCP del tapetum de *H. vulgare*

La autofagia es un mecanismo de catabolismo intracelular que participa en múltiples procesos biológicos y, entre ellos, en el inicio de la muerte celular. En este estudio se procedió a evaluar la posible implicación de la autofagia en el proceso de MCP del tapetum de *H. vulgare*.

Patrones de localización subcelular de ATG5 y ATG8 durante la MCP del tapetum

Con la finalidad de analizar la localización proteínas de autofagia a nivel subcelular durante el proceso de MCP del tapetum de *H. vulgare*, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos de dos proteínas de ATG (*Autophagy-related genes*) que juegan un papel clave en el proceso de autofagia: ATG5 y ATG8. Los ensayos se llevaron a cabo en las fases de tapetum activo y tapetum en MCP.

Los resultados no mostraron señal de fluorescencia en la etapa de tapetum activo para ninguno de los anticuerpos (Fig. 125A-A´´, C-C´´). Sin embargo, en la fase de tapetum en MCP pudieron observarse spots citoplásmicos con una intensa señal fluorescente para ambos anticuerpos, cuyo tamaño y localización es compatible con estructuras autofágicas (Fig. 125B-B´´, D-D´´). En la fase de tapetum en MCP, la pared de las células tapetales que mira al interior del saco polínico y la exina de las microsporas mostraron autofluorescencia inespecífica en varias imágenes, señal observada también en los controles negativos de esta fase (Fig. 124B).

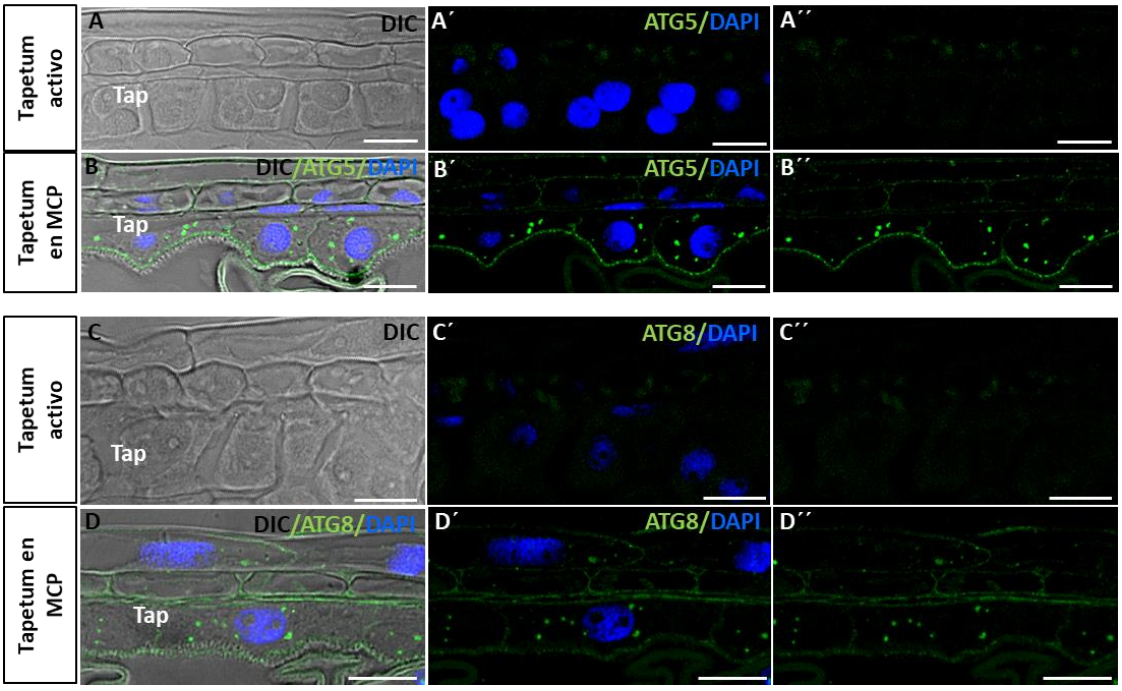


Figura 125. Inmunolocalización de las proteínas ATG5 y ATG8 durante el proceso de muerte celular programada (MCP) del tapetum de *Hordeum vulgare*. Las imágenes de microscopía confocal muestran la señal de fluorescencia del RNA (verde), la tinción de núcleos con DAPI (azul) y el DIC (contraste de interferencia diferencial). **(A-A´´, C-C´´)** Anteras en fase de tapetum activo. **(B-B´´, D-D´´)** Anteras en fase de tapetum en MCP temprana. **(A-A´´, B-B´´)** Inmunofluorescencia de la proteína ATG5. **(C-C´´, D-D´´)** Inmunofluorescencia de la proteína ATG8. Barras: 10 µm.

Expresión de los genes de *HvATG5* y *HvATG8* durante el proceso de MCP del tapetum de *H. vulgare*

Asimismo, se llevaron a cabo análisis de expresión génica de los genes de autofagia *HvATG5* y *HvATG8_1* en las etapas seleccionadas anteriormente: tapetum activo y tapetum en MCP.

Los resultados obtenidos mostraron un patrón similar para ambos genes, observándose un aumento significativo de la expresión de *HvATG5* (Fig. 126A) y *HvATG8_1* (Fig. 126B) en la fase de tapetum en MCP, en comparación con los niveles de expresión más bajos obtenidos en la fase de tapetum activo.

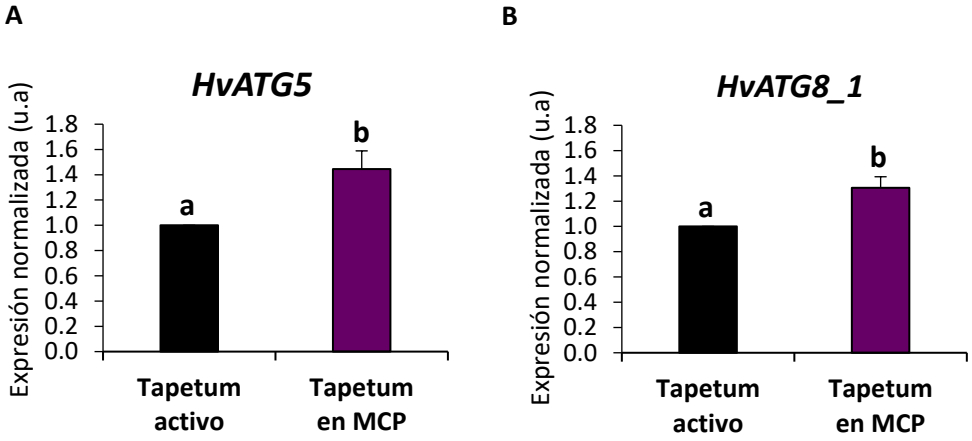


Figura 126. Patrones de expresión génica por qRT-PCR de los genes de autofagia *HvATG5* y *HvATG8_1* durante el proceso de muerte celular programada (MCP) del tapetum de *Hordeum vulgare.* **(A)** Patrón de expresión temporal del gen *HvATG5*. **(B)** Patrón de expresión temporal del gen *HvATG8_1*. Los histogramas muestran cambios en los niveles de mRNA mediante qRT-PCR en las etapas de tapetum activo y tapetum en MCP. Cada columna representa el valor promedio de al menos tres muestras biológicas diferentes y tres réplicas técnicas. Los niveles de transcripción fueron normalizados utilizando los valores del gen endógeno de referencia *HvCiclofilina*. Los datos muestran los niveles de expresión (en unidades arbitrarias: u.a) normalizados a la etapa de tapetum activo. Las barras representan el error estándar de la media (*SEM*). Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$.

Estos resultados indican que existe una activación de la maquinaria autofágica tanto a nivel transcripcional (observado con la expresión génica de *HvATG5* y *HvATG8_1*) como a nivel proteico (detectado mediante inmunofluorescencia con los anticuerpos anti-ATG5 y anti-ATG8), en el momento en que el tapetum entra en el proceso de MCP.

4.7.3 Dinámica e identificación de PLCPs activas durante la MCP del tapetum de *H. vulgare*

Los eventos de muerte celular programada se llevan a cabo mediante una compleja ruta molecular mediada por proteasas específicas, entre las que destacan las cisteín proteasas de tipo papaína (PLCPs, *Papain-like Cysteine Proteases*) o catepsinas, por su gran abundancia y su elevada actividad enzimática. En cebada se han descrito 41 genes codificantes para PLCPs (Díaz-Mendoza *et al*., 2014), entre los que desatacan *HvPap1*, *HvPap6, HvPap12 y HvPap19*.

Con el objetivo de estudiar la posible implicación de las PLCPs en el proceso de MCP del tapetum de *H. vulgare*, se llevó a cabo un estudio de detección, identificación, análisis de expresión génica, inmunodetección e inmunolocalización de algunas de las cisteín proteasas más relevantes.

Parte de los ensayos de este estudio se realizaron durante una estancia de 4 semanas en el *Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR1318 INRA-AgroParisTech*, en Versalles (Francia), en el grupo de "Senescencia, autofagia, reciclaje de nutrientes y eficiencia en el uso de nitrógeno" dirigido por la Dra. Celine Masclaux-Daubresse.

4.7.3.a Detección de PLCPs activas durante la MCP del tapetum de *H. vulgare*

Se llevó a cabo un ensayo de detección de PLCPs activas utilizando la técnica ABPP (*activity based protein profiling*), basado en la unión específica del compuesto DCG-04 (biotinilado) a cisteín proteasas activas presentes en muestras de tapetum activo y tapetum en MCP.

En primer lugar, se procedió a la extracción y cuantificación de proteínas solubles de las muestras y, a continuación, se trataron con DCG-04, un compuesto con una unión de alta afinidad a la forma activa de las proteasas de cisteína y al que se había incorporado un residuo de lisina biotinilada. Seguidamente, se procedió a separar las proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS) y, más tarde, se transfirieron desde el gel a una membrana de PVP utilizando la técnica de *electroblotting*. Una vez transferidas las proteínas a la membrana, se llevó a cabo el ensayo de inmunodetección incubando la membrana con estreptavidina-HRP

y revelándola finalmente con luminol y H_2O_2 para detectar la señal quimioluminiscente de las PLCPs activas.

Los resultados obtenidos del ensayo mostraron una mayor acumulación de PLCPs activas en la muestra de tapetum en MCP, en comparación con la etapa de tapetum activo (Fig. 127), detectándose las formas activas en un rango de peso molecular entre los 20 y los 40 KDa.

Posteriormente, se procedió a teñir las membranas con azul de Coomasie como método de control para verificar que el experimento se llevó a cabo con misma cantidad de proteínas de cada muestra.

Paralelamente, con el fin de demostrar la especificidad del compuesto DCG-04 por las PLCPs activas, se llevaron a cabo ensayos de competencia con controles negativos y positivos del experimento. En este ensayo se utilizó una mezcla equitativa de los extractos proteicos de tapetum activo y tapetum en MCP, la cual se incubó de distintas formas: 1) Incubación de la muestra con DCG-04; 2) Pretratamiento de la muestra con el inhibidor de cisteín proteasas E-64d y posterior incubación con DCG-04; 3) Se sustituyó la incubación con DCG-04 por su disolvente (DMSO).

Los resultados obtenidos al revelar la quimioluminiscencia del ensayo de competencia solamente mostraron señal en el caso de incubar la muestra con DCG-04 y DMSO (Fig. 127). Como cabría esperar, el pretratamiento de la muestra con el inhibidor E-64d bloqueó cualquier sitio de unión de las PLCPs al que pudiera unirse DCG-04 y, por tanto, no se observó señal quimioluminiscente tras el revelado del ensayo de inmunodetección, al igual que en el control negativo con DMSO. Las tres pruebas del ensayo de competencia demostraron la epecificidad del ensayo llevado a cabo con DCG-04.

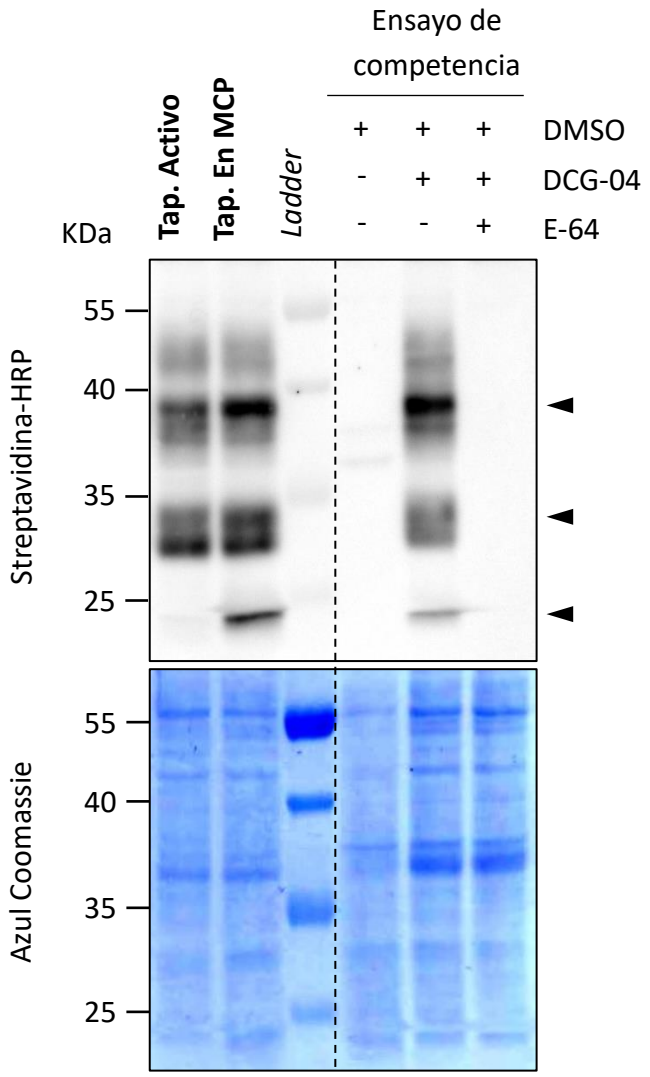


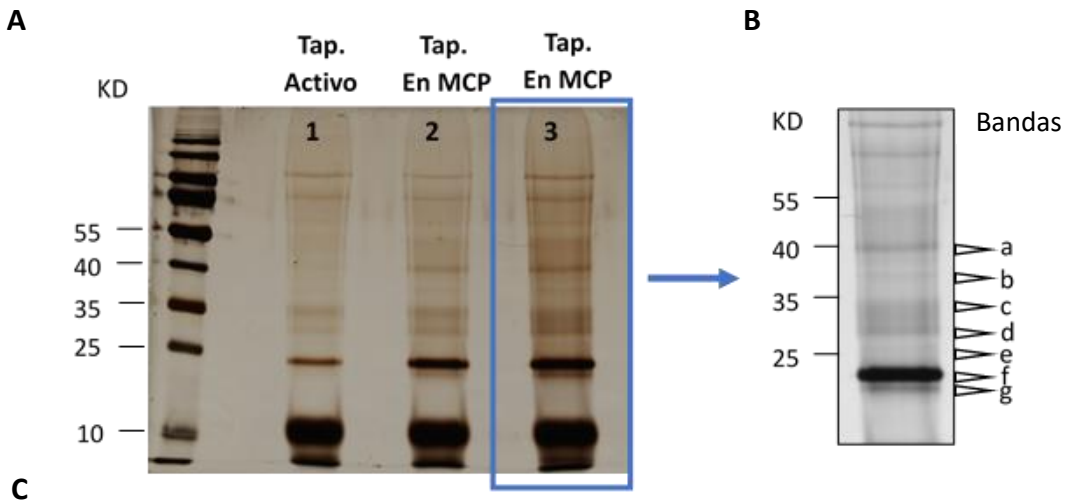
Figura 127. Detección de PLCPs activas durante el proceso de muerte celular programada (MCP) del tapetum de *Hordeum vulgare.* Para detectar PLCPs activas, se procedió a incubar el extracto de proteínas solubles de cada muestra (tapetum activo y tapetum en MCP) con el compuesto DCG-04 biotinilado, el cual se une con alta afinidad a las PLCPs. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS) y a continuación se realizó un ensayo de *western-blot* donde se incubó la membrana con estreptavidina-HRP para detectar las proteínas biotiniladas mediante quimioluminiscencia. Tras adquirir las imágenes de la inmunodetección, se tiñeron las membranas con azul de Coomasie, como control para verificar que el experimento se llevó a cabo con misma cantidad de proteínas de cada muestra. Con el fin de demostrar la especificidad del DCG-04 por las PLCPs activas, se llevó a cabo un ensayo de competencia, que consistió en incubar las muestras con DCG-04; pretratar las muestras con el inhibidor E-64d y posteriormente incubarlas con DCG-04; o sustituir la incubación con DCG-04 por su disolvente (DMSO), como control negativo del experimento. Las flechas negras señalan las bandas donde se detectó un patrón de acumulación distinto entre las fases de estudio. Los pesos moleculares (en kDa) se indican en el lado izquierdo de la imagen.

4.7.3.b Identificación de PLCPs activas presentes en el tapetum en MCP

Con la finalidad de identificar las PLCPs activas presentes en el tapetum en MCP, se procedió a aislar y purificar estas proteasas mediante un ensayo de inmunoprecipitación por afinidad o *pull-down*. El ensayo consistió en incubar el extracto protéico con el compuesto DCG-04 ligado a biotina, utilizado anteriormente en los ensayos de detección de PLCPs activas. Las proteínas de interés, en este momento biotiniladas, se aislaron por afinidad con perlas de avidina. A continuación, se separaron las proteínas por PAGE-SDS y se realizó una tinción del gel con nitrato de plata (Fig. 128A). En este gel se cargaron tres tipos de muestra: en el carril 1 y 2 se cargó la misma cantidad de muestra de las fases de tapetum activo y tapetum en MCP, respectivamente; y en el carril 3 se cargó una mayor cantidad de muestra de la fase de tapetum en MCP, con la finalidad de obtener una mayor cantidad de proteínas en las bandas para el posterior análisis proteómico de las mismas (Fig. 128A).

Tras digitalizar el gel con la tinción de nitrato de plata, se pudo observar una mayor acumulación de PLCPs activas en el tapetum en MCP (carril 2) en comparación con la menor intensidad de las bandas observada en la muestra de tapetum activo (carril 1), teniendo ambas la misma carga del extracto (Fig. 128A), tal y como se observó anteriormente en el experimento de detección de PLCPs activas mediante ABPP con DCG-04 (Fig. 127).

A continuación, partiendo de la muestra de tapetum en MCP del carril 3 del gel (con mayor cantidad de extracto de proteínas), se seleccionaron un total de 7 bandas situadas en la franja de los 20-40 KDa de peso molecular (Fig. 128B), las cuales se corresponden con las bandas de PLCPs activas observadas en el ensayo de *western blot* para la actividad ABPP con DCG-04. Estas bandas fueron recortadas del gel y almacenadas individualmente en tubos que se enviaron a analizar a la plataforma PAPSO (Plate-forme d'Analyse Protéomique Paris Sud-Ouest. Génétique Quantitative et Évolution - Le Moulon INRA - Université Paris-Sud - CNRS – AgroParisTech Ferme du Moulon. 91190 Gif sur Yvette. http://pappso.inra.fr/), para los posteriores análisis proteómicos.



C

Accesión (Uniprot) *H. vulgare*	Nombre del gen *H. vulgare*	Homólogo *Arabidopsis*		Recuento de espectros en cada banda							
		Accesión	% Identidad	a	b	c	d	e	f	g	Total
A0A287JPX0		RD21B	68.94	12	19	12	3		6		52
B4ESE8	**pap-6**	RD21A	68.00	23	14	12	6	5	5		65
A0A287GJX7	_	CEP1	45.74	8	14	14	17	21	28	49	151
F2EEU8	_	SAG12	44.00		4	4	4	3	87	23	125
B4ESF2	**pap-14**	CEP1	64.54		3		9	15			27
A0A287WKC6		RD21B	57.08		3						3
Q7PCC5	**sf42/pap-1**	RD19A	70.89			16	8				24
B4ESE9	**pap-7**	RD21A	58.09	12		12	3		6		33
B4ESE4	**pap-2**	RD19A	64.05			7	21	5	10		43
B4ESE6	**pap-4**	XCP1	68.95			2	9				11
B4ESE7	**pap-5**	XCP1	68.08			2					2
A0A287JHQ6		RD21A	66.57				6				6
P05167	**pap-12**	AALP	69.27				5				5
Q93X53	**pCYSPROT**	RD21B	76.64				3				3
B4ESG0	pap-25 (Fragmento)	RD21B/CEP 1	51.09						1		1
A0A287I9K5	_	RD19A	61.61						10		10
F2EC73	_	SAG12	42.69						7		7
B7X948	**HvCP3-31**	RD21A	67.04						5		5

Figura 128. Identificación de PLCPs activas durante el proceso de muerte celular programada (MCP) del tapetum de *Hordeum vulgare*. En primer lugar, se incubó el extracto de proteínas solubles de cada muestra (tapetum activo y tapetum en MCP) con el compuesto DCG-04 biotinilado. A continuación, se separaron las proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS), y se realizó una tinción con nitrato de plata. (**A**) Gel teñido con nitrato de plata donde se muestran los perfiles de las proteínas marcadas con DCG04 purificadas con avidina; los carriles 1 y 2 contienen la misma cantidad de muestra, pudiendo observarse mayor intensidad de las bandas en la fase de tapetum en MCP; en el carril 3 se cargó mayor cantidad de muestra de la etapa de tapetum en MCP para posteriormente llevar a cabo el análisis proteómico. (**B**) Carril 3 del gel de electroforesis (tapetum en MCP con mayor cantidad de muestra) del que se seleccionaron un total de 7 bandas correspondientes a proteínas localizadas entre los 20-40 kDa, estas bandas fueron recortadas y extraídas del gel para su posterior análisis por LC-MS/MS. La localización de las bandas analizadas se indica con letras a la derecha del gel (a-g). (**C**) Los espectros obtenidos por LC-MS/MS se compararon con la información contenida en la base de datos de *Hordeum vulgare* UniProt, utilizando el programa X!Tandem. Las secuencias de proteínas se cotejaron con secuencias de proteínas de *Arabidopsis thaliana*, utilizando el programa NCBI Blast Protein Database. En la tabla se muestran los resultados más relevantes, indicándose el porcentaje de homología de la secuencia de aminoácidos, el recuento de espectros de las PLCPs identificadas dentro de cada una de las bandas, así como la suma de los mismos en el total de las siete bandas analizadas.

En la plataforma PAPSO las bandas fueron digeridas y analizadas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS). Los espectros de fragmentación obtenidos de cada muestra mediante esta técnica se compararon con la información contenida en la base de datos de *Hordeum vulgare* UniProt, utilizando el programa X!Tandem. A continuación, las secuencias de proteínas de *H. vulgare* se cotejaron con secuencias de *Arabidopsis thaliana*, utilizando el programa NCBI Blast Protein Database. En base a toda esta información, se elaboró una tabla con los datos más relevantes del análisis proteómico (Fig. 128C), donde se indica de izquierda a derecha: el número de accesión de la base de datos UniProt en *H. vulgare*; el nombre del gen al que corresponde la secuencia en *H. vulgare* (cuando está identificado); la accesión y el porcentaje de homología de la secuencia de aminoácidos de *H. vulgare* con *A. thaliana*; el número de fragmentos de cada PLCP detectados en el espectro de cada una de las bandas; y, por último, la suma de estos espectros en el total de las siete bandas analizadas.

El análisis proteómico de las bandas extraídas del gel permitió la identificación de varias PLCPs activas presentes en el tapetum en MCP. Dentro de la lista de PLCPs activas identificadas cabe destacar las siguientes proteasas, homólogas de las mismas proteasas en *Arabidopsis*: RD21A/ RD21B (Hvpap-6), SAG12 y RD19A (Hvpap-1), todas ellas implicadas en senescencia en *Arabidopsis*, y la proteína RD19A implicada además en la germinación de semillas de *Hordeum vulgare*.

La identificación de PLCPs activas en el tapetum en MCP, homologas a las proteasas descritas en *Arabidopsis*, sugiere firmemente la participación de estas proteasas durante el proceso de MCP del tapetum de *H. vulgare*.

4.7.3.c Expresión génica de las PLCPs *HvPap-1*, *HvPap-6* and *HvPap-19* durante la MCP del tapetum de *H. vulgare*

Se llevó a cabo el análisis de expresión génica por qRT-PCR de tres genes codificantes para PLCPs, los cuales destacan entre otras cisteín proteasas por su alta actividad proteolítica en numerosos procesos del desarrollo de cebada (Havé *et al*., 2018): *HvPap-1*, *HvPap-6* y *HvPap-19*. Los oligonucleótidos específicos para estas secuencias fueron proporcionados por la Dra. Isabel Díaz (Centro de Biotecnología y

Genómica de Plantas, UPM-INIA). Los análisis de expresión se realizaron en las mismas fases seleccionadas para experimentos previos: tapetum activo y tapetum en PCD. Los cambios en los niveles de expresión génica se evaluaron en base a la expresión del gen endógeno de referencia *HvCiclofilina*, y fueron normalizados a la etapa de tapetum activo.

Los resultados del análisis mostraron un aumento significativo de la cantidad de transcritos de los genes *HvPap-1* (Fig. 120A), *HvPap-6* (Fig. 120B) y *HvPap-19* (Fig. 120C) en la etapa de tapetum en MCP, en comparación con la etapa de tapetum activo.

Estos resultados indican que junto a la activación de las cisteín proteasas, también tiene lugar una inducción de la expresión génica en las células del tapetum que entran en muerte celular.

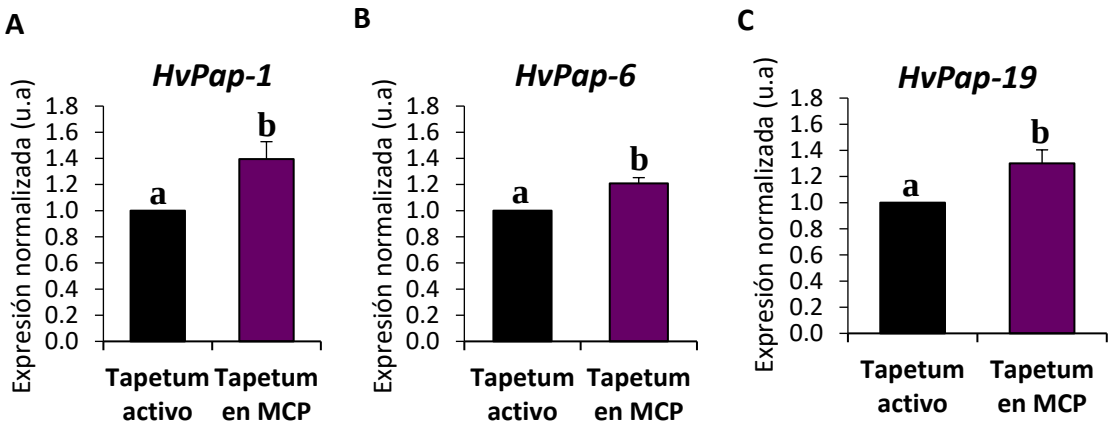


Figura 129. Patrones de expresión génica por qRT-PCR de los genes *HvPap-1*, *HvPap-6* y *HvPap-19* durante el proceso de muerte celular programada (MCP) del tapetum de *Hordeum vulgare.* **(A)** Patrón de expresión temporal del gen *HvPap-1*. **(B)** Patrón de expresión temporal del gen *HvPap-6*. **(C)** Patrón de expresión temporal del gen *HvPap-19.* Los histogramas muestran cambios en los niveles de mRNA mediante qRT-PCR en las etapas de tapetum activo y tapetum en MCP. Cada columna representa el valor promedio de al menos tres muestras biológicas diferentes y tres réplicas técnicas. Los niveles de transcripción fueron normalizados utilizando los valores del gen endógeno de referencia *HvCiclofilina*. Los datos muestran los niveles de expresión (en unidades arbitrarias: u.a) normalizados a la etapa de tapetum activo. Las barras representan el error estándar de la media (*SEM*). Las diferentes letras sobre las columnas indican diferencias significativas tras realizar un análisis estadístico ANOVA y test de Tukey con un valor $p < 0.05$.

4.7.3.d Detección de formas activas e inactivas de varias PLCPs durante la MCP del tapetum de *H. vulgare*

Con el objetivo de detectar y comparar la presencia de formas activas e inactivas de PLCPs en las fases de tapetum activo y tapetum en MCP, se llevaron a cabo ensayos de *western blot* con tres anticuerpos específicos de PLCPs: CATB3/Pap-19, RD21A/Pap-6 y SAG12.

Se seleccionó el anticuerpo CATB3/Pap-19 por reconocer de forma específica la catepsina B3, también identificada como Pap-19 en cebada, de la que previamente se habían obtenido datos de expresión génica (Fig. 129C). También se seleccionó un anticuerpo frente a la proteína RD21A, la cual se corresponde, según los datos previos del análisis proteómico, con la PLCP Pap-6 de cebada (Fig. 128C), de la que también se analizaron los niveles de expresión génica. Por último, se seleccionó un tercer anticuerpo que reconoce la proteasa SAG-12, de la que previamente se habían detectado un elevado número de espectros en el análisis proteómico.

En el ensayo de *western blot*, tras separar las proteínas por PAGE-SDS y transferirlas desde el gel a la membrana, se emplearon anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) que, en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), cataliza la oxidación del luminol presente en el tampón de revelado, produciéndose una emisión de luz proporcional a la cantidad de proteína presente en la membrana.

Dado que los anticuerpos empleados detectan todas las formas de las proteasas (tanto formas activas como inactivas), la señal de quimioluminiscencia obtenida con los distintos anticuerpos reveló la presencia de formas inactivas de mayor peso molecular (flecha negra) tanto en la fase de tapetum activo como en la fase de tapetum en MCP. Sin embargo, si nos fijamos en las formas activas de las proteasas, de menor peso molecular, (flechas rojas) (localizadas entre los 20 y los 40 KDa), vemos que éstas son mucho más abundantes en el tapetum en MCP, mientras que en la muestra de tapetum activo no se aprecia ninguna banda en esa franja de peso molecular (Fig. 130).

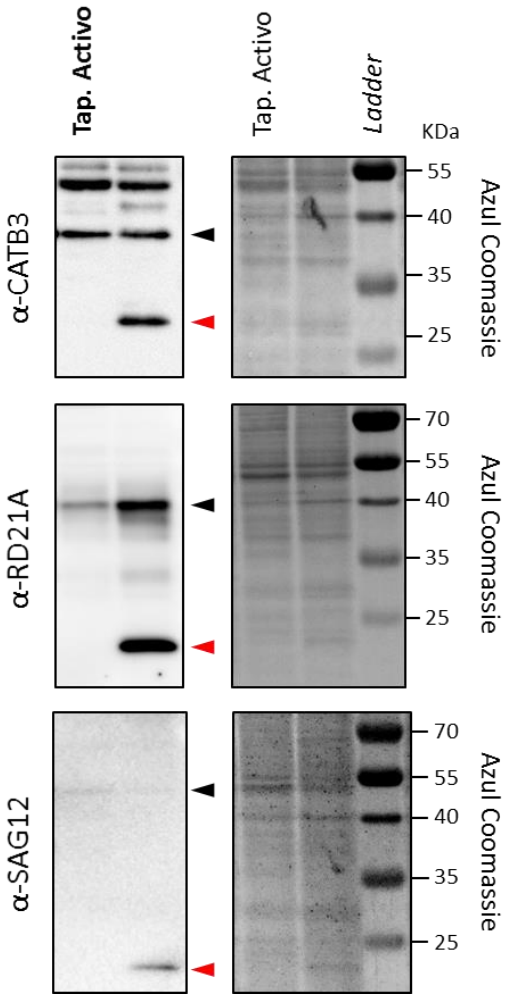


Figura 130. Detección de formas maduras e inmaduras de PLCPs durante el proceso de muerte celular programada (MCP) del tapetum de *Hordeum vulgare*, mediante ensayos de *western-blot* con anticuerpos específicos de CATB3, RD21A y SAG12. Las flechas indican las bandas correspondientes a la forma inactiva (color negro) y la forma activa (color rojo) de cada proteasa. Se cargó la misma cantidad de muestra en cada carril, tal y como muestra la tinción de la membrana con azul Coomasie. Los pesos moleculares (en kDa) se indican en el lado derecho de la imagen.

Los resultados obtenidos con esta técnica revelaron que, antes de que el tapetum entre en muerte celular, en la fase de tapetum activo, solo se detectan formas inactivas de las PLCPs. Sin embargo, en el momento en el que las células tapetales entran en el proceso de MCP, las formas activas de las proteasas son muy abundantes, lo que indica su activación con proceso de MCP del tapetum de *H. vulgare*.

4.7.3.e Patrones de localización subcelular de PLCPs durante la MCP del tapetum de *H. vulgare*

Se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia para analizar el patrón de localización subcelular de determinadas PLCPs en las fases de tapetum activo y tapetum en MCP de *H. vulgare*.

Para este experimento se seleccionaron cuatro anticuerpos específicos de distintas PLCPs, de las que previamente se habían obtenido resultados mediante otras técnicas de análisis. Se analizó la localización con los anticuerpos anti-Pap-1, anti-Pap-6, anti-Pap-19/CATB3 y anti-SAG12.

Los resultados no mostraron señal de fluorescencia en las células tapetales de la etapa de tapetum activo para ninguno de los anticuerpos (Fig. 131A-A´´, C-C´´, E-E´´, G-G´´). Sin embargo, se pudo observar un incremento de la intensidad de la señal de los cuatro anticuerpos en las células del tapetum en fase de MCP, localizada en el citoplasma (Fig. 131B-B´´, D-D´´, F-F´´, H-H´´´). En esta fase, la pared del tapetum que mira al interior del saco polínico y la exina de las microsporas mostraron autofluorescencia inespecífica, señal que también se observó en los experimentos de control negativo de esta fase (Fig. 124B).

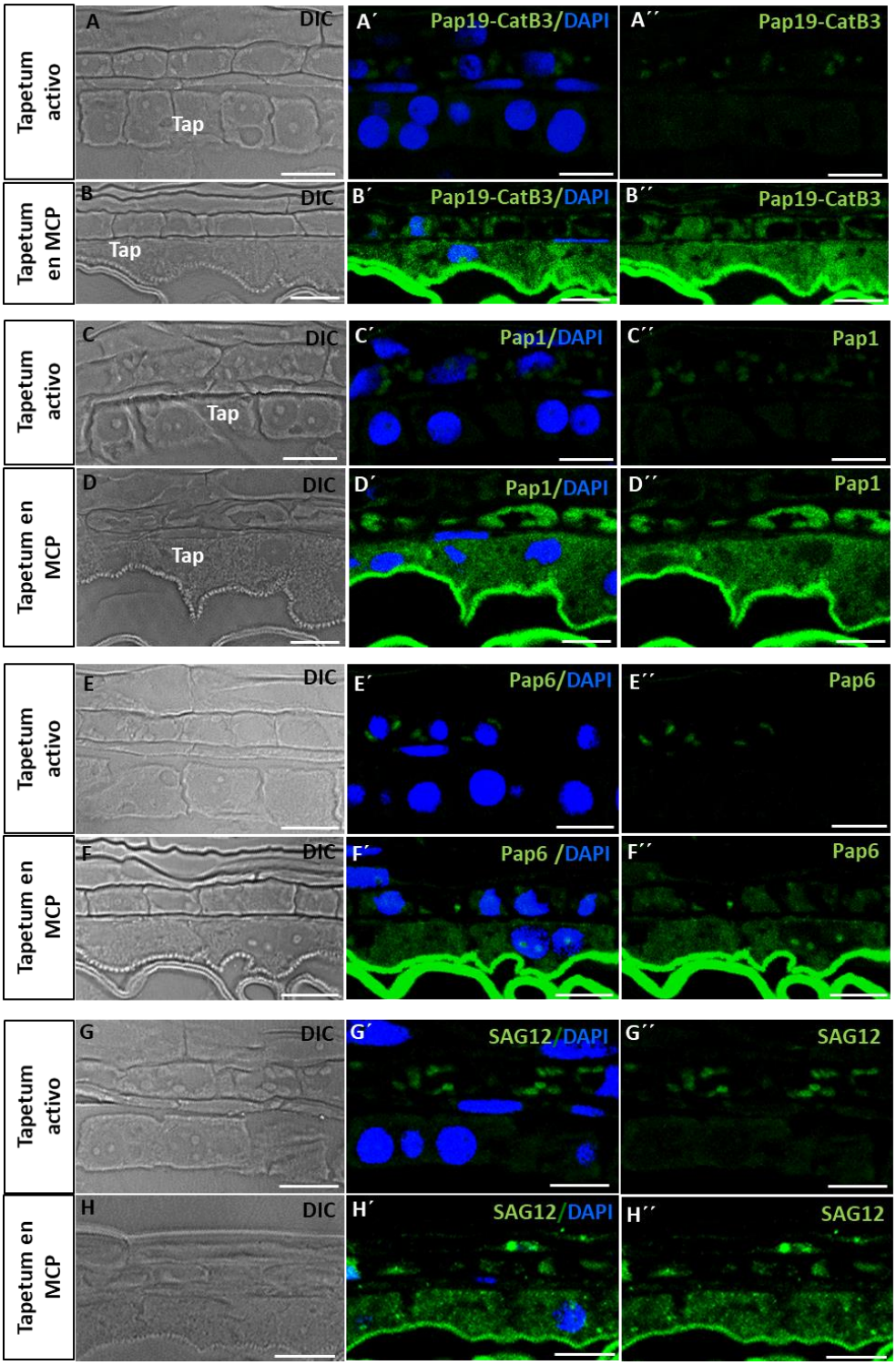


Figura 131. Inmunolocalización de las proteínas Pap19-CATB3, Pap1, Pap6 y SAG12 durante el proceso de muerte celular programada (MCP) del tapetum de *Hordeum vulgare*. Las imágenes de microscopía confocal muestran la señal de fluorescencia del RNA (verde), la tinción de núcleos con DAPI (azul) y el DIC (contraste de interferencia diferencial). **(A-A´´, C-C´´, E-E´´, G-G´´)** Anteras en fase de tapetum activo. **(B-B´´, D-D´´, F-F´´, H-H´´)** Anteras en fase de tapetum en MCP temprana. **(A-A´´, B-B´´)** Inmunofluorescencia de la proteína Pap19-CATB3. **(C-C´´, D-D´´)** Inmunofluorescencia de la proteína Pap1. **(E-E´´, F-F´´)** Inmunofluorescencia de la proteína Pap6. **(G-G´´, H-H´´)** Inmunofluorescencia de la proteína SAG12. Barras: 10 µm.

Los resultados obtenidos con las distintas técnicas experimentales sugieren la activación y participación de cisteín proteasas de tipo papaína (PLCPs) durante la muerte celular programada del tapetum de *Hordeum vulgare*.

DISCUSIÓN

5.1 PAPEL DE LA AUXINA ENDÓGENA EN LA EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS

Desde hace décadas, los avances en los protocolos de embriogénesis *in vitro* se han basado principalmente en ensayos de prueba y error, ya que los mecanismos de regulación implicados en el proceso de inducción de la reprogramación y la adquisición de totipotencia celular para seguir una ruta embriogénica son todavía en gran medida desconocidos. Sin embargo, cada vez existen más evidencias que indican que la reprogramación de las células vegetales, la adquisición de totipotencia y el inicio de la embriogénesis están regulados principalmente por mecanismos hormonales y epigenéticos (Smertenko y Bozhkov, 2014; Fehér, 2015; Díaz-Sala, 2019; Testillano, 2019).

En esta tesis se ha analizado la dinámica de la auxina endógena y su papel durante la embriogénesis de microsporas inducida por estrés, un sistema modelo de reprogramación celular en plantas, en las especies *Brassica napus* y *Hordeum vulgare,* comparando a su vez esta dinámica con la que presenta esta hormona durante el desarrollo *in vivo* del polen en ambas especies.

Este estudio se ha llevado a cabo en dos especies modelo para el sistema de embriogénesis de microsporas, en las cuales la inducción se lleva a cabo aplicando distintos tratamientos de estrés térmico: en la especie dicotiledónea *B. napus* se aplica un estrés inductor de calor (a 32^{o}C), mientras que en la especie monocotiledónea *H. vulgare*, se aplica un estrés inductor de frío (a 4^{o}C).

El haber realizado el mismo estudio en dos especies tan distintas, obteniendo resultados similares en ambas, sugiere mecanismos comunes y la posible extrapolación de la dinámica de la auxina a otras especies de interés, lo que permitiría identificar nuevas dianas para mejorar otros sistemas de embriogénesis *in vitro*, incluso en especies recalcitrantes.

Los resultados obtenidos han mostrado un papel clave de la auxina en la reprogramación y embriogénesis de la microspora, observándose una dinámica opuesta durante el desarrollo del polen en las dos especies. A lo largo del desarrollo del polen, la auxina tendría un papel relevante en etapas iniciales, como es la fase de tetrada, asociada a la alta actividad transcripcional de la microspora y el tapetum, que va

perdiéndose con la maduración del polen. Sin embargo, cuando la microspora se desvía de su ruta de desarrollo gametofítico, con la reprogramación a embriogénesis, la auxina actúa como un factor clave tanto al inicio como durante el desarrollo del embrión. Además, el uso de inhibidores de biosíntesis y transporte de auxina han demostrado que ambos son necesarios tanto para la inducción embriogénica de las microsporas como para el posterior desarrollo del embrión.

5.1.1 La dinámica de la auxina durante el desarrollo del polen

En los últimos años, distintos estudios llevados a cabo en *Arabidopsis* han revelado que tanto la concentración como la distribución y señalización de auxinas son factores clave a la hora de determinar el destino, la proliferación y la diferenciación celular. Asimismo, el gradiente y la distribución asimétrica de auxinas juegan un papel esencial en el crecimiento y desarrollo de la planta, así como en las respuestas de la misma ante diversos factores ambientales. De entre los múltiples procesos en los que la auxina se encuentra implicada cabe destacar el desarrollo de raíces laterales, la embriogénesis somática temprana, la formación de meristemos (Perianez-Rodriguez *et al*., 2014; Su *et al*., 2015), la regulación de los movimientos trópicos como el fototropismo o el gravitropismo (Maraschin *et al*., 2005; Wang *et al*., 2013; Zhang *et al*., 2017) y la skotomorfogénesis y fotomorfogénesis (Yu *et al*., 2016; Cao *et al*., 2019). Sin embargo, a pesar de la abundancia de datos sobre la participación de la auxina en múltiples procesos del crecimiento y desarrollo de las plantas (Weijers *et al*., 2018), sólo hay unos pocos trabajos en los que se ha estudiado la auxina en el desarrollo del polen (Feng *et al*., 2006; Cecchetti *et al*., 2008; Salinas-Grenet *et al*., 2018).

Existen diversos trabajos en los cuales se estudia y describe de forma detallada el relevante papel que juega la auxina durante el desarrollo floral (Aloni *et al*., 2006; Cheng *et al*., 2006; Sundberg y Østergaard, 2009). Sin embargo, hasta la fecha, no hay muchos estudios que informen sobre la implicación de esta hormona en el desarrollo del polen.

En esta tesis se ha analizado la dinámica de la auxina durante el desarrollo de la antera en las especies *B. napus* y *H. vulgare*, analizando tanto las microsporas y el polen como el tejido del tapetum.

In vivo, el grano de polen se desarrolla en el interior de las anteras mediante un proceso de microsporogénesis, que da lugar a la formación de las microsporas, seguido de un proceso microgametogénesis, que originará finalmente el grano de polen. Este desarrollo del gametofito masculino está estrechamente ligado a la dinámica y diferenciación de los tejidos de la antera, especialmente del tapetum. Las células tapetales desempeñan un papel clave como tejido secretor, proporcionando nutrientes y diversas moléculas necesarias para la formación de las microsporas y el correcto desarrollo del polen. Trabajos previos del grupo han demostrado que la formación del grano de polen está acompañada por una serie de cambios metabólicos y morfológicos de las células del tapetum (Solís *et al*., 2014).

Un estudio reciente en *Arabidopsis* (Salinas-Grenet *et al*., 2018), en el que analizaron distintas secciones histológicas de anteras en distintos estadios del desarrollo procedentes de plantas modificadas con el promotor sintético de respuesta a auxina DR5: GUS, muestra que la auxina está presente a lo largo de todo el desarrollo del polen, detectando una mayor presencia de la hormona en microsporas y una detección menor en polen tricelular y polen maduro donde ya ha tenido lugar la antesis. Asimismo, con esta misma técnica, también detectaron actividad de señalización de la auxina en las células del tapetum durante las etapas tempranas del desarrollo floral, en la fase de microspora, antes de que se formara el grano de polen.

En esta tesis, la localización de auxina se llevó a cabo mediante ensayos de inmunofluorescencia con el anticuerpo monoclonal anti-AIA, cuya especificidad fue demostrada con diversos controles tanto negativos como positivos. Esta técnica permitió localizar de forma precisa la señal de AIA en los distintos tejidos de la antera a medida que avanza el desarrollo, dando una información precisa tanto de la localización como del nivel de acumulación de la auxina en base a la intensidad de la señal fluorescente. Los resultados obtenidos en esta tesis sobre la acumulación de auxina durante el desarrollo del polen de *B. napus* y *H. vulgare* están de acuerdo con los descritos previamente en el citado estudio de *Arabidopsis*, observándose una elevada presencia de auxina en etapas tempranas del desarrollo del polen, tanto en el tapetum como en las microsporas en fase de tetrada, mientras que en etapas posteriores los niveles de auxina fueron disminuyendo progresivamente a medida que avanzaba el

desarrollo. Estos resultados de inmunolocalización, correlacionan además con los resultados de concentración endógena de la hormona, obtenidos mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray (LC-ESI-MS/MS).

Estudios recientes han demostrado que la presencia de auxina en las células del tapetum es importante para el correcto desarrollo tanto del grano de polen como de los estambres (Feng *et al*., 2006; Cecchetti *et al*., 2017). Hay estudios realizados en *Arabidopsis* que demuestran que la auxina participa en etapas tempranas y tardías del desarrollo de los estambres (Sundberg y Østergaard, 2009). En las primeras etapas se ha visto expresión de genes de biosíntesis de auxina YUC (YUC2 y YUC6), relacionándose con la diferenciación, actividad y destino del tapetum. Del mismo modo nuestros resultados de inmunolocalización han revelado una elevada presencia de auxina en el tapetum en etapas tempranas, lo que apoya un papel de la auxina también en el tapetum de *B. napus* en etapas iniciales del desarrollo de la antera. Estos resultados también correlacionan con los niveles de transcripción de los genes de biosíntesis de auxina *BnTAA1* (triptófano aminotransferasa 1 de *Arabidopsis*) y *HvTAR2-like* (triptófano aminotrasferasa-related 2) de *B. napus* y *H. vulgare*, respectivamente, en los que se observaron niveles muy altos de expresión en las primeras etapas del desarrollo y un descenso de los mismos a medida que avanza la diferenciación de la microspora. El mismo estudio (Sundberg y Østergaard, 2009) observó que la auxina también estaba presente en etapas más avanzadas del desarrollo de los estambres de *Arabidopsis*, relacionando este resultado con el requerimiento de auxina para la elongación del filamento del estambre y la dehiscencia de la antera. Nuestros resultados sin embargo no muestran presencia de auxina en el grano de polen ni en el resto de tejidos de la antera en los estadios más avanzados, lo que nos lleva a pensar que quizá la auxina se encuentre en este momento localizada en el filamento, tejido que no se ha analizado en esta tesis.

Otros trabajos han demostrado que durante el desarrollo del estambre no solo es necesaria la biosíntesis de auxina, sino también su transporte tanto en las fases tempranas como tardías. Un estudio llevado a cabo en *Arabidopsis* (Cardarelli y Cecchetti, 2014) indica que distintos miembros de la familia de transportadores PIN-

FORMED (PIN) están involucrados en las fases más tempranas de la formación y desarrollo del estambre tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas. Estos resultados correlacionan con los datos obtenidos en esta tesis sobre la expresión génica de *BnPIN1-like* y *HvPIN1-like* de *B. napus* y *H. vulgare*, respectivamente. El patrón de expresión del gen transportador PIN1 mostró en ambas especies una elevada expresión en las etapas más tempranas del desarrollo del polen, mientras que esta expresión fue disminuyendo en etapas más avanzadas, lo cual también correlaciona con los resultados de expresión génica de los genes de biosíntesis *BnTAA1* y *HvTAR2-like*, así como con los resultados de inmunolocalización y concentración de AIA.

Estos resultados indican que la auxina, así como la activación de su ruta de biosíntesis y transporte, son necesarios en etapas iniciales del desarrollo del polen de *B. napus* y *H. vulgare*. Sin embargo, a medida que avanza la maduración del polen existe una regulación negativa de ambas rutas y una disminución en la concentración celular de auxina tanto en el polen como en las células del tapetum.

5.1.2 El inicio y progresión de la embriogénesis de microsporas requiere la activación de biosíntesis y transporte de auxina

Numerosos estudios han demostrado que el tratamiento con hormonas exógenas, principalmente auxina, es fundamental a la hora de desencadenar el proceso de embriogénesis somática y el desarrollo *in vitro* (Fehér, 2015; Nic-Can y Loyola-Vargas, 2016; Díaz-Sala, 2019). Sin embargo, la embriogénesis de microsporas es un sistema que se induce principalmente por la aplicación de un estrés inductor, sin añadir auxina de manera exógena al medio de cultivo. Varios estudios han propuesto que la interacción entre la señalización por el estrés inductor y las fitohormonas, en particular la auxina, son los principales desencadenantes de la inducción de la embriogénesis somática, aunque aún se desconocen los mecanismos que subyacen a este proceso (Fehér, 2015a; Nic-Can y Loyola-Vargas, 2016; Testillano, 2019).

El estudio llevado a cabo en esta tesis ha revelado cambios en la concentración celular de auxina al inicio y durante la progresión de la embriogénesis de microsporas, patrón que correlaciona con el perfil de expresión de genes clave en la ruta de biosíntesis

de auxina *BnTAA1* (triptófano aminotransferasa 1 de *Arabidopsis*) y *HvTAR2-like* (triptófano aminotrasferasa-related 2) en *B. napus* y *H. vulgare*, respectivamente.

Estudios llevados a cabo en otros sistemas de embriogénesis somática han demostrado que los niveles de AIA endógeno aumentan durante el inicio de la embriogénesis, así como durante el posterior desarrollo del embrión (Rodríguez-Sanz *et al*., 2015; Díaz-Sala, 2019; Wójcik *et al*., 2020). Además, en trabajos anteriores del grupo (Rodríguez-Sanz *et al*., 2015) y otros trabajos recientes (Yang *et al*., 2012; Wójcikowska y Gaj, 2017; Wójcik *et al*., 2020) se ha visto que durante la embriogénesis somática se induce tanto la biosíntesis *de novo* como el transporte polar y las rutas de señalación de auxina, tal y como muestran los altos niveles de expresión de los genes de biosíntesis YUC, TAA1, TAR2, el gen de transporte polar de auxina PIN1 (PIN FORMED 1) y los genes de señalización Aux/AIA y ARF.

Trabajos recientes del grupo y otros laboratorios han demostrado que existe una correlación entre los niveles y localización de AIA durante la embriogénesis somática *in vitro* y la embriogénesis cigótica *in vivo* en varias especies, entre ellas *Brassica napus* (Supena *et al*., 2008; Prem *et al*., 2012; Rodríguez-Sanz *et al*., 2015; Pérez-Pastrana *et al*., 2021). En cuanto al patrón de distribución de la auxina en el embrión cigótico, varios estudios han detectado un máximo de señal en el meristemo apical del tallo y de la raíz (Forestan *et al*., 2010; Wang y Jiao, 2018; Pérez-Pérez *et al*., 2019), así como en la zona apical de los cotiledones en plantas dicotiledóneas (Chen *et al*., 2010; Prem *et al*., 2012; Prasad y Dhonukshe, 2013), que coincide con la región de máxima biosíntesis de auxina. Los resultados de esta tesis han demostrado que, en etapas avanzadas, el embrión derivado de microspora presenta un patrón de localización de auxina con gran acumulación en las mismas regiones meristemáticas que el embrión cigótico, en el caso de *H. vulgare,* y en la zona más apical de los cotiledones que darán lugar a los primordios foliares en *B. napus*. En la embriogénesis cigótica de *Arabidopsis* también se ha detectado acumulación de auxina en células del embrión desde etapas muy tempranas (Möller y Weijers, 2009; Robert *et al*., 2013). Más recientemente se ha visto que existe un aumento de los niveles de auxina en los óvulos después de que tenga lugar la fertilización, debido al aumento de la biosíntesis de auxina en los tegumentos, siendo esta auxina necesaria para el correcto desarrollo del embrión (Robert *et al*., 2018).

Además, se ha visto en varias especies que durante las etapas tempranas de la embriogénesis cigótica existe un flujo de auxina desde el suspensor hacia el resto del embrión (Möller y Weijers, 2009; Robert *et al*., 2013;Pérez-Pastrana *et al*., 2021). En nuestros resultados hemos observado que los embriones derivados de microsporas en fase globular o corazón que habían desarrollado y aún conservaban la estructura del suspensor, se podía claramente apreciar como el suspensor apenas presentaba señal de fluorescencia, en comparación con el resto de células activas en proliferación que forman el embrión. Todos estos resultados indican que la dinámica de síntesis y localización de auxina en la embriogénesis de microsporas, tanto en colza como en cebada, es análoga a la de la embriogénesis cigótica.

Por otro lado, se ha demostrado que en la embriogénesis somática indirecta los reguladores de crecimiento, entre ellos la auxina, juegan un papel clave tanto al inicio del proceso para la obtención de masas proembriogénicas (MPE) como en la diferenciación y maduración de embriones somáticos. Varios estudios han demostrado que los niveles de auxina endógena son significativamente más altos durante la proliferación de MPE y el desarrollo de embriones somáticos de especies arbóreas como el abeto de *Noruega, Abies alba* y *Quercus alba* (Hakman *et al*., 2009; Corredoira *et al*., 2017; Vondrakova *et al*., 2018), lo cual sugiere que altos niveles de auxina endógena pueden estar implicados en activar la proliferación de células adultas reprogramadas, lo cual conduce a la formación de MPE y al inicio de la embriogénesis somática. Nuestros resultados también han revelado una elevada concentración de auxina en los proembriones durante las primeras divisiones embriogénicas, sugiriendo un papel de esta hormona en la activación de la proliferación que tiene lugar tras la reprogramación.

En trabajos previos del laboratorio en embriogénesis de microsporas de *B. napus* ya pudo observarse un aumento de la biosíntesis *de novo* de auxina en etapas muy tempranas de la embriogénesis, ligada a las primeras divisiones de las microsporas reprogramadas (Rodríguez-Sanz *et al*., 2015). Además, en *Quercus suber*, un sistema donde la embriogénesis de microsporas se induce en anteras aplicando un tratamiento de estrés a media temperatura, se ha observado un aumento diferencial significativo de auxina endógena en las células que forman los embriones multicelulares, en comparación con las microsporas no reprogramadas (Rodríguez-Sanz *et al*., 2014).

Una vez activada la ruta embriogénica, el posterior desarrollo del embrión también implica un aumento adicional de los niveles de auxina endógena. Los resultados obtenidos en esta tesis muestran un aumento tanto en los niveles de expresión de los genes de biosíntesis *BnTAA1* y *HvTAR2-like* como de la señal de fluorescencia y concentración de AIA con la diferenciación del embrión. Estos resultados correlacionan con los resultados obtenidos en otros estudios realizados en plantas tanto monocotiledóneas (Fischer-Iglesias *et al*., 2001; Forestan *et al*., 2010), como dicotiledóneas (Cheng *et al*., 2010; Rodríguez-Sanz *et al*., 2015), donde también observaron un aumento de la concentración de ácido-3-acético durante el desarrollo del embrión. Los resultados obtenidos durante la embriogénesis de microsporas de ambas especies, dos sistemas en los que se inicia el desarrollo del embrión en ausencia de tejido extraembrionario circundante, sugieren que el tratamiento de estrés por calor (en el caso de *B. napus*) o por frío (en el caso de *H. vulgare*) puede desencadenar una respuesta de auxina endógena, aumentando su biosíntesis y niveles intracelulares, que determinarán la nueva ruta de desarrollo de las microsporas. Además, el incremento de los niveles de auxina en proembriones tempranos puede estar relacionado con la activación de la actividad proliferativa tanto en las microsporas reprogramadas y como en las células del proembrión. El haber estudiado la dinámica de la auxina en una planta dicotiledónea y una planta monocotiledónea, y haberse obtenido resultados similares, indica que la embriogénesis de microsporas inducida por estrés tiene los mismos efectos sobre la biosíntesis de auxinas en varias especies, independientemente del estrés aplicado (frío o calor), lo que sugiere rutas comunes de regulación hormonal.

Asimismo, debemos tener en cuenta que la función y disponibilidad de las auxinas por parte de las células no solo dependen de su biosíntesis a nivel local, su degradación y su conjugación, sino también de su transporte polar célula a célula, donde juegan un papel crucial las proteínas transportadoras de la familia *PIN-FORMED* (PIN), regulando el flujo de salida de auxina desde el citosol hacia el apoplasto (*auxin efflux*) (Bennett, 2015).

Los resultados obtenidos en esta tesis tras el análisis de expresión génica de *BnPIN1-like* y *HvPIN1-like* durante la embriogénesis de microsporas de colza y cebada, respectivamente, mostraron en ambos casos un aumento de la transcripción al inicio de

la embriogénesis, en proembriones, y unos niveles de expresión aún mayores en embriones en diferenciación. En la embriogénesis cigótica de *Arabidopsis*, PIN1 juega un papel crucial regulando el transporte polar de auxina (PAT) en el embrión en desarrollo. Estudios previos han demostrado que en etapas tempranas de la embriogénesis (en las fases de proembrión y embrión globular temprano) la auxina es transportada desde las células del suspensor al resto del embrión por el transportador PIN7, mientras PIN1 se encarga de la distribución homogénea de la auxina entre las celulas del embrión (Petrášek y Friml, 2009). A medida que avanza el desarrollo, PIN1, junto con PIN7 y PIN4, juega un importante papel en la polarización de los flujos de auxina para establecer gradientes de auxinas en zonas específicas del embrión (Petrášek y Friml, 2009; Zazimalova *et al*., 2010). Esta polarización de la auxina también se ha podido observar en los embriones cotiledonares de *B. napus* analizados por inmunofluorescencia en esta tesis, donde se observa un patrón de distribución diferencial de la auxina, con mayor acumulación de la misma en la región apical de los cotiledones y la zona basar del embrión, zonas con mayor actividad de proliferación en el embríón. Los transportadores PIN también se han identificado en plantas monocotiledóneas, donde de igual manera juegan un papel central en la regulacion de PAT y la acumulación de auxina a lo largo del desarrollo de la planta, así como durante la embriogénesis (Balzan *et al*., 2014; Forestan y Varotto, 2012; Locascio *et al*., 2014). En maiz, el transportador *ZmPIN1* es el encargado de controlar el proceso de diferenciación durante la embriogénesis cigótica, regulando la distribución heterogénea de auxinas en etapas avanzadas del desarrollo, con una acumulación de auxinas en regiones específicas como los meristemos apicales del tallo y la raiz (Forestan *et al*., 2010). Los resultados obtenidos en esta tesis también revelan acumulación de auxina en ciertas regiones de los embriones en diferenciación, como pueden ser los meristemos, lo que indica la relevancia de PAT en la embriogénesis de microsporas de cebada, al igual que ocurre en la embriogénesis cigótica.

En esta tesis se han llevado a cabo análisis funcionales utilizando inhibidores de la biosíntesis (kinurenina) y el transporte (NPA) de auxina con la finalidad de evaluar el papel de la auxina en el inicio y la progresión de la embriogénesis de *B. napus* y *H. vulgare*. Uno de los inhibidores utilizados fue la kinurenina, una molécula que actúa como sustrato alternativo de las enzimas TAA1/TAR, implicadas en la biosíntesis de

auxina. Este compuesto actúa por tanto inhibiendo de forma selectiva la actividad enzimática de TAA1/TAR (He *et al*., 2011). Los ensayos de inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-AIA de muestras de cultivos tratados con kinurenina mostraron una señal de fluorescencia menos intensa, en comparación con las muestras de cultivos sin tratar, lo que indica que la kinurenina actúa inhibiendo la biosíntesis de auxina en cultivos de microsporas de *B. napus* y *H. vulgare*, tal y como ya se había descrito en otras especies y sistemas (He *et al*., 2011; de Wit *et al*., 2015; Nomura *et al*., 2015). El tratamiento con kinurenina afectó al proceso de embriogénesis de microsporas en dos momentos clave. En un primer momento, al inicio de la embriogénesis, el tratamiento de kinurenina implicó una reducción del número de proembriones formados en el cultivo, lo cual indica que la auxina juega un papel importante en el inicio de la embriogénesis. En momentos más avanzados del desarrollo, durante el proceso de diferenciación de los embriones, la inhibición de la biosíntesis de auxina en los cultivos tratados con kinurenina condujo a una reducción significativa de la producción de embriones completamente diferenciados. Por tanto, estos resultados sugieren que la biosíntesis *de novo* de la auxina es necesaria tanto para la inducción embriogénica como para el desarrollo y diferenciación del embrión durante la embriogénesis de microsporas de colza y cebada.

En esta tesis también se han realizado ensayos funcionales con el inhibidor del transporte de auxinas NPA en la especie *H. vulgare*, el cual impidió significativamente el progreso de la embriogénesis. Este compuesto se ha utilizado en distintos estudios para inhibir el transporte polar de auxina mediado por los transportadores PIN en procesos del desarrollo de las plantas muy diferentes (Nishimura *et al*., 2011; Forestan y Varotto, 2012; Balzan *et al*., 2014; Teale y Palme, 2018). Múltiples estudios han demostrado que la aplicación de NPA durante la embriogénesis cigótica conduce a defectos en el patrón de desarrollo del embrión en muchas especies tanto dicotiledóneas (Weijers y Jürgens, 2005; Rodríguez-Sanz *et al*., 2015) como monocotiledóneas (Fischer-Iglesias *et al*., 2001; Forestan *et al*., 2010a; Shirley *et al*., 2019), lo que sugiere la necesidad del PAT para que tenga lugar un desarrollo normal del embrión. Además de PIN1, se han descrito otras dianas sobre las que actúa el NPA inhibiendo el transporte de auxinas (Nagashima *et al*., 2008; Peer *et al*., 2009). En *Arabidopsis* se ha demostrado que el tratamiento con NPA

altera la localización y la endocitosis de PIN, lo cual afecta a la distribución asimétrica de auxinas mediada por este transportador durante el alargamiento del hipocótilo debido al fototropismo (Yu *et al*., 2016; Zhang *et al*., 2017). A pesar de que la identificación del modo de acción del NPA durante la embriogénesis de microsporas requiere estudios posteriores, podría plantearse la hipótesis de que, probablemente, el NPA pueda afectar al inicio de la embriogénesis de microsporas mediante la alteración de la localización polar de PIN y/o del tráfico intracelular y, por tanto, de la localización de auxinas. Los resultados obtenidos en esta tesis en cultivos de microsporas de cebada tratados con NPA mostraron claramente una reducción en el número de proembriones formados y embriones diferenciados en comparación con los cultivos sin tratar. También pudo observarse mediante ensayos de inmunofluorescencia una distribución anormal de AIA en las células embrionarias de los cultivos tratados con NPA. En conjunto, estos resultados permiten confirmar la necesidad de un transporte activo de auxina durante la embriogénesis de microsporas para que tenga lugar tanto la inducción como el posterior desarrollo embrionario *in vitro* de forma correcta.

Estos resultados indican que la auxina juega un papel clave tanto en el inicio de la embriogénesis como durante el posterior desarrollo del embrión, lo cual implica la activación de su ruta de biosíntesis, así como del transporte polar de auxina en las primeras etapas tras la inducción, y una regulación positiva progresiva de las mismas a medida que avanza el desarrollo del embrión en *B. napus* y *H. vulgare*.

5.1.3 La dinámica de la auxina cambia con la reprogramación a embriogénesis de la microspora

Todos los datos obtenidos indican que la auxina participa en la regulación de las dos rutas de desarrollo del polen estudiadas, pero juega distintos papeles en cada una de ellas (Fig. 132). Durante el desarrollo *in vivo* del polen, la auxina tendría un papel relevante en las primeras etapas, asociada a la alta actividad transcripcional del tapetum y de las microsporas, que va perdiéndose con la maduración del polen. Sin embargo, la dinámica de la auxina cambia con la reprogramación embriogénica de la microspora, aumentando tanto la acumulación de auxina como la expresión de los genes de

biosíntesis *TAA1* y *TAR2*, y del gen de transporte *PIN1*, que muestran un patrón análogo a los descritos para la auxina durante la embriogénesis cigótica.

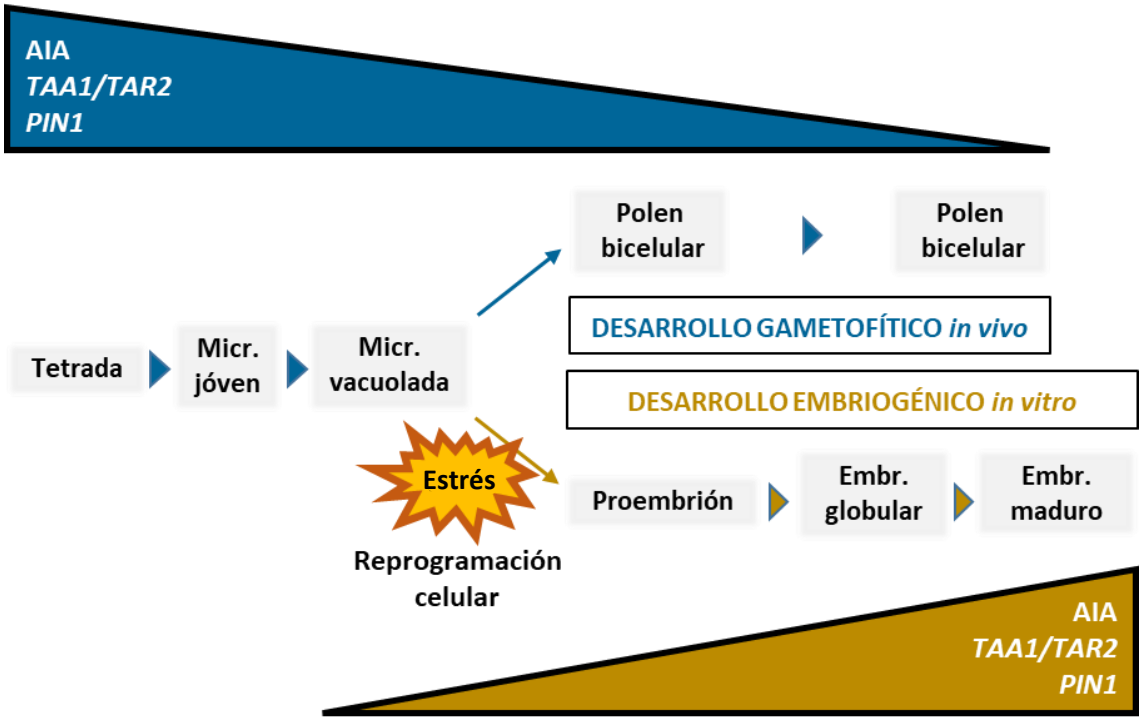


Figura 132. Esquema de la auxina durante el desarrollo del polen *in vivo* y el desarrollo embriogénico *in vitro* de *B. napus* y *H. vulgare*.

5.2 PAPEL DE LA CITOQUININA ENDÓGENA EN LA EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS

Numerosos estudios han demostrado que las citoquininas están presentes y participan en prácticamente todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, como el desarrollo de meristemos, la floración, el desarrollo del gametofito femenino, de frutos y semillas, o la diferenciación del sistema vascular, entre muchos otros (Wybouw y De Rybel, 2019). Sin embargo, a pesar de las importantes funciones que desempeña la citoquinina en el crecimiento y desarrollo postembrionario, aún no está claro el papel que juega esta hormona en la embriogénesis temprana, y su mecanismo de actuación sigue siendo en gran medida desconocido.

En esta tesis se ha estudiado la dinámica y posible implicación de la citoquinina durante el inicio y progresión de la embriogénesis de microsporas inducida por estrés en las especies *Brassica napus* y *Hordeum vulgare*. Ambas especies son consideradas sistemas modelo para el estudio de la embriogénesis de microsporas, un proceso que en *B. napus* se lleva a cabo sin necesidad de añadir fitohormonas de forma exógena al medio de cultivo y en *H. vulgare* se desarrolla en un medio que solamente contiene la hormona sintética BAP (6-Bencilaminopurina), características que han permitido evaluar de forma precisa la dinámica de citoquinina endógena durante la embriogénesis de microsporas.

Los resultados de esta tesis revelan por primera vez la dinámica de la citoquinina endógena durante el proceso de embriogénesis de microsporas, habiéndose observado una baja concentración de esta hormona en las etapas iniciales, en microsporas y proembriones, y un aumento significativo de los niveles de citoquinina en etapas más avanzadas del desarrollo, ligadas a la diferenciación del embrión.

A medida que avanza el conocimiento sobre la implicación de la citoquinina en los distintos procesos del desarrollo, se hace más evidente el hecho de que esta hormona por sí sola no es capaz de desencadenar la formación de órganos complejos, sino que su función debe ir acompañada de la intervención de otras hormonas que interaccionen con ella a lo largo del desarrollo de la planta (Wybouw y De Rybel, 2019). Desde los primeros experimentos de Skoog y Miller (Skoog y Miller, 1957), la interacción entre citoquininas y auxinas ha sido objeto de estudio en múltiples sistemas del desarrollo (Schaller *et al*., 2015; Müller *et al*., 2017). Las citoquininas, junto con la auxina,

representan los grupos de fitohormonas más utilizados para inducir respuestas en distintos sistemas de cultivo *in vitro* (Kieber y Schaller, 2018; Hnatuszko-Konka *et al*., 2021). Ambas hormonas están implicadas en el crecimiento y desarrollo de la planta, y el equilibrio entre las dos se encarga de regular el destino de los tejidos en regeneración para formar nuevos órganos, de manera que distintas proporciones de auxinas y citoquininas actúan regulando el equilibrio entre la proliferación y la diferenciación celular (Dello Ioio *et al*., 2008). Existen distintos tipos de citoquininas y, a pesar de que existe variación en cuanto a su presencia y función dependiendo tanto de la especie vegetal como del tejido y el estadio del desarrollo, la *trans*-zeatina (*t*Z) seguida de la isopenteniladenina (iP) han sido descritas como las formas más abundantes y con mayor actividad fisiológica en plantas angiospermas (Nishii *et al*., 2018).

Los resultados obtenidos en esta tesis mediante ensayos de inmunolocalización con el anticuerpo *trans*-zeatina, y los ensayos de acumulación de citoquinina endógena de tipo *t*Z e iP utilizando cromatografía de líquidos de alta definición acoplada a espectrometría de masas (U-HPLC-MS), mostraron niveles bajos de esta hormona tanto en el momento previo a la inducción, en microspora vacuolada aislada, como en los primeros estadios del desarrollo tras la reprogramación embriogénica, en la fase de proembrión, mientras que los niveles de citoquinina alcanzaron niveles muy altos de acumulación en las etapas más avanzadas del desarrollo embriogénico, tanto de *B. napus* como de *H. vulgare*. Este patrón temporal de acumulación de citoquinina indica una relación entre las bajas concentraciones de citoquinina en las etapas más tempranas de la embriogénesis, donde predomina una alta actividad proliferativa, y una alta concentración de esta hormona en etapas avanzadas, ligada a la diferenciación del embrión.

En un primer momento puede llamar la atención este patrón de la citoquinina en el desarrollo, ya que típicamente la citoquinina se ha descrito como un regulador del crecimiento de las plantas con función de estimular la división celular (al menos en cultivo *in vitro*) (Skoog y Miller, 1957). Sin embargo, existen otros trabajos en los que la citoquinina se ha relacionado con eventos de diferenciación. Ensayos de inmunolocalización de las citoquininas iP y *t*Z en el desarrollo de la raíz de *Cucurbita máxima*, mostraron una intensa localización de ambos tipos de citoquinina en células

diferenciadas del tejido y ausencia de las mismas en las zonas correspondientes a los dominios proliferativos del meristemo apical de la raíz (Chiappetta *et al*., 2011), lo cual correlaciona con el patrón observado durante la embriogénesis de microsporas de colza y cebada. En esta tesis, el patrón de localización de *t*Z mostró una mayor intensidad de señal en las células del tejido epidérmico en diferenciación de embriones cotiledonares de *B. napus* y coleoptilares de *H. vulgare*. Además, en este estadio avanzado del embrión de cebada, también pudo observarse una acumulación de citoquinina en las zonas meristemáticas del tallo y la raíz, tal y como se ha observado en ensayos de inmunolocalización de citoquinina llevados a cabo en otras especies monocotiledóneas. En un ensayo de inmunolocalización de citoquinina de tipo zeatina llevado a cabo en embrión cigótico de maíz (Rijavec *et al*., 2011), se observó una localización heterogénea de esta hormona en las primeras etapas del desarrollo del embrión, donde el embrión globular presentó mayor señal en la zona adaxial que en la abaxial. Según avanzaba el desarrollo se vio un aumento en la acumulación de citoquinina distribuida de nuevo de forma heterogénea, con menor intensidad en el suspensor y las células escutelares. Ya en los estadios más avanzados observaron señal tanto en el embrión como en el escutelo, sin embargo, la señal de citoquinina más intensa estaba claramente localizada en las zonas meristemáticas del embrión, tanto en el meristemo apical del tallo (MAT) y como en el meristemo apical de la raíz (MAR), un patrón de localización que correlaciona con los resultados de inmunolocalización observados en esta tesis en embriones coleoptilares de cebada. Del mismo modo, la señal heterogénea de citoquinina en etapas tempranas y su acumulación progresiva con el avance de la embriogénesis, apoya el perfil de localización observado en el desarrollo embriogénico de cebada y colza. En ese mismo estudio con maíz (Rijavec *et al*., 2011), también se documentó un rápido y gran incremento en los niveles de citoquinina del tipo *t*Z en cariópsides fertilizadas, mientras que en los óvulos no fertilizados los niveles de citoquinina apenas alcanzaban una décima parte que en los primeros. Estos resultados apoyan la idea de que la citoquinina es necesaria durante el desarrollo del embrión cigótico, con un requerimiento mayor de la misma a medida que avanza el desarrollo.

En los últimos años, la mayoría de estudios se han centrado en la aplicación exógena de la hormona y la posterior evaluación de la respuesta inducida en la planta

(Yang *et al*., 2016; Panda *et al*., 2018), con la consecuente limitación que ello supone para la caracterización de los genes implicados en la transducción, la liberación, la conjugación y la inactivación de esta hormona. En esta tesis se ha llevado a cabo un análisis de expresión de genes implicados en la biosíntesis, la degradación y la señalización de citoquininas, en un sistema libre de hormonas exógenas como es la embriogénesis de microsporas de *B. napus*. Los genes de biosíntesis de citoquininas *BnIPT1*-2 y *BnIPT9* mostraron patrones de expresión similares, con unos niveles de transcripción bajos en las primeras etapas de la embriogénesis tanto antes como después de la inducción (en microspora vacuolada y proembriones) en el caso de *BnIPT1*-2, y con un ligero aumento de la misma al inicio de la embriogénesis en el caso de *BnIPT9*. A medida que avanza el desarrollo, con la diferenciación del embrión, ambos genes mostraron un gran aumento en sus niveles de expresión. Estos resultados correlacionan con los datos de expresión obtenidos al analizar el gen de degradación *BnCKX2*, cuya expresión se limitó a las primeras etapas del desarrollo, coincidiendo con las etapas que presentaron menor expresión de los genes de biosíntesis. también se analizaron dos genes reguladores de la respuesta a citoquinina pertenecientes a dos grupos distintos: *BnARR21*, regulador de tipo B (activador de la señal de citoquininas) y *BnARR5*, regulador de tipo A (inhibidor de la señalización de citoquininas). Los resultados mostraron expresión del gen *BnARR21* (tipo B) a lo largo de todo el desarrollo embriogénico, con una expresión significativamente superior en las fases más avanzadas del desarrollo. Por el contrario, solamente se detectó expresión del gen *BnARR5* en la fase de microspora vacuolada aislada, antes de que tuviera lugar la inducción embriogénica, un perfil opuesto al observado para el regulador de respuesta a citoquinina de tipo B.

Aunque la mayoría de estudios se centran en la interacción entre citoquinina y auxina, existen estudios que demuestran la interacción de citoquininas con otras fitohormonas como las giberelinas, el etileno, las estrigolactonas o el ácido abscísico (El-Showk *et al*., 2013). En esta tesis también se ha analizado el papel del precursor del etileno (ACC) durante la embriogénesis de microsporas de *B. napus*, observándose unos niveles muy elevados de esta molécula tras la inducción embriogénica, en la fase de proembrión. ACC ha sido descrito como un regulador negativo de los reguladores de

respuesta a citoquininas de tipo A (Liu *et al*., 2017), habiéndose demostrado que la actividad de ARR5 estaría regulada tanto por la actividad de la citoquinina como por la del etileno durante el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis* (Liu *et al*., 2017). Este hecho podría explicar los bajos niveles de expresión del gen *BnARR5* en la fase de proembrión, fase en la que se detectó a su vez una elevada acumulación de ACC mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray (LC-ESI-MS/MS), y donde cabría esperar altos niveles de expresión del gen inhibidor de la señalización de citoquininas *BnARR5*, pudiendo estar interviniendo el etileno en la regulación de su expresión.

Aun hoy en día se desconocen en gran medida los mecanismos moleculares que subyacen a la regulación de las funciones de la citoquinina, y la mayor parte del conocimiento actual está basado en las respuestas observadas en mutantes de la especie modelo *Arabidopsis*. Por este motivo, la experimentación con otras especies de interés con genomas y fisiología más complejos resulta de gran relevancia para poder llegar a identificar y comprender en mayor medida los mecanismos de regulación hormonal que subyacen a los distintos procesos del desarrollo de la planta.

Se sabe que la citoquinina deshidrogenasa (CKX) es la principal enzima que cataliza la inactivación por degradación irreversible de las citoquininas, habiéndose descrito un total de siete genes en *Arabidopsis* que codifican para esta enzima. Estudios llevados a cabo en distintas especies han demostrado que la sobreexpresión de genes CKX conduce a un fenotipo con niveles muy reducidos de citoquinina endógena, en los que se observa una baja actividad de los meristemos vegetativos y florales y una diferenciación temprana de los plastidios, que da lugar a una serie alteraciones del desarrollo en *Arabidopsis* y *Nicotiana* (Werner *et al*., 2003, 2008). Por el contrario, la inhibición de CKX dio lugar a plantas con una alta actividad en los meristemos reproductivos y mayor rendimiento de las semillas en plantas de *Arabidopsis*, arroz, cebada o trigo (Ashikari *et al*., 2005; Zalewski *et al*., 2010; Bartrina *et al*., 2011; Li *et al*., 2018; Berková *et al*., 2020). Por otro lado, los genes de isopenteniltransferasas (IPT) se encargan de catalizar la primera reacción de biosíntesis de citoquininas. En *Arabidopsis*, las plantas mutantes en genes IPT presentan cantidades muy bajas de citoquinina endógena de tipo iP y *t*Z, lo cual se ha visto que afecta a la planta en el desarrollo de una menor densidad foliar,

inflorescencias reducidas, pocos haces vasculares e incapacidad de formar cámbium (Miyawaki *et al*., 2006), lo que sugiere que la citoquinina es necesaria para especificar la identidad celular y formar distintos tejidos y órganos. Asimismo, estudios realizados con mutantes de los receptores de citoquininas (ARR) también revelaron una alteración en distintos aspectos del desarrollo de la planta, indicando también la necesidad de una regulación de la señalización de citoquininas a lo largo del crecimiento y desarrollo de la planta (Kieber y Schaller, 2014).

En esta tesis se han llevado a cabo análisis funcionales con el compuesto -(2-hidroxi-3-metillbencilamino) purina (PI-55), con el fin de evaluar el papel de la citoquinina durante la embriogénesis de microsporas. El PI-55 es la primera molécula descubierta que actúa como antagonista de la actividad de la citoquinina a nivel de receptores, habiéndose demostrado en numerosos casos su capacidad de inhibir la percepción de citoquinina *in planta* (Spíchal *et al*., 2009), específicamente a nivel del receptor CRE1/AHK4.

Los resultados de esta tesis mostraron que el tratamiento con PI-55 no afectó al inicio de la embriogénesis de microsporas de *B. napus*, sin embargo, impidió significativamente el posterior desarrollo del embrión. Estudios previos con este compuesto indican que PI-55 actúa como un potente inhibidor de la ruta de señalización en procesos del desarrollo donde se ha demostrado que CRE1/AHK4 juega un papel principal en la regulación de la señal de citoquininas como puede ser la germinación de semillas, habiéndose observado una germinación más rápida en semillas de *Arabidopsis* de plantas cuyo medio de crecimiento fue tratado con PI-55 (Spíchal *et al*., 2009), un efecto que se observa con frecuencia cuando hay bajas concentraciones de citoquininas (Riefler *et al*., 2006). En la organogénesis *in vitro*, la aplicación de PI-55 en el medio de cultivo afectó positivamente a los parámetros de enraizamiento, un efecto fisiológico también ligado a bajas concentraciones de citoquininas, además, al mismo tiempo, se detectaron concentraciones más elevadas de AIA en los cultivos tratados con el inhibidor (Aremu *et al*., 2015), lo que indica que este compuesto (análogo estructuralmente a la citoquinina y antagonista en cuanto a su actividad) afecta directamente a los niveles endógenos de citoquinina y además, debido a la estrecha relación entre citoquininas y

auxinas, es también capaz de inducir la acumulación de auxina endógena de forma indirecta (Aremu *et al*., 2015).

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis indican que la citoquinina endógena juega un importante papel en etapas avanzadas de la embriogénesis, durante la diferenciación del embrión, mientras que el proceso de inducción tiene lugar a bajas concentraciones de esta hormona.

Desde hace años se ha descrito que la citoquinina y la auxina mantienen una estrecha relación de interacción, a menudo como antagonistas, en los distintos procesos del desarrollo de la planta (Müller y Sheen, 2008). Recientemente, esta relación se ha descrito como complementaria más que como antagónica, actuando en conjunto y de forma dinámica, con funciones opuestas o complementarias en función del proceso concreto del desarrollo en el que estén participando (Schaller *et al*., 2015). El haber estudiado en esta tesis la dinámica tanto de la citoquinina como de la auxina durante los mismos dos sistemas de embriogénesis de microsporas, colza y cebada, nos permite comparar los patrones de ambas hormonas durante el desarrollo. Los resultados indican que la auxina y la citoquinina tienen perfiles opuestos durante las primeras etapas del desarrollo, observándose un aumento de los niveles de auxinas y una baja acumulación de citoquininas en la fase de proembrión. Sin embargo, a medida que avanza la embriogénesis los datos obtenidos indican que ambas hormonas son necesarias para el desarrollo del embrión, aunque su localización celular muestra patrones distintos.

5.3 PAPEL DE REMODELACIÓN DE LA PARED CELULAR EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Cada vez existen más evidencias que indican que tanto el crecimiento como la diferenciación del embrión requieren de una remodelación controlada de las redes de polisacáridos que componen la pared celular, sin embargo, aún se desconocen en gran medida los procesos que lo regulan (Barnes y Anderson, 2018; Voiniciuc *et al*., 2018). La remodelación de la pared celular implica cambios en sus propiedades mecánicas que permiten llevar a cabo con normalidad los eventos de división y expansión celular propios del desarrollo (Barnes y Anderson, 2018). Los componentes de la pared celular, como las pectinas y las proteínas de arabinogalactano (AGPs), juegan un papel crucial durante la organogénesis, así como en la embriogénesis somática y cigótica (van Hengel *et al*., 2001, 2002; Baluška *et al*., 2002, 2005; Šamaj *et al*., 2005; Seifert y Roberts, 2007; Bárány *et al*., 2010; Geshi *et al*., 2013; Smertenko y Bozhkov, 2014; Solís *et al*., 2016; Saffer, 2018; Wu *et al*., 2018) actuando como moduladores de las propiedades mecánicas de la pared celular, tales como la rigidez o la susceptibilidad a la degradación (Seifert y Roberts, 2007; Barnes y Anderson, 2018).

En esta tesis se han estudiado los cambios en dos componentes principales de la pared celular, pectinas y AGPs, durante la embriogénesis somática de *Quercus suber*, una especie de gran valor ecológico y económico, comparando a su vez esta dinámica con la remodelación de la pared celular que tiene lugar durante la embriogénesis de microsporas de la especie hortícola *Brassica napus* y el cereal *Hordeum vulgare*.

Los resultados obtenidos indican que tanto las pectinas como las AGPs tienen un papel regulador durante la embriogénesis *in vitro* de estas tres especies, promoviendo la remodelación de la pared celular durante el desarrollo del embrión. Los datos obtenidos en cada una de las tres especies indican que los cambios en la pared celular controlados por el grado de metilesterificación de las pectinas, mediados por enzimas pectinmetilesterasas (PME) y por los inhibidores endógenos de pectinmetilesterasas (PMEI), juegan un importante papel en los tres sistemas de embriogénesis, siendo su función más importante en etapas avanzadas del desarrollo, donde la actividad PME juega un papel relevante en el proceso de diferenciación embriogénica. A su vez, los resultados indican un aumento en el contenido de AGPs de las paredes celulares del

embrión a medida que avanza la embriogénesis, lo que sugiere que las AGPs juegan un importante papel sobre todo en las etapas más avanzadas del desarrollo embriogénico. Los análisis funcionales con inhibidores de la actividad PME e inhibidores que bloquean y precipitan AGPs indicaron que tanto las pectinas como las AGPs son necesarias para el correcto desarrollo de la embriogénesis, donde desempeñan un papel crucial.

5.3.1 La desesterificación de pectinas mediada por PME y PMEI es esencial para la progresión de la embriogénesis somática

Las pectinmetilesterasas (PME) son enzimas implicadas en la remodelación de la pared celular durante el crecimiento de la planta, y su actividad está regulada por interacción directa con inhibidores de pectinmetilesterasas (PMEI) (Pelloux *et al*., 2007; Wolf *et al*., 2009; Lionetti *et al*., 2017; Wormit y Usadel, 2018). Se cree que la dinámica en los niveles de esterificación de pectinas está involucrada en eventos de proliferación y diferenciación de numerosos procesos del desarrollo de las plantas, incluida la embriogénesis (Bárány *et al*., 2010; Rodríguez-Sanz *et al*., 2014; Solís *et al*., 2016; Corredoira *et al*., 2017). Las enzimas PME y sus inhibidores endógenos, PMEI, se expresan de forma ubicua en plantas superiores (Jolie *et al*., 2010), habiéndose identificado grandes familias de genes PME y PMEI en distintas especies tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas (Wang *et al*., 2013; Lee, 2017). Sin embargo, aún se desconoce la funcionalidad de estas modificaciones de las pectinas en la remodelación de la pared celular de distintos procesos y tipos celulares. Hay muy poca información disponible sobre las PME y PMEI de árboles. Para llevar a cabo los análisis de expresión de PME en *Quercus suber* se seleccionó una secuencia génica que contenía el dominio catalítico PME, la cual presentaba una alta homología con las secuencias de PME de otras especies de plantas, a la que se denominó *QsPME*. Del mismo modo, a la hora de seleccionar una secuencia PMEI, se escogió aquella que contenía un dominio inhibidor de PME y ausencia de un dominio PME.

Los resultados obtenidos en esta tesis han revelado cambios en los patrones espacio-temporales de distribución de pectinas esterificadas y desesterificadas durante el proceso de embriogénesis somática, los cuales correlacionan a su vez con la dinámica de la actividad PME así como con la expresión de genes que codifican para PME y PMEI.

En las primeras etapas de la embriogénesis somática destaca la abundancia de pectinas esterificadas en la pared celular de las masas proembriogénicas, las cuales experimentan un proceso de desesterificación a medida que avanza el desarrollo del embrión, especialmente en el caso de las células con mayor grado de diferenciación como son las células epidérmicas. Este proceso de desesterificación de pectinas correlaciona con una menor actividad de las enzimas PMEs, así como con una menor expresión génica de *QsPME* y una mayor expresión de *QsPMEI* a medida que avanza el proceso de embriogénesis, habiéndose observado esta dinámica en los tres sistemas estudiados.

Los perfiles de expresión obtenidos para *PME* y *PMEI* mostraron la implicación de ambos genes en la regulación de la embriogénesis tanto somática como de microsporas. En alcornoque, *QsPME* se expresó desde etapas tempranas, en masas proembriogénicas, y aumentó significativamente su expresión a medida que avanzaba la embriogénesis, en embriones corazón, torpedos y cotiledonares. Por el contrario, el gen *QsPMEI* tan solo se expresó en masas proembriogénicas, reprimiéndose su expresión en las etapas más avanzadas de diferenciación embriogénica. El análisis de estos mismos genes en *B. napus* y *H. vulgare* reveló un patrón análogo de expresión al observado durante la embriogénesis somática de *Q. suber*. Los resultados mostraron niveles bajos de expresión de *PME* al inicio de la embriogénesis, en la fase de proembrión, y un aumento progresivo de los niveles de transcripción del gen a medida que avanzaba el desarrollo, obteniéndose los valores más altos en embriones cotiledonares (colza) y coleoptilares (cebada), mientras que el gen *PMEI* tan solo se expresó en la fase de proembrión. Esta diferencia temporal en la expresión de *PME* y *PMEI* se ha propuesto como el principal mecanismo de regulación de la actividad PME (Jolie *et al*., 2010). En esta tesis, el ensayo de actividad PME en alcornoque mostró un aumento progresivo de la misma a lo largo de la embriogénesis somática, lo cual correlaciona con el perfil de expresión de *PME*. Todos estos datos permiten plantear la hipótesis de que, durante el inicio de la embriogénesis, PMEI podría actuar inhibiendo la actividad PME y las pectinas de la pared celular se encontrarían, en su mayoría, en un estado altamente esterificado. Por el contrario, en etapas posteriores de la embriogénesis, la expresión de *PMEI* se encontraría reprimida, permitiendo la actividad PME y la desesterificación de pectinas que acompaña a la diferenciación del embrión.

De acuerdo con estos resultados, los ensayos de inmunolocalización revelaron que la pared celular de las masas proembriogénicas de alcornoque mostraban una señal muy intensa de pectinas esterificadas y una señal muy baja o prácticamente nula de pectinas desesterificadas, indicando una presencia predominante de pectinas altamente esterificadas en las etapas iniciales de la embriogénesis somática.

Estudios previos han revelado la presencia de altas proporciones de pectinas esterificadas como marcadores de células proliferativas, localizadas en meristemos radiculares y en proembriones tempranos procedentes de microsporas, en *Capsicum annum* y *Brassica napus* (Bárány *et al*., 2010; Solís *et al*., 2016), así como en embriones tempranos derivados de microsporas en *Q. suber* (Rodríguez-Sanz *et al*., 2014). Las masas proembriogénicas se caracterizan por su capacidad de proliferar e iniciar la formación de embriones. Los resultados de esta tesis en masas proembriogénicas de alcornoque indicaron que las etapas proliferativas tempranas que caracterizan el inicio de la embriogénesis somática están asociadas con una baja actividad PME y altos niveles de pectinas esterificadas.

En etapas avanzadas de la embriogénesis somática, en embriones en diferenciación, se detectaron tanto pectinas esterificadas como desesterificadas en la mayoría de las células del embrión, con distinto grado de intensidad, lo que sugiere que existen niveles y proporciones variables de desesterificación en la pared celular durante el desarrollo del embrión. De forma general, tal y como indican los resultados de inmuno *dot blot* e inmunofluorescencia, los embriones en diferenciación mostraron mayor intensidad de señal para pectinas desesterificadas que para pectinas esterificadas, lo que indica que la progresión del desarrollo embrionario está acompañada por un proceso de desesterificación de pectinas. Trabajos previos llevados a cabo en otros procesos del desarrollo de tejidos reproductivos en alcornoque, en los que también se utilizaron técnicas de inmunolocalización con el anticuerpo JIM7, revelaron la presencia de pectinas esterificadas en todas las fases del desarrollo del polen (Costa *et al*., 2015a), así como en tejidos femeninos no fertilizados (Lopes *et al*., 2016), sin embargo, estos estudios no aportan datos sobre la actividad enzimática o expresión de PME o PMEI.

Cabe destacar que el tejido epidérmico en diferenciación de embriones somáticos de alcornoque en fase corazón, torpedo y cotiledonar mostró una proporción muy

elevada de pectinas desesterificadas, mientras que apenas se detectaron pectinas desesterificadas en este tejido, un patrón que también pudo observarse en distintos estadios de embriones en diferenciación de *B. napus* y *H. vulgare*. En muchas especies se ha observado este descenso en la metilesterificación de pectinas en tejidos que se van diferenciando con el desarrollo (Jolie *et al*., 2010). Estudios previos han demostrado que hay expresión de varias PMEs durante la formación y germinación del grano de polen, el desarrollo de la silicua y la germinación de semillas en *Arabidopsis* (Louvet *et al*., 2006; Müller *et al*., 2013; Leroux *et al*., 2015), así como durante la embriogénesis cigótica y de microsporas de *B. napus* (Solís *et al*., 2016), donde el incremento de la actividad PME y la desesterificación de pectinas se consideran factores cruciales en el cambio de las propiedades de la pared celular para la diferenciación del embrión.

Los resultados obtenidos en *Q. suber, B. napus* y *H. vulgare* muestran una dinámica similar de actividad PME y del estado de desesterificación de pectinas durante la progresión de la embriogénesis, lo que puede indicar que la expresión de *PME* e inhibidores de PME (*PMEI*) contribuyen a la regulación temporal de las propiedades biomecánicas de la pared celular a través del balance entre pectinas esterificadas y desesterificadas en todos los sistemas embriogénicos estudiados.

En esta tesis se han llevado a cabo análisis funcionales con catequina PP60, un conocido inhibidor de la actividad PME (Lewis *et al*., 2008), con la finalidad de analizar el papel de la PME durante la embriogénsis somática de *Q. suber* y la embriogénsis de microsporas de *B. napus*. La inhibición de la actividad PME mediante el tratamiento de cultivos con catequina PP60 afectó al desarrollo impidiendo la diferenciación del embrión. Sin embargo, el tratamiento con el inhibidor no afectó ni a la proliferación de masas proembriogénicas en *Q. suber* ni al inicio de la embriogénesis en los cultivos de *B. napus*.

Durante el inicio de la organogénesis en *Arabidopsis*, la auxina regula la rigidez de la pared celular, proceso que requiere de la desesterificación de pectinas (Peaucelle *et al*., 2011; Braybrook y Peaucelle, 2013) y que está controlado por el equilibrio entre la actividad de PME y PMEI (Jolie *et al*., 2010). Se ha visto en *Arabidopsis* que los hipocótilos y tallos de las inflorescencias muestran un gradiente en la tasa de crecimiento, con tasas más altas de expansión celular cerca del ápice y menores en las células cercanas a la

base y, en relación a ello, se ha detectado un gradiente de pectinas a lo largo del eje del tallo, observándose que las células de expansión más rápida presentaban una gran cantidad de pectinas esterificadas, mientras que en las células basales de expansión más lenta predominan pectinas desesterificadas (Phyo *et al*., 2017). Del mismo modo se ha demostrado que la sobreexpresión del gen *PME* produce un cese de la expansión celular, inhibiendo el crecimiento del hipocótilo en *Arabidopsis*, lo cual indica que el grado de esterificación de las pectinas puede estar determinando el crecimiento de distintos órganos y tejidos (Derbyshire *et al*., 2007).

Los resultados obtenidos de los ensayos de inhibición con catequina PP60, junto con los resultados de expresión de *PME* y *PMEI*, la actividad PME, los experimentos de inmuno *dot blot* y la localización de pectinas esterificadas y desesterificadas, apoyan la idea de que la actividad PME y su regulador endógeno PMEI están implicados en el proceso de embriogénesis somática y embriogénesis de la microspora, y que la esterificación de pectinas mediada por PMEs podría ser un factor clave en la diferenciación embriogénica. En conjunto, todos estos resultados han revelado que la desesterificación de pectinas es necesaria para que tenga lugar el correcto desarrollo y diferenciación del embrión de especies tan distintas como el árbol *Q. suber*, la especie hortícola *B. napus* y el cereal *H. vulgare*, lo que induce a pensar en la existencia de un mecanismo de regulación común de remodelación de la pared celular en distintos sistemas embriogénicos, abriendo así nuevas posibilidades de intervención que permitan mejorar la producción *in vitro* de embriones en programas de mejora agroforestal.

5.3.2 El aumento progresivo de AGPs en la pared celular es necesario durante la embriogénesis somática

Las proteínas de arabinogalactano (AGPs) constituyen una clase amplia, compleja y muy diversa de proteínas altamente glicosiladas que forman parte de la pared celular de las plantas, donde desempeñan un papel fundamental en distintos procesos del crecimiento y desarrollo (Ma *et al*., 2018; Silva *et al*., 2020). Cada vez existen más evidencias que demuestran que las AGPs desempeñan un papel importante en el

desarrollo de tejidos reproductivos y del propio desarrollo del embrión (Zhong *et al*., 2011; Geshi *et al*., 2013).

En esta tesis se han analizado los cambios en el perfil temporal y el patrón de distribución de AGPs durante la embriogénesis somática de *Q. suber*, así como la posible implicación de estas macromoléculas en la inducción y desarrollo del embrión somático.

Los resultados obtenidos han revelado una participación activa de las AGPs endógenas a lo largo de la embriogénesis somática del alcornoque, estando presentes desde etapas tempranas y aumentando progresivamente con el desarrollo del embrión somático. Además, estudios funcionales mediante el bloqueo de AGPs, revelaron que estas macromoléculas juegan un papel importante tanto al inicio de la embriogénesis, en eventos de proliferación, como en etapas posteriores de diferenciación del embrión somático.

Las AGPs pertenecen a grandes familias multigénicas que aún no han sido completamente identificadas en muchas especies de plantas. En *Arabidopsis* se han descrito 85 genes que codifican para AGPs (Showalter *et al*., 2010), sin embargo, se dispone de muy poca información sobre los genes de AGPs de plantas no consideradas especies modelo, debido a la estructura tan compleja y heterogénea que presentan estas macromoléculas (Pereira *et al*., 2016; Han *et al*., 2017). Entre las escasas secuencias de AGPs disponibles en la base de datos del alcornoque, en esta tesis se han seleccionado tres secuencias que codifican para dos familias/grupos de AGPs diferentes: *QsLys-rich-AGP17* y *QsLys-rich-AGP18*, que pertenecen al grupo de las AGPs ricas en lisina; y *QsAGP16L1,* que pertenece al grupo de los denominados péptidos AG. Trabajos recientes en *Brassica rapa* y *Arabidopsis* han revelado que genes homólogos a los seleccionados en alcornoque están relacionados con la formación de embriones, lo que sugiere que podrían también expresarse en la embriogénesis somática. Se ha visto expresión de los genes de *AGP17*, *AGP18* y *AGP16* en silicuas (Han *et al*., 2017), además AGP18 ha sido descrito como un gen esencial en la formación del gametofito femenino (Acosta-García y Vielle-Calzada, 2004). La secuencia *QsAGP16L1* (*QsAGP16-like1*) ha sido recientemente identificada y caracterizada en *Q. suber* (Costa *et al*., 2015), demostrándose su homología con el gen *AtAGP16* de *Arabidopsis*, y observándose expresión de este gen durante el desarrollo del polen en las dos especies (Nguema-Ona

et al., 2012; Costa *et al*., 2015). La expresión del gen *AGP18* también se ha detectado en la formación de tejidos reproductivos femeninos (Acosta-García y Vielle-Calzada, 2004), raíces, flores y tallos (Yang *et al*., 2007; Yang y Showalter, 2007), así como en el desarrollo vegetativo y reproductivo del pimiento(Verdugo-Perales *et al*., 2018). Hay muy poca información en cuanto a la expresión de genes de AGPs en la embriogénesis somática. Trabajos previos del grupo han revelado que existe una expresión diferencial del gen *BnAGP-Sta39-4* en etapas tempranas de la embriogénesis de microspora de *Brassica napus* (El-Tantawy *et al*., 2013). Los resultados obtenidos en esta tesis muestran un aumento en los niveles de expresión de los distintos genes de AGPs estudiados (*QsLys-rich-AGP17, QsLys-rich-AGP18* y *QsAGP16L1*) durante la embriogénesis somática, lo que indica que las AGPs están involucradas en el desarrollo de embriones somáticos de alcornoque. En esta tesis también se ha analizado el patrón de expresión génica del gen *HvAGP* de cebada, cuyos niveles de transcripción aumentaron progresivamente a medida que avanzaba el desarrollo embriogénico, mostrando un patrón de expresión temporal análogo al obtenido en la embriogénesis somática de *Quercus suber*.

Los resultados de inmunofluorescencia y ensayos de inmuno *dot blot* revelaron un aumento de los niveles de varios epítopos de AGP durante el proceso de embriogénesis somática. Los resultados de inmunofluorescencia mostraron una localización de AGPs principalmente en las paredes celulares de las masas proembriogénicas y los embriones somáticos. Algunos epítopos de AGP, sobre todo los reconocidos por el anticuerpo LM2, además de estar presentes en las paredes celulares, también se localizaron en pequeños *spots* citoplásmicos. Trabajos previos del grupo han mostrado la localización de antígenos de AGPs en etapas tempranas de la embriogénesis de microsporas de *B. napus* (El-Tantawy *et al*., 2013), mostrando un patrón de distribución del antígeno LM2 análogo al observado en las células de los embriones somáticos de alcornoque, con localización en paredes citoplásmicas y en pequeños *spots* en el citoplasma que se propusieron como subcompartimentos de secreción (El-Tantawy *et al*., 2013). En suspensiones celulares de arroz y zanahoria, el antígeno LM2 fue detectado en las AGPs secretadas al medio de cultivo (Smallwood *et al*., 1996). Además, el antígeno LM2-AGP se ha asociado con estructuras subcelulares de la vía secretora en aquellas células vegetales que secretan AGPs (Šamaj *et al*., 2000). Un estudio reciente ha revelado que, en los cultivos

de embriogénesis somática de algodón, los callos embriogénicos son capaces de producir y secretar AGPs, y cuando estas AGPs se incorporan al medio de cultivo, se promueve la embriogénesis somática (Poon *et al*., 2012). Los patrones de localización de AGPs en la embriogénesis somática del alcornoque observados en esta tesis mediante ensayos de inmunofluorescencia, muestran que las AGPs están principalmente localizadas en la pared celular, además de ser posiblemente secretadas al apoplasto y/o medio de cultivo durante el proceso, tal y como se ha visto en otros sistemas de embriogénesis *in vitro*.

Los análisis funcionales en los que se bloquearon AGPs por precipitación con el reactivo β-Glucosyl-Yariv, revelaron que la inactivación de AGPs afecta al proceso de embriogénesis somática en *Q. suber*, respaldando la idea de que estas macromoléculas tienen un papel activo durante el proceso. El bloqueo de AGPs por el reactivo Yariv afectó al proceso de embriogénesis desde etapas tempranas, reduciendo las tasas de inicio de la embriogénesis, y también actuó inhibiendo el posterior proceso de diferenciación embriogénica. Estos resultados indican que las AGPs están involucradas a lo largo del desarrollo del embrión, requiriéndose tanto en el inicio como en la progresión de la embriogénesis somática del alcornoque. Los reactivos Yariv han sido descritos como compuestos citoquímicos fiables para el estudio funcional de las AGPs, habiéndose utilizado en numerosos estudios (Seifert y Roberts, 2007; Ma *et al*., 2018; Silva *et al*., 2020). La capacidad de los reactivos Yariv para inactivar AGPs de forma específica ha permitido identificar el papel que juegan estas macromoléculas en distintos sistemas de embriogénesis *in vitro*. Por ejemplo, en el inicio y la progresión de la embriogénesis *in vitro* de microsporas de *B. napus* (Tang *et al*., 2006) o en la embriogénesis cigótica *in vitro* del tabaco (M. Yu y Zhao, 2012). La unión específica y estable entre las AGPs y el reactivo β-Glucosyl-Yariv sugiere que las AGPs endógenas podrían ser secuestradas por pectinas mediante una interacción análoga a la observada con el reactivo Yariv que tendría lugar en la pared celular, entre las macromoléculas de AGPs y el domino β-galacturonano de las pectinas, una unión que ya se ha observado en varios sistemas y que podría modular las propiedades mecánicas de la matriz de pectinas (Seifert y Roberts, 2007; Liao *et al*., 2011).

Los resultados obtenidos en esta tesis han permitido demostrar que las AGP juegan un papel clave en la embriogénesis somática del alcornoque desde etapas tempranas del desarrollo, aumentando su acumulación en paredes celulares a medida que avanza el desarrollo del embrión, lo que indica también su implicación en el proceso de diferenciación y maduración del embrión somático. Además, los resultados de expresión de AGP en cebada junto con resultados previos del laboratorio, mostraron patrones temporales de estas macromoléculas similares en ambos desarrollos embriogénicos, sugiriendo una posible conservación de mecanismos y factores reguladores de la remodelación de la pared celular implicados en la embriogénesis *in vitro* en distintas especies.

5.4 PAPEL DE LA AUTOFAGIA Y DE PROTEASAS ESPECÍFICAS EN LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR ESTRÉS AL INICIO DE LA EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS DE CEBADA

En la embriogénesis de microsporas, el estrés inductor necesario para la reprogramación e inicio de la embriogénesis produce elevados niveles de muerte celular, lo cual conlleva un menor rendimiento del proceso. El poder reducir estos niveles de muerte supondría un punto de actuación clave para mejorar la eficiencia de la inducción embriogénica en los cultivos. Múltiples estudios han demostrado la implicación de la autofagia y de ciertas proteasas en varios procesos de muerte celular programada en plantas (Díaz-Mendoza *et al*., 2014; Velasco-Arroyo *et al*., 2016; Havé *et al*., 2018), entre ellos en la embriogénesis de microsporas (Bárány *et al*., 2018; Berenguer, 2020). Sin embargo, aún se desconoce el papel preciso que juegan estos mecanismos en la regulación del proceso de muerte celular durante el inicio de la embriogénesis. Los resultados obtenidos en esta tesis aportan nuevas evidencias sobre la implicación de la autofagia y la actividad proteolítica de cisteín proteasas en el proceso de muerte celular que tiene lugar tras la aplicación del tratamiento de estrés inductor en la embriogénesis de microsporas de cebada.

Recientemente, la utilización de pequeñas moléculas bioactivas de síntesis química ha revelado resultados prometedores en cuanto a su efecto sobre la viabilidad celular, la reprogramación y el desarrollo en distintas especies de plantas (Hicks y Raikhel, 2012; Chuprov-Netochin *et al*., 2016; Testillano, 2019). En esta tesis se han llevado a cabo una serie de análisis funcionales mediante el uso de pequeñas moléculas inhibidoras de especies reactivas del oxígeno (ROS), del proceso de autofagia y de diversas proteasas con el fin de evaluar su posible participación en los eventos de muerte celular que tienen lugar como consecuencia de aplicar el estrés inductor para la reprogramación de las microsporas de *H. vulgare* hacia una ruta embriogénica.

Los resultados obtenidos en esta tesis han mostrado que, tras aplicar el estrés inductor, hay un aumento significativo de los niveles de muerte celular en microsporas de cebada. Asimismo, el uso de inhibidores de ROS, autofagia y proteasas en el medio de cultivo supuso una reducción de los niveles de muerte celular y un incremento de la tasa de inducción embriogénica.

Varios estudios han demostrado que el estrés aplicado para inducir la reprogramación a embriogénesis de las microsporas implica un estrés oxidativo a nivel celular y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Zur *et al*., 2009; Rodríguez-Serrano *et al*., 2012). Mediante el uso de sondas fluorescentes específicas de ROS y una posterior cuantificación de la intensidad de fluorescencia se ha visto que después de aplicar el estrés, tiene lugar una elevada producción de ROS en las microsporas aisladas de cebada (Rodríguez-Serrano *et al*., 2012) Cada vez más evidencias relacionan la autofagia y la producción de ROS en plantas y algas (Pérez-Pérez *et al*., 2012), además, se sabe que la autofagia desempeña un papel de eliminación de proteínas y orgánulos dañados que pueden ser resultado de la acumulación de ROS. En un trabajo reciente del grupo se ha observado que, tras aplicar el estrés inductor en las microsporas de cebada, además de haber una elevada producción de ROS, también hay una activación de la autofagia e inducción de la actividad de proteasas específicas (particularmente de catepsinas o PLCPs (*Papain-like cysteine proteases*) y proteasas con actividad caspasa 3-*like*) (Bárány *et al*., 2018). Estos resultados indican que el estrés inductor necesario para que tenga lugar la reprogramación embriogénica de las microsporas, conduce a la producción de ROS y desencadena un proceso de muerte celular en la que están implicadas la autofagia y las PLCPs.

En esta tesis se han llevado a cabo análisis funcionales al inicio de la embriogénesis de microsporas de cebada mediante la aplicación de determinados compuestos bioactivos de bajo peso molecular en medio de cultivo. Estos compuestos orgánicos de bajo peso molecular (<1000 Daltons), nombrados a menudo como *small molecules*, son de gran utilidad en farmacología, ya que sus propiedades de permeabilidad celular, su unión específica a macromoléculas biológicas y su capacidad para alterar una actividad concreta, son de gran utilidad a la hora de estudiar procesos biológicos. En la actualidad hay varios inhibidores de ROS, autofagia y proteasas disponibles comercialmente para ensayos *in vitro*, habiéndose demostrado la eficacia en plantas de muchos de ellos (Rodríguez-Serrano *et al*., 2009; Avin-Wittenberg *et al*., 2018). En esta tesis se han realizado tratamientos con los siguientes compuestos: $MnCl_2$ (inhibidor de ROS), concanamicina A (inhibidor de autofagia), E64d, leupeptina y Ac-DEVD-CHO (inhibidores

de distintas proteasas relacionadas con procesos de muerte celular), evaluando sus efectos sobre los niveles de muerte celular y sobre la inducción embriogénica.

Los resultados obtenidos mostraron que el secuestro de ROS por el compuesto $MnCl_2$, el cual elimina específicamente los aniones superóxido, redujo significativamente el porcentaje de muerte celular. Este efecto del tratamiento correlaciona con lo observado en trabajos previos realizados en embriogénesis de microsporas de colza con $MnCl_2$ (Berenguer, 2020) y en estudios de captación de peróxido de hidrógeno con ascorbato (Rodríguez-Serrano *et al*., 2012), donde también se observó una reducción similar en los niveles de muerte celular. Además, la producción de proembriones formados en cultivos de microsporas de cebada tratados con el inhibidor $MnCl_2$ también fue significativamente mayor en comparación con los cultivos control. Estos resultados indican un efecto positivo del inhibidor de ROS, $MnCl_2$, sobre el inicio de la embriogénesis, probablemente como consecuencia directa de la reducción de los niveles de muerte celular.

Los resultados obtenidos al tratar los cultivos con los inhibidores de autofagia concanamicina A y E64d mostraron también una disminución de la muerte celular en microsporas sometidas al estrés térmico, lo que a su vez se tradujo en un mayor porcentaje de embriones. La concanamicina A y el E64d son pequeños compuestos que se utilizan comúnmente para inhibir el proceso autofágico en plantas mediante distintos mecanismos. La concanamicina A inhibe la degradación del cargo autofágico mediante la alcalinización de la vacuola, lo cual produce la inactivación de sus enzimas líticas que actúan a pH ácido (Matsuoka *et al*., 1997), mientras que el E64d es un conocido inhibidor de cisteín proteasas y actúa por tanto reduciendo la degradación del contenido de los autofagosomas en las vacuolas llevada a cabo por estas enzimas (Bassham, 2007, 2015; Moriyasu e Inoue, 2008). Estos tratamientos se han utilizado para bloquear la degradación del autofagosoma en diversos cultivos *in vitro* de tejidos vegetales y células en suspensión (Matsuoka *et al*., 1997; Sláviková *et al*., 2005; Moriyasu e Inoue, 2008; Shin *et al*., 2014; Bassham, 2015; Yano *et al*., 2015). En cultivos de microsporas, se ha visto que al añadir E64d o concanamicina A al medio de cultivo se reduce la degradación de los autofagosomas y éstos se acumulan en la célula, observándose un mayor número de microsporas con estructuras autofágicas en el citoplasma y un mayor número de

autofagosomas por célula, lo cual además indica la existencia de flujo autofágico, con una alta tasa de formación de autofagosomas en las microsporas tras aplicar el estrés inductor (Bárány *et al*., 2018).

Nuestros resultados muestran que la inhibición de autofagia reduce los niveles de muerte celular. Como consecuencia de esta disminución en la muerte celular, también aumenta la inducción de la embriogénesis. Dado que se ha descrito que la autofagia cumple también una función de supervivencia frente a situaciones de estés, no se puede descartar la posibilidad de que la autofagia también juegue un papel pro-supervivencia en algunas células del cultivo, tras el estrés.

El tratamiento de los cultivos de microsporas con leupeptina, otro inhibidor de proteasas que actúa inhibiendo la actividad proteolítica de cisteín y serín proteasas, mostró un efecto similar, reduciendo el porcentaje de muerte celular tras el estrés inductor, lo cual apoya la implicación de proteasas de estos grupos en el proceso de muerte.

En los últimos años se ha demostrado que los tratamientos de estrés térmico necesarios para la inducción embriogénica también activan a proteasas con actividad similar a la caspasa 3 (caspasa 3-*like*) (Rodríguez-Serrano *et al*., 2012; Berenguer, 2020). Ac-DEVD-CHO (N-Acetil-Asp-Glu-Val-Asp-al) es un tetrapéptido sintético que ha demostrado ser un inhibidor competitivo altamente específico de la actividad caspasa 3 en animales (Swe y Sit, 2000). En plantas, varios trabajos han demostrado que el tratamiento con Ac-DEVD-CHO es capaz de reducir la actividad enzimática caspasa 3-*like* que tiene lugar en procesos de muerte celular programada de distintos sistemas vegetales (Ge *et al*., 2016; Sinha *et al*., 2016), datos que correlacionan con el efecto observado en esta tesis al tratar los cultivos de cebada con el inhibidor Ac-DEVD-CHO, en los cuales se observó un menor porcentaje de muerte celular y mayor número de proembriones que en los cultivos control. Datos recientes obtenidos en cultivos de microsporas de colza con los inhibidores $MnCl_2$, concanamicina A, E64d, leupeptina y Ac-DEVD-CHO, han mostrado efectos similares a los obtenidos en cebada, observándose un descenso de los niveles de muerte y un aumento de la tasa de inducción embriogénica en los cultivos tratados, en comparación con los no tratados (Berenguer *et al*., 2019; Berenguer, 2020).

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis demuestran los efectos positivos de distintos compuestos inhibidores de ROS ($MnCl_2$), autofagia (concanamicina A) y de la actividad de distintas proteasas (E64d, leupeptina y Ac-DEVD-CHO) sobre la viabilidad de las microsporas y la obtención de proembriones durante la embriogénesis de microsporas inducida por estrés en la especie monocotiledónea *H. vulgare*. Además, el hecho de que recientemente se hayan observado efectos similares con estos inhibidores en cultivos de microsporas de la especie dicotiledónea *B. napus* indica que, independientemente del estrés aplicado para inducir la embriogénesis (frío (4^{o}C) en cebada o calor (32^{o}C) en colza), estos tratamientos con inhibidores actúan disminuyendo la muerte celular inducida por el estrés y mejorando el porcentaje de inducción embriogénica en ambas especies (Tabla 22), lo cual sugiere que existen mecanismos de muerte inducida por estrés comunes en ambos grupos de plantas.

Estos hallazgos también indican que estrategias similares, empleando *small molecules* dirigidas a inhibir ROS, autofagia y proteasas, podrían extenderse a otras especies y sistemas de embriogénesis inducidos por estrés para mejorar la viabilidad de los cultivos, lo que abriría nuevas vías de intervención con pequeños compuestos bioactivos para mejorar el rendimiento de los sistemas de embriogénesis *in vitro* mediante la reducción de muerte celular. Además, el hecho de poder acceder a bibliotecas químicas en busca de pequeñas moléculas bioactivas capaces de modular la actividad enzimática que subyace al proceso de muerte celular contribuiría al desarrollo biotecnológico de nuevas estrategias para mejorar el rendimiento de los sistemas *in vitro* para su aplicación en programas de mejora y conservación de especies de interés agroforestal.

Tabla 22. Tabla resumen del efecto de los distintos tratamientos con inhibidores en la embriogénesis de microsporas de *H. vulgare* y *B. napus*. Esta tabla integra tanto los datos obtenidos en esta tesis doctoral en *H. vulgare* como datos de publicaciones previas del grupo en *B. napus*.

		Efecto en la embriogénesis de microsporas			
		Efecto en la muerte celular		Efecto en el inicio de la embriogénesis (proembriones)	
Inhibidor	**Diana**	***H. vulgare***	***B. napus***	***H. vulgare***	***B. napus***
$MnCl_2$	ROS	↓	↓	↑	↑
Concanamicina A	Bomba de protones vacuolar	↓	↓	↑	↑
E-64d	Cisteín proteasas	↓	↓	↑	↑
Leupeptina	Serín y cisteín proteasas	↓	↓	↑	↑
Ac-DEVD-CHO	Caspasa 3	↓	↓	↑	↑

5.5 PAPEL DE LAS PLCPs Y LA AUTOFAGIA EN LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA DEL TAPETUM DE CEBADA

El estudio realizado en esta tesis sobre la muerte celular inducida por estrés durante la embriogénesis de microsporas de cebada ha revelado la implicación de la autofagia y proteasas específicas en este proceso de muerte. Complementariamente, se ha llevado a cabo un estudio en mayor profundidad sobre otro proceso de muerte celular que tiene lugar durante el desarrollo de la microspora y el polen, la muerte celular programada del tapetum.

El tapetum es un tejido especializado que se encuentra en el interior de la antera, donde desempeña un papel clave proporcionando nutrientes y moléculas reguladoras para la formación de las microsporas y el desarrollo del grano de polen (Wilson y Zhang, 2009; Ariizumi y Toriyama, 2011; Zhang *et al*., 2011). A medida que avanza el desarrollo del polen, el tapetum entra en un proceso de muerte celular programada (MCP) que conduce a una degeneración progresiva de sus células, un proceso que está estrictamente regulado y es necesario para que el polen se desarrolle correctamente. La MCP es un proceso activo y controlado genéticamente que participa en la eliminación de células y tejidos específicos durante el desarrollo. Múltiples estudios han descrito que la alteración del proceso de MCP del tapetum repercute en un desarrollo anormal del polen ligado a la esterilidad del mismo, acarreando por consiguiente defectos en la fertilidad de la planta (Pacini *et al*., 1985; Shivanna, 2003; Vizcay-Barrena y Wilson, 2006; Zhang *et al*., 2011 Radchuk *et al*., 2012; Shi *et al*., 2015). Sin embargo, a pesar de la importancia del tapetum durante el desarrollo del polen, aun hoy en día se desconocen en gran medida los mecanismos que regulan el proceso de MCP de este tejido.

Numerosos estudios han demostrado la implicación de la autofagia y de cisteín proteasas en distintos procesos de MCP en plantas (Pak y van Doorn, 2005; Bozhkov y Jansson, 2007; Minina *et al*., 2013, 2014; Yang y Bassham, 2015; Bárány *et al*., 2018; Berenguer, 2020). En esta tesis se ha analizado la posible participación de la autofagia y de cisteín proteasas de tipo papaína (PLCPs o catepsinas) durante el proceso de MCP del tapetum en la especie *Hordeum vulgare*, a través de un enfoque multidisciplinar. Los resultados obtenidos revelaron que existe una activación a nivel transcripcional y

proteico tanto de la maquinaria autofagica como de las PLCPs en el tapetum en MCP, lo cual sugiere la participación de ambas en la ejecución del proceso de muerte celular.

En primer lugar, se llevó a cabo una caracterización a nivel celular del proceso de MPC del tapetum en anteras de *H. vulgare*. Los ensayos de inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-RNA y el análisis microscópico de secciones teñidas con azul de toluidina permitieron caracterizar por primera vez en el tapetum de cebada los principales cambios estructurales que tienen lugar durante la MCP de este tejido. Estos datos revelaron como a medida que avanza el desarrollo del polen, las células tapetales tienen cada vez una menor actividad transcripcional, pierden su forma geométrica y sus núcleos, cada vez más pequeños, van perdiendo su forma redondeada y adquieren una forma alargada con una cromatina muy condensada. Finalmente, una vez que el grano de polen alcanza el estadio de madurez, la actividad nutricional de este tejido deja de ser necesaria y el tapetum desaparece prácticamente por completo. Estas características observadas en las células del tapetum de cebada durante el proceso de MCP se asemejan a las descritas previamente en las células del tapetum de otras monocotiledóneas como el lirio, el arroz, el puerro y el ajo (Varnier *et al*., 2005; Li *et al*., 2006; Tchórzewska *et al*., 2018) y de dicotiledóneas como el tabaco y la colza (Solís *et al*., 2014; Berenguer, 2020), así como en otros procesos MCP del desarrollo de plantas angiospermas (Gunawardena *et al*., 2004; Reape *et al*., 2008; Locato y De Gara, 2018), lo cual indica la conservación e importancia de este mecanismo a nivel evolutivo en plantas superiores. Una vez caracterizados los cambios a nivel celular durante la MCP del tapetum, se procedió a evaluar la posible implicación de la autofagia y de la actividad de proteasas específicas durante el proceso.

La autofagia es la ruta catabólica más importante implicada en el reciclaje de materiales celulares, con muchas y distintas funciones que entran en juego bajo condiciones de estrés o durante procesos específicos del desarrollo (Hofius *et al*., 2017; Masclaux-Daubresse *et al*., 2017; Avin-Wittenberg *et al*., 2018). En plantas se ha demostrado que la autofagia juega un importante papel promoviendo la supervivencia celular en condiciones de déficit de nutrientes y condiciones de estrés, así como en el inicio y/o durante la ejecución de eventos de muerte celular (Minina *et al*., 2013, 2014; Avin-Wittenberg *et al*., 2018).

Dentro de la maquinaria autofágica destaca el papel de dos proteínas ATG (*Autophagy-related genes*), ATG5 y ATG8, ambas consideradas marcadores autofágicos clave en el estudio del proceso de autofagia (Liu y Bassham, 2012). Se ha descrito que ATG8 permanece en la membrana del autofagosoma durante todo el proceso autofágico, lo que le convierte en un marcador específico para la localización de autofagosomas a nivel celular (Lamb *et al*., 2013), mientras que ATG5 juega un papel esencial en la lipidación de ATG8 y posterior formación del autofagosoma (Minina *et al*., 2018). En *Arabidopsis* se han descrito 9 isoformas para el gen ATG8 (ATG8a-ATG8i) y una única isoforma de ATG5 (Liu y Bassham, 2012), mientras que en cebada también se ha identificado una sola isoforma para ATG5 y 3 isoformas de ATG8 (ATG8_1-ATG8_3) (Avila-Ospina *et al*., 2016).

En esta tesis se ha analizado la localización de las proteínas ATG5 y ATG8 y la expresión de los genes *HvATG5* y *HvATG8_1* en las fases de tapetum activo y tapetum en MCP. Los resultados obtenidos han mostrado que una vez que el tapetum entra en MCP hay una mayor acumulación de ambas proteínas en las células tapetales, localizadas en spots citoplásmicos compatibles con estructuras autofágicas, y un aumento significativo de los niveles de expresión tanto del gen *HvATG5* como de *HvATG8_1*. Estos resultados indican que existe una activación de la maquinaria autofágica una vez que las células del tapetum entran en el proceso de muerte celular.

Estos resultados correlacionan con los datos obtenidos en otros trabajos donde se estudia la relación entre la autofagia y la MCP en distintos procesos del desarrollo de la planta, donde también se observa un aumento de expresión de genes ATG, entre ellos *ATG5* y *ATG8*, así como una mayor acumulación de estas y otra proteínas de ATG en distintas especies, tal y como recopila la revisión de (Qi *et al*., 2021). Aunque los estudios sobre la participación de la autofagia en la degradación del tapetum son muy escasos, se ha visto que en plantas mutantes atg7 de arroz la degradación de las células del tapetum mediante MCP no termina de completarse, lo cual se traduce en una esterilidad de los granos de polen (Kurusu *et al*., 2014) y demuestra la importante participación de la autofagia en la MCP del tapetum.

A lo largo de la vida de la planta tienen lugar múltiples eventos de reciclaje de nutrientes donde hay una degradación de macromoléculas y orgánulos, generalmente

en órganos senescentes o dañados que ya no son útiles para la planta, y una movilización de los mismos hacia nuevos órganos en crecimiento y sumideros como por ejemplo las semillas. Además, se ha visto que, si las pantas están sometidas a algún tipo de estrés, estos procesos de reciclaje se incrementan, lo que conlleva ocasionalmente al sacrificio de partes sanas de la planta en beneficio de la supervivencia del conjunto del individuo. Se ha demostrado que existe una regulación positiva de varios genes ATG durante la MCP que subyace al reciclaje de nutrientes, haciendo especial mención al aumento de la actividad transcripcional de ATG8, en múltiples ensayos de déficit de nutrientes y tolerancia al estrés (Zhou *et al*., 2014; Ryabovol y Minibayeva, 2016; Masclaux-Daubresse *et al*., 2017; Chen *et al*., 2019). También se ha demostrado la importancia de ATG5, utilizando mutantes carentes de este gen que resultaron ser más sensibles a la falta de nutrientes, demostrando la participación activa de ATG5 en el reciclaje de nutrientes bajo condiciones de estrés (Mukae *et al*., 2015). Otro proceso en el cual está implicada la autofagia y que ya se ha comentado en esta tesis es el proceso de muerte celular inducido por el estrés inductor de la reprogramación embriogénica de las microsporas. Estudios llevados a cabo en *B. napus* y *H. vulgare* han revelado que el tratamiento de estrés inductor, de 4^{o}C en cebada y 32^{o}C en colza, para inducir la embriogénesis, conduce a la activación de la maquinaria autofágica. En ambos casos, el marcado con los anticuerpos ATG5 y ATG8 mostró un aumento del número de autofagosomas en aquellas microsporas que habían sido sometidas al estrés, observándose también un aumento en los niveles de transcripción de los genes de autofagia *ATG5* y *ATG6* en las dos especies (Bárány *et al*., 2018; Berenguer *et al*., 2021).

En los eventos de muerte celular programada interviene una compleja maquinaria proteolítica en la que participan una gran cantidad de proteasas. Se ha demostrado que muchas de estas enzimas proteolíticas desempeñan funciones clave tanto en la autofagia como en los distintos procesos de muerte celular (van der Hoorn y Rivas, 2018). Las proteasas con actividad proteolítica más abundantes en plantas son las cisteín proteasas de tipo papaína (PLCPs, *Papain-like Cysteine Proteases*), clasificadas dentro de la subfamilia C1A del clan CA y homólogas a las catepsinas de animales (Rawlings *et al*., 2010). En animales, las catepsinas son proteínas lisosomales con un papel clave en la autofagia y la muerte celular (Turk y Stoka, 2007) y, aunque en plantas

aún no se ha probado que las PLCPs estén implicadas en la autofagia, si se han relacionado con eventos de muerte celular programada (Zhao *et al*., 2000; Diaz-Mendoza *et al*., 2016; Cai *et al*., 2018;) y se ha detectado su actividad proteolítica en situaciones de estrés tanto abiótico (Rabbani *et al*., 2003; Velasco-Arroyo *et al*., 2016; Bárány *et al*., 2018) como biótico (Misas-Villamil *et al*., 2016). El genoma de las plantas codifica para más de 800 proteasas, de entre las cuales más de 140 pertenecen al grupo de las cisteín proteasas, agrupadas a su vez dentro de 15 familias, en 5 clanes (Díaz-Mendoza *et al*., 2014). Las PLCPs ha sido clasificada en base sus propiedades estructurales en 9 clases, que a su vez se agrupan en 4 tipos diferentes: tipo L, F, H o B, según su homología con catepsinas de humanos (Richau *et al*., 2012). Dentro de las 41 catepsinas descritas en cebada: 30 de ellas son catepsinas de tipo L (HvPap4-11, HvPap13-18, HvPap21-23, HvPap25-29, HvPap33-38, HvPap40-41), 3 pertenecen al tipo F (HvPap1-3), 1 al tipo H (HvPap12), 3 al tipo B (HvPap19-20 y HvPap30) y otras 4 están aún sin clasificar (HvPap24, HvPap31-32 y HvPap39) (Díaz-Mendoza *et al*., 2014). De entre todas ellas, las que han mostrado una mayor actividad proteolítica en distintos estudios llevados a cabo en cebada han sido HvPap1, HvPap6, HvPap12 y HvPap19 (Díaz-Mendoza *et al*., 2014; Velasco-Arroyo *et al*., 2016; Havé *et al*., 2018).

En esta tesis se ha estudiado la dinámica de actividad, expresión génica y proteica de PLCPs durante la MCP del tapetum mediante un abordaje multidisciplinar con técnicas tan potentes como el ABPP (*activity based protein profiling*) y el análisis proteómico. Los resultados obtenidos al analizar el perfil de PLCPs activas mediante la técnica ABPP con DCG-04, un compuesto que se une con alta afinidad a la forma activa de cisteín proteasas, reveló una mayor acumulación de las formas activas de PLCPs en el tapetum en MCP, en comparación con el perfil observado en la fase de tapetum activo. También se llevaron a cabo experimentos de inmunoprecipitación por afinidad o *pull-down* con DCG-04 que, además de reforzar el resultado observado con la técnica de ABPP, permitió aislar y purificar las PLCPs activas presentes en el tapetum en MCP para posteriormente llevar a cabo un análisis proteómico de las bandas e identificar estas PLCPs activas presentes en el tapetum en MCP. Dentro de la lista de PLCPs activas detectadas en el análisis proteómico mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS), cabe destacar la identificación de

las proteasas homólogas a *Arabidopsis* RD21A, RD21B (Hvpap-6), SAG12 y RD19A (Hvpap-1). Múltiples estudios han descrito la participación de estas PLCPs en procesos de senescencia (Gepstein *et al*., 2003; Pružinská *et al*., 2017), y la participación de RD19A también durante la germinación de semillas (Liu *et al*., 2018). El haber identificado PLCPs activas homologas a *Arabidopsis* en el tapetum de cebada en MCP, sugiere firmemente la participación de estas proteasas en el proceso de muerte celular del tapetum de *H. vulgare*.

También se ha abordado el análisis de expresión génica de *HvPap-1*, *HvPap-6* y *HvPap-19*, tres genes codificantes para PLCPs que destacan especialmente entre otras cisteín proteasas por su elevada actividad proteolítica en numerosos procesos del desarrollo de cebada (Díaz-Mendoza *et al*., 2014; Velasco-Arroyo *et al*., 2016). Los resultados de este análisis mostraron un aumento significativo en los niveles de expresión de las tres secuencias génicas en el tapetum de cebada en MCP, en comparación con los bajos niveles de expresión obtenidos en la fase de tapetum activo, lo cual indica que, además de haber una activación de cisteín proteasas en el momento en que las células del tapetum entran en muerte celular, también tiene lugar la inducción transcripcional de PLCPs implicadas en el proceso de degradación.

Las PLCPs se producen como precursores inactivos o zimógenos, los cuales contienen un predominio autoinhibidor para prevenir la degradación no deseada de proteínas. En el momento en que se requiere la actividad de estas proteasas, se procede a la proteólisis del predominio y la enzima adquiere su forma madura activa (Liu *et al*., 2018). Con la finalidad de analizar y comparar el perfil de formas tanto activas como inactivas de PLCPs en el tapetum activo y el tapetum en MCP, se llevaron a cabo ensayos de *western blot* utilizando tres anticuerpos específicos de PLCPs concretas, las cuales se habían identificado diferencialmente en el tapetum en MCP por el análisis proteómico o por sus elevados niveles de expresión génica: CATB3/Pap-19, RD21A/Pap-6 y SAG12. CATB3/Pap-19, RD21A/Pap-6 y SAG12 son tres de las PLCPs más activas en procesos de muerte celular, detectándose una elevada actividad de las mismas por ejemplo durante la senescencia foliar o la germinación de semillas (Liu *et al*., 2018; Ormancey *et al*., 2019), sin embargo, hasta ahora no se habían relacionado con la MCP del tapetum.

Los resultados de este ensayo revelaron que en la fase de tapetum activo tan solo se detectan las formas inactivas de estas PLCPs, mientras que en la fase de tapetum en muerte celular se detecta una gran cantidad de las formas activas, lo cual indica que existe una activación de estas tres PLCPs en el momento en el que el tapetum de cebada entra en MCP, probablemente porque estas enzimas estén interviniendo en la actividad proteolítica que subyace al proceso de muerte celular. A su vez, estos resultados correlacionan con el aumento en los niveles de PLCPs observado en los ensayos de inmunofluorescencia que se llevaron a cabo utilizando los mismos anticuerpos seleccionados previamente en los ensayos de *western-blot* (anti-Pap-6, anti-Pap-19/CATB3 y anti-SAG12) y el anticuerpo anti-Pap-1, detectándose un aumento de la intensidad de fluorescencia de todos los anticuerpos en la fase de tapetum activo, en comparación con la emisión de una señal prácticamente indetectable de los mismos en la fase de tapetum activo.

Estos resultados correlacionan con ensayos de inmunolocalización previos llevados a cabo en el tapetum de *B. napus*, donde también pudo observarse un aumento en la acumulación de las PLCPs Pap-1, Pap-6 y Pap-19 durante la degradación del tapetum (Berenguer, 2020), lo cual apoya la idea de una participación activa de las PLCPs durante la muerte celular. En otros estudios sobre la degradación del tapetum, se ha demostrado la participación de otras cisteín proteasas, distintas a las PLCPs, a lo largo de la muerte celular de este tejido. En el tapetum de *B. napus* se ha observado un aumento de la actividad proteolítica y de los niveles de expresión génica de cisteín proteasas pertenecientes al grupo de las metacaspasas (MCAs) una vez que las células del tapetum entran en el programa de MCP (Berenguer, 2020). Asimismo, también se ha detectado un aumento de la actividad caspasa 3-*like*, proteasas con actividad similar a las cisteín proteasas de tipo caspasa 3 de animales, durante la degradación del tapetum de *B. napus* y *N. tabacum* (Solís *et al*., 2014). En ambos estudios, tanto la actividad caspasa 3-like como la actividad y expresión de las metacaspasas disminuyeron en las etapas más avanzadas del proceso de MCP del tapetum, lo cual sugiere que estas cisteín proteasas podrían estar participando en momentos concretos de la degradación. En un estudio realizado con mutantes de *Arabidopsis*, los cuales tenían silenciado el gen de la catepsina CEP1, se observó un retraso en la MCP del tapetum que implicó una

disminución en los niveles de producción de polen (Zhang *et al*., 2014). Sin embargo, a pesar de que se ha estudiado la implicación de algunas PLCPs en la degradación del tapetum en algunas especies, hasta el momento no se habían identificado el conjunto de proteasas detectadas en esta tesis ni su activación durante la MCP del tapetum en cebada. Los resultados obtenidos aportan nuevas evidencias sobre el papel de las PLCPs durante el proceso de MCP del tapetum de cebada, habiéndose identificado CATB3/Pap-19, RD21A/Pap-6 y SAG12, entre otras.

Aparte de la participación de las PLCPs en la MCP del tapetum, numerosos trabajos han demostrado la participación de esta familia de proteasas en distintos procesos de muerte celular que tienen lugar a lo largo del desarrollo de la planta (Liu *et al*., 2018). Por ejemplo, se ha detectado un aumento en los niveles de expresión de la catepsina EPB y Pap-1, Pap-6 y Pap-19, entre otras, en semillas en germinación de cebada, habiéndose relacionado con la degradación y movilización de proteínas de almacenamiento del endospermo con el fin de proporcionar nutrientes a las plántulas en formación (Koehler y Ho, 1990; Mikkonen *et al*., 1996; Diaz-Mendoza *et al*., 2016; Diaz-Mendoza *et al*., 2019). También se ha detectado un aumento en los niveles de expresión del gen de la cisteín proteasa SAG12 y una mayor acumulación de esta proteína durante el proceso de MCP que tiene lugar en la movilización de nitrógeno desde hojas (James *et al*., 2018) y raíces (James *et al*., 2019) a favor de un aumento en el contenido de nitrógeno de las semillas (James *et al*., 2018) bajo condiciones de estrés y escasa disponibilidad de este nutrientes. En un trabajo realizado en *Arabidopsis*, se detectó un aumento de los niveles de expresión de dos PLCPs específicas del xilema, AtXCP1 y AtXCP2, durante el proceso de MCP del xilema (Zhao *et al*., 2000). Otro caso en el que se ha detectado activación de cisteín proteasas, en este caso tanto de la actividad caspasa3-*like* como de catepsina B, es durante el proceso de MCP mediado por estrés del retículo endoplásmico, implicado en múltiples procesos fisiológicos (Cai *et al*., 2018). En otro estudio llegaron a identificar tres isoformas de la catepsina B en *Arabidopsis* (AtCATHB1-3) utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) y, tras realizar experimentos con el triple mutante, detectaron una fuerte reducción de la MCP mediada por estrés del retículo endoplásmico y de la MCP inducida por estrés abiótico (estrés ultravioleta y estrés

oxidativo, entre otros) en estas plantas (Ge *et al*., 2016). También se ha visto un aumento de la actividad catalítica de cisteín proteasas durante la MCP de las células del suspensor del embrión cigótico de *N. tabacum* y *P. abies*, tanto de proteasas PLCPs como de proteasas con actividad caspasa 3- *like*, respectivamente (Minina *et al*., 2013; Zhao *et al*., 2013). Además, la sobreexpresión de la catepsina de tabaco *NtCP14* condujo a la inducción de MCP prematura de las células basales del embrión, lo cual detuvo el desarrollo embrionario y supuso el aborto de las semillas, mientras que el silenciamiento de este mismo gen llevó a un notable retraso de la MCP (Zhao *et al*., 2013). También se han llevado a cabo estudios sobre la participación de las PLCPs durante la embriogénesis de microsporas de cebada, observándose un aumento tanto de la actividad de catepsinas de tipo L/F, B y H como de los niveles de expresión génica de *HvPap-1*, *HvPap-6* y Pap-12 (correspondientes a catepsinas F-*like*, L-*like* y H-*like* en cebada, respectivamente) y la acumulación de proteínas Pap-1, Pap-6 y Pap-19 (catepsina B-*like* en cebada), tras aplicar el estrés inductor que desencadena procesos de muerte celular (Bárány *et al*., 2018). Asimismo, en el proceso de embriogénesis de microsporas de *B. napus* también se ha detectado un aumento de la actividad de cisteín proteasas, en este caso de la actividad caspasa 3-*like*, tras aplicar el tratamiento inductor de la embriogénesis (Berenguer *et al*., 2019). Estudios recientes han demostrado la eficacia de inhibidores específicos de cisteín proteasas, como el E-64d, la leupeptina y el Ac-DEVD-CHO, los cuales actúan alterando la actividad de estas enzimas y disminuyen el proceso de MCP (Swe y Sit, 2000; Moriyasu e Inoue, 2008; Rodríguez-Serrano *et al*., 2012; Ge *et al*., 2016; Sinha *et al*., 2016; Bárány *et al*., 2018; Berenguer *et al*., 2019; Berenguer, 2020), permitiendo un avance cada vez mayor en el conocimiento sobre la implicación de la actividad cisteín proteasas en eventos de MCP durante múltiples procesos del desarrollo de la planta.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis indican la activación tanto de la autofagia como de PLCPs específicas, como CATB3/Pap-19, RD21A/Pap-6 o SAG12, durante la MCP del tapetum, lo que sugiere fuertemente su participación en la ejecución de la muerte celular del tapetum de cebada. Estos resultados aportan nuevas evidencias sobre la maquinaria proteolítica que dirige la MCP del tapetum, específicamente en cebada, donde no se disponía de datos previos, abriendo así la puerta a estudios

posteriores necesarios para determinar el papel concreto de cada una de estas PLCPs en la regulación y/o ejecución de la MCP.

5.6 EFECTORES CLAVE EN LA REGULACIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA SON COMUNES A DISTINTOS SISTEMAS Y DIVERSAS ESPECIES CULTIVADAS Y FORESTALES

En esta tesis se han estudiado distintos efectores que actúan promoviendo o inhibiendo el proceso de embriogénesis somática, comparando su dinámica y posible papel en tres especies modelo de interés agrario y forestal: la colza (*Brassica napus*), dicotiledónea oleaginosa; la cebada (*Hordeum vulgare*), monocotiledónea, cereal; y el alcornoque (*Quercus suber*), especie dicotiledónea, leñosa y forestal. Asimismo, se han utilizado para el estudio dos sistemas distintos de embriogénesis somática: por un lado la embriogénesis de microsporas inducida por estrés en dos especies cultivadas que requieren de distintos tratamientos de estrés térmico para la inducción de embriogénesis, calor (32^{o}C) en *B. napus* y frío (4^{o}C) en *H. vulgare*, y por otro la embriogénesis somática inducida a partir de embriones cigóticos inmaduros en la especie forestal *Q. suber*. El análisis realizado integrando todos los resultados obtenidos indica que los determinantes estudiados presentan dinámicas y patrones de expresión similares en las distintas especies y sistemas estudiados, esquematizados en la figura 133A, lo que sugiere la existencia de mecanismos de regulación conservados.

El haber analizado el papel de distintos factores ha permitido identificar determinantes positivos (elementos en verde, Fig. 133A) del proceso de embriogénesis que se inducen y son necesarios para la reprogramación, inicio y/o progresión de la embriogénesis, donde cumplen un papel esencial, como son la regulación hormonal por auxinas y citoquininas y la remodelación de la pared celular operada por la metilesterificación de pectinas y las AGPs. Asimismo, se han identificado otros determinantes negativos (elementos en rojo, Fig. 133A), que reducen la eficiencia de inducción embriogénica, como son la muerte celular inducida por el estrés inductor de embriogénesis en la cual intervienen la autofagia y proteasas PLCPs.

Los datos obtenidos han mostrado que tanto auxinas como citoquininas activan su biosíntesis y señalización a lo largo del desarrollo embriogénico de las microsporas, siendo ambas necesarias para que el proceso se complete con éxito. La auxina ha revelado tener un papel clave en tanto en la reprogramación e inicio de la embriogénesis, caracterizada por una intensa actividad proliferativa, como en el desarrollo y diferenciación del embrión, tanto en *B. napus* como en *H. vulgare*. A su vez,

los resultados indican que la citoquinina juega un papel relevante fundamentalmente en etapas avanzadas del desarrollo, durante la diferenciación del embrión. Estos hallazgos revelan por primera vez que las primeras etapas de la embriogénesis de microsporas requieren de la acción de la auxina pero no de citoquinina, mientras que ambas hormonas son necesarias en etapas avanzadas para el correcto desarrollo del embrión, tal y como apoyan los estudios funcionales realizados con los inhibidores de auxinas y citoquininas en las especies *B. napus* y *H. vulgare*.

Sin embargo, al analizar la dinámica de la auxina durante el desarrollo *in vivo* del polen, esta hormona tendría un papel relevante en las etapas iniciales y una menor implicación a medida que avanza la maduración del polen (Fig 133B) tanto en *B. napus* como en *H. vulgare*, presentando la auxina endógena por tanto perfiles opuestos en cada una de las rutas de desarrollo de la microspora, el desarrollo gametofítico (*in vivo*) y el embriogénico (*in vitro*).

La remodelación de la pared celular mediada por pectinas y AGPs, también sigue una dinámica similar en las distintas especies y sistemas estudiados. En todas ellas existe un aumento progresivo tanto de los niveles de pectinas desesterificadas como de AGPs y expresión de sus genes a medida que avanza el desarrollo del embrión. Estos datos junto con los análisis funcionales con inhibidores de la actividad de PME y de AGPs demuestran que ambos componentes de la pared celular tienen un papel clave en la remodelación de la pared, sobre todo en etapas avanzadas, tanto en la embriogénesis somática de *Q. suber* como en la embriogénesis de microsporas de *B. napus* y *H. vulgare*.

Por otro lado, los resultados han permitido identificar reguladores que afectan de forma negativa a la embriogénesis de microsporas. La producción de ROS, la activación de autofagia y diversas cisteín proteasas acompañan al proceso de muerte celular inducida por estrés que tiene lugar durante la inducción embriogénica tanto en cebada como en colza, independientemente de que el estrés inductor sea calor o frío. Los análisis funcionales llevados a cabo con distintos inhibidores específicos de ROS, autofagia y de la actividad de cisteín proteasas y caspasa 3-*like* demuestran la implicación de estos factores en la muerte celular, además estos inhibidores redujeron notablemente los niveles de muerte aumentando la eficiencia de reprogramación de las

microsporas en cultivos de microsporas de *H. vulgare*, como ya se había demostrado en *B. napus*.

A su vez, también se ha detectado la activación de autofagia y de cisteín proteasas de tipo papaína (PLCPs) específicas como CATB3/Pap-19, RD21A/Pap-6 o SAG12 en otro proceso de muerte celular que tiene lugar durante el desarrollo *in vivo* de la microspora y el polen, la muerte celular programada (MCP) del tapetum, indicando que existen mecanismos conservados entre ambos procesos de muerte celular.

El haber realizado el mismo estudio en especies tan distintas como una oleaginosa, un cereal y una especie forestal y haber obtenido resultados similares en las tres, sugiere la existencia de mecanismos comunes de regulación hormonal, remodelación de la pared celular y muerte celular, haciendo posible la extrapolación de la dinámica de estos efectores a otros sistemas de embriogénesis y abriendo así la puerta a identificar nuevas dianas que permitan mejorar la eficiencia de la embriogénesis en especies de interés y su aplicación biotecnológica en programas de mejora agroforestal.

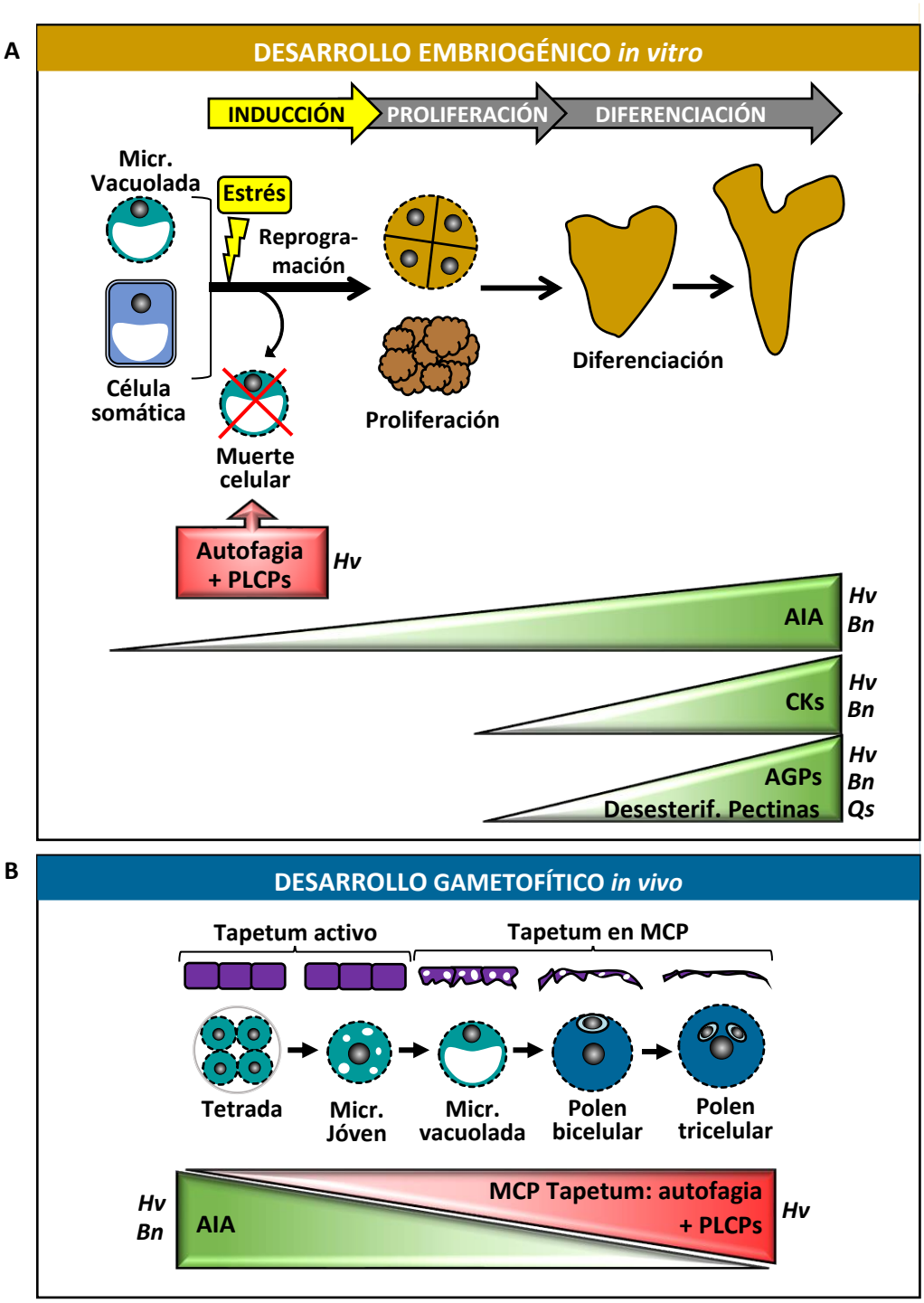


Figura 133. Figura resumen de los resultados obtenidos en la identificación de determinantes positivos: regulación hormonal por auxinas y citoquininas y remodelación de la pared celular operada por pectinas y AGPs (elementos en verde); y determinantes negativos: muerte celular inducida por estrés y muerte celular programada (MCP) del tapetum con activación de autofagia y proteasas PLCPs (elementos en rojo), durante el desarrollo embriogénico *in vitro* (**A**) y el desarrollo del polen *in vivo* (**B**). *Hv= Hordeum vulgare*; *Bn= Brassica napus*; *Qs= Quercus suber*.

CONCLUSIONES

1. En la embriogénesis de microsporas, los niveles de auxina endógena, así como la expresión de sus genes de biosíntesis *BnTAA1* y *HvTAR2-like* y transporte *BnPIN1-like* y *HvPIN1-like*, se inducen con la reprogramación de la microspora y aumentan con el inicio y la progresión de la embriogénesis, indicando un papel clave de esta hormona tanto en las primeras etapas de la embriogénesis como durante el posterior desarrollo del embrión, en *B. napus* y *H. vulgare.*

2. En el desarrollo del polen *in vivo*, las primeras etapas presentan gran acumulación de auxina y altos niveles de expresión de sus genes de biosíntesis *BnTAA1* y transporte *BnPIN1-like*, mientras que en etapas avanzadas, tras la división de la microspora, disminuyen tanto los niveles de auxina endógena como la expresión de los genes de biosíntesis y transporte, lo que indica que la dinámica de la auxina presenta perfiles opuestos durante la embriogénesis de microsporas y el desarrollo del polen.

3. Los inhibidores de biosíntesis (L-kinurenina) y transporte (NPA) de auxina afectan negativamente tanto a la inducción embriogénica como al posterior desarrollo del embrión, indicando que tanto la síntesis de auxina como su transporte polar son necesarios para al inicio y la progresión de la embriogénesis de microsporas en *B. napus* y *H. vulgare*.

4. Los niveles de citoquinina endógena son bajos en etapas tempranas de la embriogénesis de microsporas y aumentan con el desarrollo y diferenciación del embrión, detectándose en etapas avanzadas de la embriogénesis de microsporas de *B. napus* y *H. vulgare* mayor acumulación de *trans*-zeatina e isopenteniladenina, altos niveles de expresión de los genes de biosíntesis *BnIPT1-2* y *BnIPT9* y del gen activador de la señalización *BnARR21* y disminución de la expresión del gen de degradación *BnCKX2* y del inhibidor de la señal de citoquininas *BnARR5.*

5. La inhibición de la señalización de citoquininas con el compuesto PI-55 no afecta a la inducción embriogénica, pero impide fuertemente el posterior desarrollo de los embriones, demostrando un papel clave de la citoquinina en las etapas más avanzadas de la embriogénesis de microsporas, durante la diferenciación del embrión.

6. La desesterificación de las pectinas y la expresión de proteínas de arabinogalactano (AGPs) aumentan durante la progresión de la embriogénesis, indicando la remodelación de la pared celular en etapas avanzadas de la embriogénesis somática de *Q. suber* y la embriogénesis de microsporas de *B. napus* y *H. vulgare*.

7. En etapas tempranas de la embriogénesis somática se detectan altos niveles de pectinas esterificadas y expresión del inhibidor de pectinmetilesterasa PMEI, los cuales descienden en etapas posteriores, con la diferenciación del embrión, a la vez que aumentan progresivamente la actividad enzimática PME, la expresión génica de *PME* y las pectinas desesterificadas.

8. Las AGPs endógenas están presentes en las paredes celulares durante la embriogénesis, aumentando en etapas avanzadas del desarrollo junto con la expresión de los genes de AGPs *QsLys-rich-AGP18*, *QsAGP16L1, QsLys-rich-AGP17 y HvAGP,* en la embriogénesis somática de *Q. suber* y la embriogénesis de microsporas de *H. vulgare*.

9. La inhibición de la actividad PME con catequina PP60 y el bloqueo de AGPs con reactivo Yariv impide el proceso de diferenciación del embrión en la embriogénesis somática de *Q. suber* y la embriogénesis de microsporas de *H. vulgare*, demostrando que tanto la desesterificación de pectinas como el incremento de AGPs cumplen un papel esencial y son necesarios para la progresión de la embriogénesis y el correcto desarrollo los embriones en ambos sistemas.

10. El tratamiento de estrés por frío, necesario para la inducción de embriogénesis de microsporas en cebada, aumenta los niveles de muerte celular, los cuales disminuyen con inhibidores de ROS, de autofagia, y de la actividad cisteín proteasa y caspasa 3-*like,* lo que revela la implicación de la autofagia y estas proteasas en la muerte celular de los cultivos, a la vez que demuestra que el uso de estos inhibidores mejora la eficiencia de inducción embriogénica.

11. En otro proceso de muerte celular, la muerte celular programada (MCP) del tapetum, en cebada, también se activa la autofagia, produciéndose un aumento de la expresión de los genes *HvATG5* y *HvATG8_1*, así como de las proteínas ATG5 y ATG8.

12. Las proteasas de la familia PLCPs se activan y participan en el proceso de MCP del tapetum de cebada, habiéndose identificado mediante análisis proteómico las formas activas de las PLCPs CATB3/Pap-19, RD21A/Pap-6 y SAG12, junto al aumento de expresión de los genes *HvPap-1*, *HvPap-6* y *HvPap-19* durante la MCP del tapetum, datos que sugieren fuertemente la participación de estas proteasas en el proceso.

13. Todos estos datos han permitido identificar nuevos determinantes del proceso de embriogénesis somática con un papel promotor o inhibidor de la inducción, inicio y/o progresión de la embriogénesis, los cuales actúan en distintos sistemas *in vitro* y diversas especies, sugiriendo mecanismos comunes que podrían ocurrir también en otras especies de interés y constituir dianas para nuevas estrategias biotecnológicas que permitan mejorar la eficiencia de embriogénesis.

BIBLIOGRAFÍA

Ablin, A. (2014). El Mercado de la Cerveza. Informe Sectorial N° 3. *Ministerios de Agroindustriales de La Nación*, 1–12. Recuperado desde: http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/AyB/bebidas/Informes/Cerveza_03_2014_04Abr.pdf

A**brahamsson, M., Valledares, S., Larsson, E., Clapham, D., y Von Arnold, S. (2012).** Patterning during somatic embryogenesis in Scots pine in relation to polar auxin transport and programmed cell death Patterning during somatic embryogenesis in Scots pine in relation to polar auxin transport and programmed cell death. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, *109*, 391–400.

Acosta-García, G., y Vielle-Calzada, J. P. (2004). A classical arabinogalactan protein is essential for the initiation of female gametogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *16*(10), 2614–2628.

Adamowski, M., y Friml, J. (2015). PIN-dependent auxin transport: Action, regulation, and evolution. *Plant Cell*, *27*, 20–32.

Agostino, I. B. D., Deruère, J., y Kieber, J. J. (2000). Characterization of the Response of the *Arabidopsis* Response Regulator Gene Family to Cytokinin. *Plant Physiology*, *124*, 1706–1717.

Akhtar, S., Ahmad, A., Jha, S. R., y Ahmad, J. (2019). Regulation of leaf senescence by macromolecule degradation and hormones. *Senescence Signalling and Control in Plants*. Elsevier Inc.

Akhtar, S. S., Mekureyaw, M. F., Pandey, C., y Roitsch, T. (2020). Role of Cytokinins for Interactions of Plants With Microbial Pathogens and Pest Insects. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1–12.

Albacete, A., Ghanem, M. E., Martínez-Andújar, C., Acosta, M., Sánchez-Bravo, J., Martínez, V., Lutts, S., Dodd, I. C., y Pérez-Alfocea, F. (2008). Hormonal changes in relation to biomass partitioning and shoot growth impairment in salinized tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Journal of Experimental Botany*, *59*(15), 4119–4131.

Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M., y Ullrich, C. I. (2006). Role of auxin in regulating *Arabidopsis* flower development. *Planta*, *223*, 315–328.

Ameisen, J. C. (2004). Looking for death at the core of life in the light of evolution. *Cell Death and Differentiation*, *11*, 4–10.

Amsbury, S., Hunt, L., Elhaddad, N., Baillie, A., Lundgren, M., Verhertbruggen, Y., Scheller, H. V., Knox, J. P., Fleming, A. J., y Gray, J. E. (2016). Stomatal Function Requires Pectin De-methyl-esterification of the Guard Cell Wall. *Current Biology*, *26*, 1–8.

Amstrong, D. (1994). Cytokinin oxidase and the regulation of cytokinin degradation. *Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function*. 139–154.

Andersen, S. B. (2005). Haploids in the improvement of woody species. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, *56*, 243–257). Springer.

Aoyama, T., y Oka, A. (2003). Cytokinin signal transduction in plant cells. *Journal of Plant Research*, *116*(3), 221–231.

Aremu, A. O., Stirk, W. A., Masondo, N. A., Plačková, L., Novák, O., Pěnčík, A., Zatloukal, M., Nisler, J., Spíchal, L., Doležal, K., Finnie, J. F., y van Staden, J. (2015). Dissecting the role of two cytokinin analogues (INCYDE and PI-55) on *in vitro* organogenesis, phytohormone accumulation, phytochemical content and antioxidant activity. *Plant Science*, *238*, 81–94.

Ariizumi, T., y Toriyama, K. (2011). Genetic regulation of sporopollenin synthesis and pollen exine development. *Annual Review of Plant Biology*, *62*, 437–460.

Asami, T., y Nakagawa, Y. (2018). Preface to the Special Issue: Brief review of plant hormones and their utilization in agriculture. *Journal of Pesticide Science*, *43*(3), 154–158.

Ashikari, M., Sakakibara, H., Lin, S., Yamamoto, T., y Takashi, T. (2005). Cytokinin Oxidase Regulates Rice Grain Production. *Science*, *309*(5735), 741–745.

Avila-Ospina, L., Marmagne, A., Soulay, F., y Masclaux-Daubresse, C. (2016). Identification of barley (*Hordeum vulgare* L.) autophagy genes and their expression levels during leaf senescence, chronic nitrogen limitation and in response to dark exposure. *Agronomy*, *6*(1).

Avin-Wittenberg, T., Baluška, F., Bozhkov, P. V., Elander, P. H., Fernie, A. R., Galili, G., Hassan, A., Hofius, D., Isono, E., Le Bars, R., Masclaux-Daubresse, C., Minina, E. A., Peled-Zehavi, H., Coll, N. S., Sandalio, L. M., Satiat-Jeunemaitre, B., Sirko, A., Testillano, P. S., y Batoko, H. (2018). Autophagy-related approaches for improving nutrient use efficiency and crop yield protection. *Journal of Experimental Botany*, *69*(6), 1335–1353.

Badr, A., Müller, K., Schäfer-Pregl, R., El Rabey, H., Effgen, S., Ibrahim, H. H., Pozzi, C., Rohde, W., y Salamini, F. (2000). On the origin and domestication history of barley (*Hordeum vulgare*). *Molecular Biology and Evolution*, *17*(4), 499–510.

Balestrieri, C., Castaldo, D., Giovane, A., Quagliuolo, L., y Servillo, L. (1990). A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit (*Actinidia chinensis*). *European Journal of Biochemistry*, *193*, 183–187.

Baluška, F., Liners, F., Hlavačka, A., Schlicht, M., van Cutsem, P., McCurdy, D. W., y Menzel, D. (2005). Cell wall pectins and xyloglucans are internalized into dividing root cells and accumulate within cell plates during cytokinesis. *Protoplasma*, *225*, 141–155.

Baluška, František, Hlavacka, A., Šamaj, J., Palme, K., Robinson, D. G., Matoh, T., McCurdy, D. W., Menzel, D., y Volkmann, D. (2002). F-actin-dependent endocytosis of cell wall pectins in meristematic root cells. Insights from brefeldin A-induced compartments. *Plant Physiology*, *130*, 422–431.

Balzan, S., Johal, G. S., y Carraro, N. (2014). The role of auxin transporters in monocots development. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 1–12.

Bárány, I., Berenguer, E., Solís, M. T., Pérez-Pérez, Y., Santamaría, M. E., Crespo, J. L., Risueño, M. C., Díaz, I., y Testillano, P. S. (2018). Autophagy is activated and involved in cell death with participation of cathepsins during stress-induced microspore embryogenesis in barley. *Journal of Experimental Botany*, *69*(6), 1387–1402.

Bárány, I., Fadón, B., Risueño, M. C., y Testillano, P. S. (2010). Cell wall components and pectin esterification levels as markers of proliferation and differentiation events during pollen development and pollen embryogenesis in *Capsicum annuum* L. *Journal of Experimental Botany*, *61*(4), 1159–1175.

Bárány, I., González-Melendi, P., Fadón, B., Mitykó, J., Risueño, M. C., y Testillano, P. S. (2005). Microspore-derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.): subcellular rearrangements through development. *Biology of the Cell*, *97*(9), 709–722.

Barnabás, B., Obert, B., y Kovács, G. (1999). Colchicine, an efficient genome-doubling agent for maize (*Zea mays* L.) microspores cultured in anthers. *Plant Cell Reports*, *18*, 858–862.

Barnes, W. J., y Anderson, C. T. (2018). Release, Recycle, Rebuild: Cell-Wall Remodeling, Autodegradation, and Sugar Salvage for New Wall Biosynthesis during Plant Development. *Molecular Plant*, *11*, 31–46.

Barra-Jiménez, A., Blasco, M., Ruiz-Galea, M., Celestino, C., Alegre, J., Arrillaga, I., y Toribio, M. (2014). Cloning mature holm oak trees by somatic embryogenesis. *Trees-Structure and Function*, *28*(3), 657–667.

Bartrina, I., Jensen, H., Novák, O., Strnad, M., Werner, T., y Schmülling, T. (2017). Gain-of-function mutants of the cytokinin receptors AHK2 and AHK3 regulate plant organ size, flowering time and plant longevity. *Plant Physiology*, *173*(3), 1783–1797.

Bartrina, I., Otto, E., Strnad, M., Werner, T., y Schmülling, T. (2011). Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, *23*, 69–80.

Bassham, D. C. (2007). Plant autophagy-more than a starvation response. *Current Opinion in Plant Biology*, *10*(6), 587–593.

Bassham, D. C. (2015). Methods for analysis of autophagy in plants. *Methods*, *75*, 181–188.

Bassham, D. C., Laporte, M., Marty, F., Moriyasu, Y., Ohsumi, Y., Olsen, L. J., y Yoshimoto, K. (2006). Autophagy in development and stress responses of plants. *Autophagy*, *2*(1), 2–11.

Bennett, T. (2015). PIN proteins and the evolution of plant development. *Trends in Plant Science*, *20*(8), 498–507.

Berenguer, E., Minina, E. A., Carneros, E., B R Ny, I., Bozhkov, P. V., y Testillano, P. S. (2021). Suppression of Metacaspase- and Autophagy-Dependent Cell Death Improves Stress-Induced Microspore Embryogenesis in *Brassica napus*. *Plant & Cell Physiology*, *61*(12), 2097–2110.

B**erenguer, E., Solís, M.-T., Pérez-Pérez, Y., y Testillano, P. S. (2019).** Proteases with caspase 3-like activity participate in cell death during stress-induced microspore embryogenesis of *Brassica napus*. *The EuroBiotech Journal*, *3*, 152–159.

Berenguer, E. (2020). Papel de la autofagia, cisteín proteasas y modificaciones postraduccionales de histonas en la inducción por estrés de embriogénesis de microsporas de plantas cultivadas. Tesis Universidad Complutense de Madrid.

Berková, V., Kameniarová, M., Ondrisková, V., Berka, M., Menšíková, S., Kopecká, R., Luklová, M., Novák, J., Spíchal, L., Rashotte, A. M., Brzobohatý, B., y Černý, M. (2020). *Arabidopsis* response to inhibitor of cytokinin degradation INCYDE: Modulations of cytokinin signaling and plant proteome. *Plants*, *9*, 1–15.

B**halerao, R., Keskitalo, J., Sterky, F., Erlandsson, R., Björkbacka, H., Birve, S. J., Karlsson, J., Gardeström, P., Gustafsson, P., Lundeberg, J., y Jansson, S. (2003).** Gene expression in autumn leaves. *Plant Physiology*, *131*, 430–442.

Bhatia, R., Dey, S. S., Sood, S., Sharma, K., Sharma, V. K., Parkash, C., y Kumar, R. (2016). Optimizing protocol for efficient microspore embryogenesis and doubled haploid development in different maturity groups of cauliflower (B. oleracea var. botrytis L.) in India. *Euphytica*, *212*, 439–454.

Biancucci, M., Mattioli, R., Forlani, G., Funck, D., Costantino, P., y Trovato, M. (2015). Role of proline and GABA in sexual reproduction of angiosperms. *Frontiers in Plant Science*, *6*(680), 1–11.

Bielach, A., Podlešáková, K., Marhavý, P., Duclercq, J., Cuesta, C., Müller, B., Grunewald, W., Tarkowski, P., y Benkováa, E. (2012). Spatiotemporal regulation of lateral root organogenesis in *Arabidopsis* by cytokinin. *Plant Cell*, *24*(10), 3967–3981.

Bilyeu, K., Cole, J., Laskey, J., Riekhof, W., y Esparza, T. (2001). Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiology*, *125*, 378–386.

Blattner, F. R. (2018). Taxonomy of the Genus Hordeum and Barley (*Hordeum vulgare*). *The Barley Genome*, 11–23. Springer International Publishing.

B**lilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Frimi, J., Heldstra, R., Aida, M., Palme, K., y Scheres, B. (2005).** The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature*, *433*, 39–44.

Bonneau, L., Ge, Y., Drury, G. E., y Gallois, P. (2008). What happened to plant caspases? *Journal of Experimental Botany*, *59*(3), 491–499.

Borderies, G., le Béchec, M., Rossignol, M., Lafitte, C., Le Deunff, E., Beckert, M., Dumas, C., y Matthys-Rochon, E. (2004). Characterization of proteins secreted during maize microspore culture: Arabinogalactan proteins (AGPs) stimulate embryo development. *European Journal of Cell Biology*, *83*, 205–212.

Borg, K. (1975). Efectos fisiopatológicos de aceite de colza: una revisión. *Acta Medica Scandinavica Supplementum.*, *582*, 5–13.

Borghi, L., Kang, J., Ko, D., Lee, Y., y Martinoia, E. (2015). The role of ABCG-type ABC transporters in phytohormone transport. *Biochemical Society Transactions*, *43*, 924–930.

Bornhoff, B. A., y Harst, M. (2000). Establishment of embryo suspension cultures of grapevines (Vitis L.). *Vitis*, *39*(1), 27–29.

Bosch, M., Cheung, A. Y., y Hepler, P. K. (2005). Pectin methylesterase, a regulator of pollen tube growth. *Plant Physiology*, *138*, 1334–1346.

Bozhkov, P., y Jansson, C. (2007). Autophagy and cell-death proteases in plants: Two wheels of a funeral cart. *Autophagy*, *3*(2), 136–138.

Braybrook, S. A., y Peaucelle, A. (2013). Mechano-Chemical Aspects of Organ Formation in *Arabidopsis thaliana*: The Relationship between Auxin and Pectin. *PLoS ONE*, *8*(3).

Brumos, J., Alonso, J. M., y Stepanova, A. N. (2014). Genetic aspects of auxin biosynthesis and its regulation. *Physiologia Plantarum*, *151*(1), 3–12.

Bueno, M. A., Astorga, R., y Manzanera, J. A. (1992). Plant regeneration through somatic embryogenesis in *Quercus suber*. *Physiologia Plantarum*, *85*, 30–34.

Bueno, Maria A., Gomez, A., Sepulveda, F., Seguí, J. M., Testillano, P. S., Manzanera, J. A., y Risueño, M. C. (2003). Microspore-derived embryos from *Quercus suber* anthers mimic zygotic embryos and maintain haploidy in long-term anther culture. *Journal of Plant Physiology*, *160*, 953–960.

Bueno, Maria Angeles, Gómez, A., Boscaiu, M., Manzanera, J. A., y Vicente, O. (1997). Stress-induced formation of haploid plants through anther culture in cork oak (Quercus suber). *Physiologia Plantarum*, *99*, 335–341.

Buono, R. A., Hudecek, R., y Nowack, M. K. (2019). The roles of proteases during developmental programmed cell death in plants. *Journal of Experimental Botany*, *70*(7), 2097–2112.

Bürkle, L., Cedzich, A., Stransky, H., Okumoto, S., Gillissen, B., Kühn, C., y Frommer, W. B. (2003). Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem , hydathodes , and pollen of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *34*, 13–26.

Cai, Y. M., Yu, J., Ge, Y., Mironov, A., y Gallois, P. (2018). Two proteases with caspase-3-like activity, cathepsin B and proteasome, antagonistically control ER-stress-induced programmed cell death in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, *218*, 1143–1155.

Calderón-Villalobos, L. I., Lee, S., De Oliveira, C., Ivetac, A., Brandt, W., Armitage, L., Sheard, L. B., Tan, X., Parry, G., Mao, H., Zheng, N., Napier, R., Kepinski, S., y Estelle, M. (2012). A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nature Chemical Biology*, *8*(5), 477–485.

Campbell, M. M., Brunner, A. M., Jones, H. M., y Strauss, S. H. (2003). Forestry's fertile crescent: the application of biotechnology to forest trees. *Plant Biotechnology Journal*, *1*, 141–154.

Cao, M., Chen, R., Li, P., Yu, Y., Zheng, R., Ge, D., Zheng, W., Wang, X., Gu, Y., Gelová, Z., Friml, J., Zhang, H., Liu, R., He, J., y Xu, T. (2019). TMK1-mediated auxin signalling regulates differential growth of the apical hook. *Nature*, *568*(7751), 240–243.

Cardarelli, M., y Cecchetti, V. (2014). Auxin polar transport in stamen formation and development: How many actors? *Frontiers in Plant Science*, *5*(333), 1–13.

Carman, J. G. (1990). Embryogenic cells in plant tissue cultures: Occurrence and behavior. *In vitro Cellular & Developmental Biology*, *26*(8), 746–753.

Castillo, A., Cistué, L., Vallés, M. P., y Soriano, M. (2009). Chromosome doubling in monocots. *Advances in haploid production in higher plants*, 329–338. Springer.

Cecchetti, V., Altamura, M. M., Falasca, G., Costantino, P., y Cardarelli, M. (2008). Auxin regulates *Arabidopsis* anther dehiscence, pollen maturation, and filament elongation. *Plant Cell*, *20*(7), 1760–1774.

Cecchetti, V., Celebrin, D., Napoli, N., Ghelli, R., Brunetti, P., Costantino, P., y Cardarelli, M. (2017). An auxin maximum in the middle layer controls stamen development and pollen maturation in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, *213*(3), 1194–1207.

Chandrasekar, B., Colby, T., Emon, A. E. K., Jiang, J., Ngoc Hong, T., Villamor, J. G., Harzen, A., Overkleeft, H. S., y van Der Hoorn, R. A. L. (2014). Broad-range glycosidase activity profiling. *Molecular and Cellular Proteomics*, *13*(10), 2787–2800.

Chang, F., Wang, Y., Wang, S., y Ma, H. (2011). Molecular control of microsporogenesis in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology*, *14*(1), 66–73.

Chapman, A., Blervacq, A. S., Vasseur, J., y Hilbert, J. L. (2000). Arabinogalactan-proteins in Cichorium somatic embryogenesis: Effect of β-glucosyl Yariv reagent and epitope localisation during embryo development. *Planta*, *211*, 305–314.

Chen, D., Ren, Y., Deng, Y., y Zhao, J. (2010). Auxin polar transport is essential for the development of zygote and embryo in *Nicotiana tabacum* L. and correlated with ABP1 and PM H+-ATPase activities. *Journal of Experimental Botany*, *61*(6), 1853–1867.

Chen, M. H., y Citovsky, V. (2003). Systemic movement of a tobamovirus requires host cell pectin methylesterase. *The Plant Journal*, *35*, 386–392.

Chen, Q., Shinozaki, D., Luo, J., Pottier, M., Havé, M., Marmagne, A., Reisdorf-Cren, M., Chardon, F., Thomine, S., Yoshimoto, K., y Masclaux-Daubresse, C. (2019). Autophagy and Nutrients Management in Plants. *Cells*, *8*(11), 1–17.

Cheng, X., Ruyter-Spira, C., y Bouwmeester, H. (2013). The interaction between strigolactones and other plant hormones in the regulation of plant development. *Frontiers in Plant Science*, *4*(199), 1–16.

Cheng, Y., Dai, X., y Zhao, Y. (2006). Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes and Development*, *20*(13), 1790–1799.

Cheng, Z. J., Zhu, S. S., Gao, X. Q., y Zhang, X. S. (2010). Cytokinin and auxin regulates WUS induction and inflorescence regeneration *in vitro* in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*, *29*(8), 927–933.

Chiappetta, A., Bruno, L., Salimonti, A., Muto, A., Jones, J., Rogers, H. J., Francis, D., y Bitonti, M. B. (2011). Differential spatial expression of A- and B-type CDKs, and distribution of auxins and cytokinins in the open transverse root apical meristem of *Cucurbita maxima*. *Annals of Botany*, *107*(7), 1223–1234.

Chicaiza, N. O., Rivadeneira, M., Paredes, F., Villacrés, E., Balseca, R. (1992). INIAP-Atahualpa 92 variedad de cebada de grano desnudo. *Boletín Divulgativo Nº 127*.

Christiaens, S., van Buggenhout, S., Ngouémazong, E. D., Vandevenne, E., Fraeye, I., Duvetter, T., van Loey, A. M., y Hendrickx, M. E. (2011). Anti-homogalacturonan antibodies: A way to explore the effect of processing on pectin in fruits and vegetables? *Food Research International*, *44*(1), 225–234.

Chu, C. C. (1978). The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. *Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture*, 43. – 50. Science Press.

Chudzik, B., Szczuka, E., Leszczuk, A., y Strubińska, J. (2018). Modification of pectin distribution in sunflower (*Helianthus annuus* L.) roots in response to lead exposure. *Environmental and Experimental Botany*, *155*, 251–259.

Chuprov-Netochin, R., Neskorodov, Y., Marusich, E., Mishutkina, Y., Volynchuk, P., Leonov, S., Skryabin, K., Ivashenko, A., Palme, K., y Touraev, A. (2016). Novel small molecule modulators of plant growth and development identified by high-content screening with plant pollen. *BMC Plant Biology*, *16*(192), 1–11.

Clandinino, M., y Yamashiro, H. (1982). Dietary Factors Affecting the Incidence of Dietary Fat-Induced Myocardial Lesions. *Journal of Nutrition*, *112*, 825–828.

Coenen, C., y Lomax, T. L. (1997). Auxin-cytokinin interactions in higher plants: Old problems and new tools. *Trends in Plant Science*, *2*(9), 351–356.

Conner, J. A., y Ozias-Akins, P. (2017). *Apomixis: Engineering the Ability to Harness Hybrid Vigor in Crop Plants*, 1669, 17–34.

Copeland, L. O., y McDonald, M. B. (1995). Principles of seed science and technology. *Plant Science*. Chapman y Hall.

Corral-Martínez, P., Driouich, A., y Seguí-Simarro, J. M. (2019). Dynamic changes in arabinogalactan-protein, pectin, xyloglucan and xylan composition of the cell wall during microspore embryogenesis in *Brassica napus*. *Frontiers in Plant Science*, *10*(332), 1–17.

Corredoira, E, Toribio, M., y Vieitez, A. (2014). Clonal Propagation via Somatic Embryogenesis in *Quercus spp. Tree Biotechnology*, 262–302. CRC Press.

Corredoira, Elena, Cano, V., Bárány, I., Solís, M. T., Rodríguez, H., Vieitez, A. M., Risueño, M. C., y Testillano, P. S. (2017). Initiation of leaf somatic embryogenesis involves high pectin esterification, auxin accumulation and DNA demethylation in *Quercus alba*. *Journal of Plant Physiology*, *213*, 42–54.

Cortleven, A., y Schmülling, T. (2015). Regulation of chloroplast development and function by cytokinin. *Journal of Experimental Botany*, *66*(16), 4999–5013.

Costa, M. L., Sobral, R., Costa, M. M. R., Amorim, M. I., y Coimbra, S. (2015). Evaluation of the presence of arabinogalactan proteins and pectins during *Quercus suber* male gametogenesis. *Annals of Botany*, *115* (1), 81–92.

Couvreur, T. L. P., Franzke, A., Al-Shehbaz, I. A., Bakker, F. T., Koch, M. A., y Mummenhoff, K. (2010). Molecular Phylogenetics, Temporal Diversification, and Principles of Evolution in the Mustard Family (*Brassicaceae*). *Molecular Biology and Evolution*, *27*(1), 55–71.

Cuenca, B., San-José, M. C., Martinez, M. T. ·, A., B., y Vieitez, A. M. (1999). Somatic embryogenesis from stem and leaf explants of Quercus robur L . *Plant Cell Reports*, *18*, 538–543.

Cutcliffe, J. W., Hellmann, E., Heyl, A., y Rashotte, A. M. (2011). CRFs form protein – protein interactions with each other and with members of the cytokinin signalling pathway in *Arabidopsis* via the CRF domain. *Journal of Experimental Botany*, *62*(14), 4995–5002.

Daher, F. B., y Braybrook, S. A. (2015). How to let go: Pectin and plant cell adhesion. *Frontiers in Plant Science*, *6*(523), 1–8.

Daneva, A., Gao, Z., van Durme, M., y Nowack, M. K. (2016). Functions and Regulation of Programmed Cell Death in Plant Development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *32*(1), 441–468.

de Pinto, M. C., Locato, V., y de Gara, L. (2012). Redox regulation in plant programmed cell death. *Plant, Cell and Environment*, *35*, 234–244.

de Wit, M., Ljung, K., y Fankhauser, C. (2015). Contrasting growth responses in lamina and petiole during neighbor detection depend on differential auxin responsiveness rather than different auxin levels. *New Phytologist*, *208*(1), 198–209.

Dello Ioio, R., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M. T., Aoyama, T., Costantino, P., y Sabatini, S. (2008). A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science*, *322*(5906), 1380–1384.

Derbyshire, P., McCann, M. C., y Roberts, K. (2007). Restricted cell elongation in *Arabidopsis* hypocotyls is associated with a reduced average pectin esterification level. *BMC Plant Biology*, *7*, 1–12.

Diaz-Mendoza, M., Diaz, I., y Martinez, M. (2019). Insights on the proteases involved in barley and wheat grain germination. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(9).

Diaz-Mendoza, M., Dominguez-Figueroa, J. D., Velasco-Arroyo, B., Cambra, I., Gonzalez-Melendi, P., Lopez-Gonzalvez, A., Garcia, A., Hensel, G., Kumlehn, J., Diaz, I., y Martinez, M. (2016). HvPap-1 C1A protease and HvCPI-2 cystatin contribute to barley grain filling and germination. *Plant Physiology*, *170*(4), 2511–2524.

Díaz-Mendoza, M., Velasco-Arroyo, B., González-Melendi, P., Martínez, M., y Díaz, I. (2014). C1A cysteine protease-cystatin interactions in leaf senescence. *Journal of Experimental Botany*, *65*(14), 3825–3833.

Díaz-Sala, C. (2019). Molecular dissection of the regenerative capacity of forest tree species: Special focus on conifers. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 1–10.

Dickinson, H. G., y Lewis, D. (2014). The formation of the tryphine coating the pollen grains of Raphanus , and its properties to the relating. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *184*(1075), 149–165.

Drenth, J., Jansonius, J. N., Koekoek, R., Swen, H. M., y Wolthers, B. G. (1968). Structure of papain. *Nature*, *218*, 929–932.

Dunwell, J. M. (2010). Haploids in flowering plants: Origins and exploitation. *Plant Biotechnology Journal*, *8*(4), 377–424.

Durán-medina, Y., Díaz-ramírez, D., y Marsch-martínez, N. (2017). Cytokinins on the Move. *Frontiers in Plant Science*, *8*(146).

Durgbanshi, A., Arbona, V., Pozo, O., Miersch, O., Sancho, J. V., y Gómez-Cadenas, A. (2005). Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(22), 8437–8442.

Dwivedi, S. L., Britt, A. B., Tripathi, L., Sharma, S., Upadhyaya, H. D., y Ortiz, R. (2015). Haploids: Constraints and opportunities in plant breeding. *Biotechnology Advances*, *33*(6), 812–829.

El-Showk, S., Ruonala, R., y Helariutta, Y. (2013). Crossing paths: Cytokinin signalling and crosstalk. *Development (Cambridge)*, *140*(7), 1373–1383.

El-Tantawy, A. A., Solís, M. T., Da Costa, M. L., Coimbra, S., Risueño, M. C., y Testillano, P. S. (2013). Arabinogalactan protein profiles and distribution patterns during microspore embryogenesis and pollen development in *Brassica napus*. *Plant Reproduction*, *26*(3), 231–243.

El-Tantawy A. (2016). Factores clave implicados en la embriogénesis de microsporas inducida por estrés en cebada y colza: metilación del dna, proteínas de arabinogalactanos y auxina. Tesis Universidad Complutense de Madrid.

El Maâtaoui, M. (1990). Embryogénèse somatique chez le chêne liège (*Quercus suber* L.) : introduction, étude cytohistologique et essais de régénération de plantes entières.

Ellis, M., Egelund, J., Schultz, C. J., y Bacic, A. (2010). Arabinogalactan-proteins: Key regulators at the cell surface? *Plant Physiology*, *153*(2), 403–419.

Engelmann, F., Lartaud, M., Chabrillange, N., Carron, M. P., y Etienne, H. (1997). Cryopreservation of embryogenic calluses of two commercial clones of *Hevea brasiliensis*. *Cryo-Letters*, *18*(2), 107–116.

Evans D., W., S., y C., F. (1981). Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. *Plant Tissue Culture: methods and applications in agriculture*, 45–113.

Fahad, S., Hussain, S., Matloob, A., Khan, F. A., Khaliq, A., Saud, S., Hassan, S., Shan, D., Khan, F., Ullah, N., Faiq, M., Khan, M. R., Tareen, A. K., Khan, A., Ullah, A., Ullah, N., y Huang, J. (2014). Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. *Plant Growth Regulation*, *75*(2), 391–404.

FAOSTAT. (2016). *Food and Agriculture Organization*.

FAOSTAT. (2017). *Food and Agriculture Organization*.

Fehér, A. (2015). Somatic embryogenesis - stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, *1849*(4), 385–402.

Feng, X. L., Ni, W. M., Elge, S., Mueller-Roeber, B., Xu, Z. H., y Xue, H. W. (2006). Auxin flow in anther filaments is critical for pollen grain development through regulating pollen mitosis. *Plant Molecular Biology*, *61*(1–2), 215–226.

Fernandez-Guijarro, B. (1997). *Embriogénesis somática en alcornoque (Quercus suber L.)*. E.T.S. Ingenieros de Montes. Universidad Politécnica de Madrid.

Fernández-Guijarro, B., Celestino, C., y Toribio, M. (1994). Somatic embryogenesis in *Quercus suber*, *Biotecnology of Trees*, 105–110. Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales. INIA.

Fernández-Otero, C. I., de la Torre, F., Iglesias, R., Rodríguez-Gacio, M. C., y Matilla, A. J. (2007). Stage- and tissue-expression of genes involved in the biosynthesis and signalling of ethylene in reproductive organs of damson plum (*Prunus domestica L. subsp. insititia*). *Plant Physiology and Biochemistry*, *45*(3–4), 199–208.

Ferreira, F. J., y Kieber, J. J. (2005). Cytokinin signaling. *Curr. Opin. Plant. Biol, 8*(5), 518–525.

Ferrie, A. (2003). Microspore culture of *Brassica* species. *Doubled Haploid Production in Crop Plants*, 205–215. Springer.

Ferrie, A. M. R., y Caswell, K. L. (2011). Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *104*, 301–309.

Ferrie, A. M. R., Dirpaul, J., Krishna, P., Krochko, J., y Keller, W. A. (2005). Effects of brassinosteroids on microspore embryogenesis in *Brassica* species. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, *41*, 742–745.

Fiore, S., De Pasquale, F., Carimi, F., y Sajeva, M. (2002). Effect of 2,4-D and 4-CPPU on somatic embryogenesis from stigma and style transverse thin cell layers of Citrus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *68*(1), 57–63.

Fischbeck, G. (1992). Barley cultivar development in Europe: success in the past and possible changes in the future. *Barley Genetics VI (II)*, 885–901.

Fischer-Iglesias, C., Sundberg, B., Neuhaus, G., y Jones, A. M. (2001). Auxin distribution and transport during embryonic pattern formation in wheat. *The Plant Journal*, *26*(2), 115–129.

Fomicheva, A. S., Tuzhikov, A. I., Beloshistov, R. E., Trusova, S. V., Galiullina, R. A., Mochalova, L. V., Chichkova, N. V., y Vartapetian, A. B. (2012). Programmed cell death in plants. *Biochemistry. Biokhimii{combining Double Inverted Breve}a*, *77*(13), 1452–1464.

Forestan, C., Meda, S., y Varotto, S. (2010). ZmPIN1-mediated auxin transport is related to cellular differentiation during maize embryogenesis and endosperm development. *Plant Physiology*, *152*(3), 1373–1390.

Forestan, C., y Varotto, S. (2012). The role of PIN auxin efflux carriers in polar auxin transport and accumulation and their effect on shaping maize development. *Molecular Plant*, *5*(4), 787–798.

Forster, B. P., Heberle-Bors, E., Kasha, K. J., y Touraev, A. (2007). The resurgence of haploids in higher plants. *Trends in Plant Science*, *12*(8), 368–375.

Frébort, I., Kowalska, M., Hluska, T., Frébortová, J., y Galuszka, P. (2011). Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany*, *62*(8), 2431–2452.

Freire, M. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnologia Vegetal*, *3*(4).

Friis, E. M., Pedersen, K. R., y Crane, P. R. (2010). Diversity in obscurity: Fossil flowers and the early history of angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *365*, 369–382.

Fry, S. C. (1988). The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. *Longman Group Limited*.

Galuszka, P., Frébortová, J., Yamada, M., Strnad, M., Schmülling, T., y Frébort, I. (2004). Cytokinin oxidase / dehydrogenase genes in barley and wheat Cloning and heterologous expression. *European Journal of Biochemistry*, *271*, 3990–4002.

Gamborg, O. L., Miller, R. A., y Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, *50*(1), 151–158.

Gan, S., y Amasino, R. M. (1995). Inhibition of Leaf Senescence by Autoregulated Production of Cytokinin. *Science*, *270*(5244), 1986–1988.

Gao, M., y Showalter, A. M. (1999). Yariv reagent treatment induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement. *The Plant Journal*, *19*(3), 321–331.

García-Martín, G., Manzanera, J. A., y González-Benito, M. E. (2005). Effect of exogenous ABA on embryo maturation and quantification of endogenous levels of ABA and IAA in *Quercus suber* somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *80*, 171–177.

Garstang, J. R., Spink, J. H., Suleimenov, M., Schillinger, W. F., Mckenzie, R. H., Tanaka, D. L., Ceccarelli, S., Grando, S., Paynter, B. H., y Fettell, N. A. (2011). Cultural Practices: Focus on Major Barley-Producing Regions. *Barley: Production, Improvement, and Uses*, 221–281. Blackwell Publishing Ltd.

Gaspar, Y., Johnson, K. L., Mckenna, J. A., Bacic, A., y Schultz, C. J. (2001). The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. *Plant Molecular Biology*, *47*, 161–176.

Ge, Y., Cai, Y. M., Bonneau, L., Rotari, V., Danon, A., McKenzie, E. A., McLellan, H., MacH, L., y Gallois, P. (2016). Inhibition of cathepsin B by caspase-3 inhibitors blocks programmed cell death in *Arabidopsis*. *Cell Death and Differentiation*, *23*, 1493–1501.

Gepstein, S., Sabehi, G., Carp, M. J., Hajouj, T., Nesher, M. F. O., Yariv, I., Dor, C., y Bassani, M. (2003). Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. *The Plant Journal*, *36*(5), 629–642.

Germanà, M. A. (2009). Haploids and Doubled Haploids in Fruit Trees. *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, 241–263.

Germanà, M. A., y Lambardi, M. (2016). *In vitro* Embryogenesis in Higher Plants, *Methods*, 1359. Springer New York.

Germanà, M.A. (2011). Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *104*, 283–300.

Germanà, M. A., Chiancone, B., Guarda, N. L., Testillano, P. S., y Risueño, M. C. (2006). Development of multicellular pollen of *Eriobotrya japonica* Lindl. through anther culture. *Plant Science*, *171*(6), 718–725.

Geshi, N., Johansen, J. N., Dilokpimol, A., Rolland, A., Belcram, K., Verger, S., Kotake, T., Tsumuraya, Y., Kaneko, S., Tryfona, T., Dupree, P., Scheller, H. V., Höfte, H., y Mouille, G. (2013). A galactosyltransferase acting on arabinogalactan protein glycans is essential for embryo development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *76*(1), 128–137.

Goldberg, R. B., Barker, S. J., y Perez-Grau, L. (1989). Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell*, *56*, 149–160.

Goldberg, R. B., Paiva, G. De, y Yadegari, R. (1994). *Plant Embryogenesis: Zygote to Seed*. *266*.

Gómez-Cadenas, A., de Ollas, C., Manzi, M., y Arbona, V. (2014). Phytohormonal Crosstalk Under Abiotic Stress. *Phytohormones: A Window to Metabolism, Signaling and Biotechnological Applications* , 289–321. Springer.

Gómez-Cadenas, A., Pozo, O. J., García-Augustín, P., y Sancho, J. V. (2002). Direct analysis of abscisic acid in crude plant extracts by liquid chromatography - Electrospray/tandem mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, *13*(4), 228–234.

Gomez-Jimenez, M. C., y Matilla, A. J. (2006). Cloning of a cDNA-encoding ACC synthase and its mRNA expression during zygotic embryogenesis of chick-pea (*Cicer arietinum* L.) seeds. *Plant Growth Regulation*, *50*, 101–110.

González-Melendi, P., Ramírez, C., Testillano, P. S., Kumlehn, J., y Risueño, M. C. (2005). Three dimensional confocal and electron microscopy imaging define the dynamics and mechanisms of diploidisation at early stages of barley microspore-derived embryogenesis. *Planta*, *222*, 47–57.

Gozález-Melendi, P., Testillano, P. S., Fadn, B., Vicente, O., y Risuefio, M. C. (1995). In situ characterization of the late vacuolate microspore as a convenient stage to induce embryogenesis in *Capsicum*. *Protoplasma*, *187*, 60–71.

Greenbaum, D., Medzihradszky, K. F., Burlingame, A., y Bogyo, M. (2000). Epoxide electrophiles as activity-dependent cysteine protease profiling and discovery tools. *Chemistry and Biology*, *7*(8), 569–581.

Greenberg, J. T. (1996). Programmed cell death: A way of life for plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*, 12094–12097.

Grefen, C., y Harter, K. (2004). Plant two-component systems: principles, functions, complexity and cross talk. *Planta*, *219*(5).

Grones, P., y Friml, J. (2015). ABP1: Finally docking. *Molecular Plant*, *8*, 356–358.

Grudkowska, M., y Zagdańska, B. (2004). Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica*, *51*(3), 609–624.

Guha, S, y Maheshwari, S. C. (1964). *In vitro* production of embryos form anthers of Datura. *Nature*, *204*, 497.

Guha, S., y Maheshwari, S. C. (1966). Cell Division and Differentiation of Embryos in the Pollen Grains of Datura *in vitro*. *Nature*, *212*(5057), 97–98.

Guilfoyle, T. J. (2015). The PB1 Domain in Auxin Response Factor and Aux / IAA Proteins : A Versatile Protein Interaction Module in the Auxin Response. *Plant Cell*, *27*, 33–43.

Gunawardena, A. H. L. A. N., Greenwood, J. S., y Dengler, N. G. (2004). Programmed Cell Death Remodels Lace Plant Leaf Shape during Development. *Plant Cell*, *16*, 60–73.

Gurushidze, M., Hensel, G., Hiekel, S., Schedel, S., Valkov, V., y Kumlehn, J. (2014). True-breeding targeted gene knock-out in barley using designer TALE-nuclease in haploid cells. *PLoS ONE*, *9*(3), 1–9.

Ha, S., Vankova, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., y Tran, L.-S. P. (2012). Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. *Trends in Plant Science*, *17*(3), 172–179.

Haberlandt, G. (1913). *Zur Physiologie der Zellteilung*.

Hafrén, A., Macia, J. L., Love, A. J., Milner, J. J., Drucker, M., y Hofius, D. (2017). Selective autophagy limits cauliflower mosaic virus infection by NBR1-mediated targeting of viral capsid protein and particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*, E2026–E2035.

Hakman, I., Hallberg, H., y Palovaara, J. (2009). The polar auxin transport inhibitor NPA impairs embryo morphology and increases the expression of an auxin efflux facilitator protein PIN during *Picea abies* somatic embryo development. *Tree Physiology*, *29*, 483–496.

Han, T., Dong, H., Cui, J., Li, M., Lin, S., Cao, J., y Huang, L. (2017). Genomic, molecular evolution, and expression analysis of genes encoding putative classical AGPs, lysine-rich AGPs, and AG peptides in *Brassica rapa*. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1–16.

Hatsugai, N., Yamada, K., Goto-Yamada, S., y Hara-Nishimura, I. (2015). Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death. *Frontiers in Plant Science*, *6*(234), 1–11.

Havé, M., Balliau, T., Cottyn-Boitte, B., Dérond, E., Cueff, G., Soulay, F., Lornac, A., Reichman, P., Dissmeyer, N., Avice, J. C., Gallois, P., Rajjou, L., Zivy, M., y Masclaux-Daubresse, C. (2018). Increases in activity of proteasome and papain-like cysteine protease in *Arabidopsis* autophagy mutants: back-up compensatory effect or cell-death promoting effect? *Journal of Experimental Botany*, *69*(6), 1369–1385.

He, W., Brumos, J., Li, H., Ji, Y., Ke, M., Gong, X., Zeng, Q., Li, W., Zhang, X., An, F., Wen, X., Li, P., Chu, J., Sun, X., Yan, C., Yan, N., Xie, D. Y., Raikhel, N., Yang, Z., … Guo, H. (2011). A small-molecule screen identifies L-Kynurenine as a competitive inhibitor of TAA1/TAR activity in Ethylene-Directed Auxin Biosynthesis and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *23*, 3944–3960.

Hernández, I., Celestino, C., y Toribio, M. (2003). Vegetative propagation of Quercus suber L. by somatic embryogenesis: I. Factors affecting the induction in leaves from mature cork oak trees. *Plant Cell Reports*, *21*, 759–764.

Hicks, G. R., y Raikhel, N. V. (2012). Small molecules present large opportunities in plant biology. *Annual Review of Plant Biology*, *63*, 261–282.

Hirose, N., Makita, N., Yamaya, T., y Sakakibara, H. (2005). Functional Characterization and Expression Analysis of a Gene , OsENT2 , Encoding an Equilibrative Nucleoside Transporter in Rice Suggest a Function in Cytokinin Transport 1. *Plant Physiology*, *138*, 196–206.

Hnatuszko-Konka, K., Gerszberg, A., Weremczuk-Jeżyna, I., y Grzegorczyk-Karolak, I. (2021). Cytokinin signaling and de novo shoot organogenesis. *Genes*, *12*(2), 1–20.

Hofius, D., Li, L., Hafrén, A., y Coll, N. S. (2017). Autophagy as an emerging arena for plant–pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, *38*, 117–123.

Houston Durrant, T., de Rigo, D., y Caudullo, G. (2016). *Quercus Suber*: Distribution, Habitat, Usage, and Threats., *European Atlas of Forest Tree Species*, 164–165.

Houston, K., Tucker, M. R., Chowdhury, J., Shirley, N., y Little, A. (2016). The plant cell wall: A complex and dynamic structure as revealed by the responses of genes under stress conditions. *Frontiers in Plant Science*, *7*(984), 1–18.

Hunter, C. P. (1988). Plant regeneration from microspores of barley *Hordeun vulgare* L. Tesis University of London.

Hurný, A., Cuesta, C., Cavallari, N., Ötvös, K., Duclercq, J., Dokládal, L., Montesinos, J. C., Gallemí, M., Semerádová, H., Rauter, T., Stenzel, I., Persiau, G., Benade, F., Bhalearo, R., Sýkorová, E., Gorzsás, A., Sechet, J., Mouille, G., Heilmann, I., … Benková, E. (2020). SYNERGISTIC ON AUXIN AND CYTOKININ 1 positively regulates growth and attenuates soil pathogen resistance. *Nature Communications*, *11*, 1–17.

Hutchison, C. E., y Kieber, J. J. (2002). Cytokinin Signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *14*(suppl 1), S47–S59.

Huysmans, M., Lema A, S., Coll, N. S., y Nowack, M. K. (2017). Dying two deaths - programmed cell death regulation in development and disease. *Current Opinion in Plant Biology*, *35*, 37–44.

Hwang, I., y Sakakibara, H. (2006). Cytokinin biosynthesis and perception. *Physiologia Plantarum*, *126*(4), 528–538.

Hwang, I., Sheen, J., y Müller, B. (2012). Cytokinin Signaling Networks. *Annual Review of Plant Biology*, *63*(1), 353–380.

Ibáñez, S., Carneros, E., Testillano, P. S., y Pérez-Pérez, J. M. (2020). Advances in plant regeneration: Shake, rattle and roll. *Plants*, *9*(7), 1–19.

Islam, S. M. S., y Tuteja, N. (2012). Enhancement of androgenesis by abiotic stress and other pretreatments in major crop species. *Plant Science*, *182*, 134–144.

Ivanov Dobrev, P., y Kamínek, M. (2002). Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, *950*, 21–29.

Jain, S. M., Sopory, S. K., y Veilleux, R. E. (1996). *In vitro* Haploid Production in Higher Plants. *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*. Springer.

J**ames, M., Masclaux-Daubresse, C., Marmagne, A., Azzopardi, M., Laîné, P., Goux, D., Etienne, P., y Trouverie, J. (2019)**. A new role for SAG12 cysteine protease in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, *9*(1998), 1–11.

James, M., Poret, M., Masclaux-Daubresse, C., Marmagne, A., Coquet, L., Jouenne, T., Chan, P., Trouverie, J., y Etienne, P. (2018). SAG12, a major cysteine protease involved in nitrogen allocation during senescence for seed production in *Arabidopsis* thaliana. *Plant and Cell Physiology*, *59*(10), 2052–2063.

Jameson, P. E., y Song, J. (2015). Cytokinin: A key driver of seed yield. *Journal of Experimental Botany*, *67*(3), 593–606.

Janeiro, L. V., Vieitez, A. M., y Ballester, A. (1996). Cryopreservation of somatic embryos and embryonic axes of *Camellia japonica* L. *Plant Cell Reports*, *15*, 699–703.

Johri, B. M., y Srivastava, P. S. (2001). Reproductive Biology of Plants. Springer

Johri, Brij M., Ambegaokar, K. B., y Srivastava, P. S. (2001). Comparative Embryology of Angiosperms. Springer Science y Business Media.

Jolie, R. P., Duvetter, T., van Loey, A. M., y Hendrickx, M. E. (2010). Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: A review. *Carbohydrate Research*, *345*(18), 2583–2595.

Jones, B., Gunnerås, S. A., Petersson, S. V., Tarkowski, P., Graham, N., May, S., Dolezal, K., Sandberg, G., y Ljung, K. (2010). Cytokinin Regulation of Auxin Synthesis in *Arabidopsis* Involves a Homeostatic Feedback Loop Regulated via Auxin and Cytokinin Signal Transduction. *The Plant Cell*, *22*(9), 2956–2969.

Juge, N. (2006). Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes. *Trends in Plant Science*, *11*(7), 359–367.

Jung, M., Lee, J., Seo, H. Y., Lim, J. S., y Kim, E. K. (2015). Cathepsin inhibition-induced lysosomal dysfunction enhances pancreatic beta-cell apoptosis in high glucose. *PLoS ONE*, *10*(1), 1–18.

Jürgens, G. (1995). Axis formation in plant embryogenesis: Cues and clues. *Cell*, *81*, 467–470.

Kamiya, Y. (2010). Plant Hormones: Versatile Regulators of Plant Growth and Development. *Annual Review of Plant Biology*, *61*(1).

Kang, J., Lee, Y., Sakakibara, H., y Martinoia, E. (2017). Cytokinin Transporters : GO and STOP in Signaling. *Trends in Plant Science*, *22*(6), 455–461.

Kang, J., Park, J., Choi, H., Burla, B., Kretzschmar, T., Lee, Y., y Martinoia, E. (2011). Plant ABC Transporters. *The Arabidopsis Book*, 1–25.

Karami, O., y Saidi, A. (2010). The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. *Molecular Biology Reports*, *37*, 2493–2507.

Karunaratne, S., Gamage, C., y Kovoor, A. (1991). Leaf Maturity, a Critical Factor in Embryogenesis. *Journal of Plant Physiology*, *139*, 27–31.

Kasahara, H., Takei, K., Ueda, N., Hishiyama, S., Yamaya, T., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., y Sakakibara, H. (2004). Distinct Isoprenoid Origins of cis - and trans- Zeatin Biosyntheses in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(14), 14049–14054.

Kasha, K. J. (1974). Haploids in higher plants: advances and pontential. *The Office of Continuing Education, University of Guelph Press*.

Kasha, K. J., Hu, T. C., Oro, R., Simion, E., y Shim, Y. S. (2001). Nuclear fusion leads to chromosome doubling during mannitol pretreatment of barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores. *Journal of Experimental Botany*, *52*(359), 1227–1238.

Keegstra, K. (2010). Plant cell walls. *Plant Physiology* (Vol. 154).

Kieber, J. J., y Schaller, G. E. (2014). Cytokinins. *The Arabidopsis Book*. https://doi.org/10.1199/tab.0168

Kieber, J. J., y Schaller, G. E. (2018). Cytokinin signaling in plant development. *Development*, *145*(4), 1–7.

Kim, J. (2008). Phosphorylation of A-Type ARR to function as negative regulator of cytokinin signal transduction. *Plant Signaling y Behavior*, *3*(5), 348–350.

Klimaszewska, K., Hargreaves, C., Lelu-Walter, M. A., y Trontin, J. F. (2016). Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000. *Methods in Molecular Biology*.

Klionsky, D. J. (2008). Autophagy revisited: A conversation with Christian de Duve. *Autophagy*, *4*(6), 740–743.

Klionsky, D. J., y Schulman, B. A. (2014). Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive ubiquitin-like proteins. *Nature Structural y Molecular Biology*, *21*(4), 336–345.

Ko, D., y Helariutta, Y. (2017). Minireview Shoot – Root Communication in Flowering Plants. *Current Biology*, *27*, 973–978.

Ko, D., Kang, J., Kiba, T., Park, J., Kojima, M., Do, J., Kim, K. Y., Kwon, M., Endler, A., Song, W.-Y., Martinoia, E., Sakakibara, H., y Lee, Y. (2014). *Arabidopsis* ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. *PNAS*, *111*(19), 7150–7155.

Koehler, S. M., y Ho, T. H. D. (1990). Hormonal regulation, processing, and secretion of cysteine proteinases in barley aleurone layers. *Plant Cell*, *2*(8), 769–783.

Korasick, D. A., Enders, T. A., y Strader, L. C. (2013). Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany*, *64*(9), 2541–2555.

Krouk, G., Lacombe, B., Bielach, A., Perrine-walker, F., Malinska, K., Mounier, E., Hoyerova, K., Tillard, P., Leon, S., Ljung, K., Zazimalova, E., Benkova, E., Nacry, P., y Gojon, A. (2010). Article Defines a Mechanism for Nutrient Sensing in Plants. *Developmental Cell*, *18*, 927–937.

Kumlehn, J., Serazetdinova, L., Hensel, G., Becker, D., y Loerz, H. (2006). Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnology Journal*, *4*(2), 251–261.

Kuroha, T., Tokunaga, H., Kojima, M., Ueda, N., Ishida, T., Nagawa, S., Fukuda, H., Sugimoto, K., y Sakakibara, H. (2009). Functional Analyses of LONELY GUY Cytokinin-Activating Enzymes Reveal the Importance of the Direct Activation Pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *21*(10), 3152–3169.

Kurosaki, F., Takahashi, S., Shudo, K., Okamoto, T., y Isogai, Y. (1981). Structure and biological links between urea and purine cytokinins. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *29*, 3751–3753.

Kurusu, T., Koyano, T., Hanamata, S., Kubo, T., Noguchi, Y., Yagi, C., Nagata, N., Yamamoto, T., Ohnishi, T., Okazaki, Y., Kitahata, N., Ando, D., Ishikawa, M., Wada, S., Miyao, A., Hirochika, H., Shimada, H., Makino, A., Saito, K., … Kuchitsu, K. (2014). OsATG7 is required for autophagy-dependent lipid metabolism in rice postmeiotic anther development. *Autophagy*, *10*(5), 878–888.

Kyo, M., y Harada, H. (1986). Control of the developmental pathway of tobacco pollen *in vitro*. *Planta*, *168*, 427–432.

Lamb, C. A., Yoshimori, T., y Tooze, S. A. (2013). The autophagosome: Origins unknown, biogenesis complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *14*, 759–774.

Lamport, D. T. A., Kieliszewski, M. J., y Showalter, A. M. (2006). Salt stress upregulates periplasmic arabinogalactan proteins: Using salt stress to analyse AGP function. *New Phytologist*, *169*, 479–492.

Laplaze, L., Benkova, E., Casimiro, I., Maes, L., Vanneste, S., Swarup, R., Weijers, D., Calvo, V., Parizot, B., Herrera-Rodriguez, M. B., Offringa, R., Graham, N., Doumas, P., Friml, J., Bogusz, D., Beeckman, T., y Bennett, M. (2007). Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *Plant Cell*, *19*(12), 3889–3900.

Larsson, E., Sitbon, F., Ljung, K., y Von Arnold, S. (2008). Inhibited polar auxin transport results in aberrant embryo development in Norway spruce. *New Phytologist*, *177*, 356–366.

Lavy, M., y Estelle, M. (2016). Mechanisms of auxin signaling. *Development (Cambridge)*, *143*, 3226–3229. Leal, F., Pinto-Carnide, O., Guedes-Pinto, H., y Pais, M. S. (2004). Embryogenesis and plant regeneration in vitis vinifera l by anther culture. *Acta Horticulturae*, *652*, 447–451.

Lee, B., Johnston, R., Yang, Y., Gallavotti, A., Kojima, M., Travençolo, B. A. N., Costa, L. da F., Sakakibara, H., y Jackson, D. (2009). Studies of aberrant phyllotaxy1 Mutants of Maize Indicate Complex Interactions between Auxin and Cytokinin Signaling in the Shoot Apical Meristem. *Plant Physiology*, *150*(1), 205–216.

Lee, P. N. H. (2017). Roles of Pectin Methylesterases and Pectin Methylesterase Inhibitors in Plant Physiology. *The Journal of Agricultural, Life and Environmental Sciences*, 1–17. Lelu, M. A., Bastien, C., Drugeault, A., Gouez, M. L., y Klimaszewska, K. (1999). Somatic embryogenesis and plantlet development in Pinus sylvestris and *Pinus pinaster* on medium with and without growth regulators. *Physiologia Plantarum*, *105*, 719–728.

Leroux, C., Bouton, S., Kiefer-Meyer, M. C., Fabrice, T. N., Mareck, A., Guénin, S., Fournet, F., Ringli, C., Pelloux, J., Driouich, A., Lerouge, P., Lehner, A., y Mollet, J. C. (2015). PECTIN METHYLESTERASE48 is involved in *Arabidopsis* pollen grain germination. *Plant Physiology*, *167*, 367–380.

Leszczuk, A., Chylinska, M., y Zdunek, A. (2019). Distribution of arabinogalactan proteins and pectins in the cells of apple (*malus × domestica*) fruit during post-harvest storage. *Annals of Botany*, *123*, 47–55.

Letham, D. S. (1963). Zeatin, a factor inducing cell division isolated from. *Life Sciences*, *2*(8), 569–573.

Letham, D. S. (1994). Cytokinins as phytohormones-sites of biosynthesis, translocation, and function of translocated cytokinin. *Cytokinins: Chemistry, Activity and Function*, 57–80.

Levesque-Tremblay, G., Müller, K., Mansfield, S. D., y Haughn, G. W. (2015). Highly methyl esterified seeds is a pectin methyl esterase involved in embryo development. *Plant Physiology*, *167*, 725–737.

L**evesque-Tremblay, G., Pelloux, J., Braybrook, S. A., y Müller, K. (2015).** Tuning of pectin methylesterification: consequences for cell wall biomechanics and development. *Planta*, *242*, 791–811.

Lewis, K. C., Selzer, T., Shahar, C., Udi, Y., Tworowski, D., y Sagi, I. (2008). Inhibition of pectin methyl esterase activity by green tea catechins. *Phytochemistry*, *69*, 2586–2592.

Leyser, O. (2018). Auxin signaling. *Plant Physiology*, *176*(1), 465–479.

Li, G., Liu, K., Baldwin, S. A., y Wang, D. (2003). Equilibrative Nucleoside Transporters of *Arabidopsis thaliana*. cDNA cloning, expression pattern, and analysis of transport activities. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(37), 35732–35742.

Li, N., Zhang, D. S., Liu, H. S., Yin, C. S., Li, X. X., Liang, W. Q., Yuan, Z., Xu, B., Chu, H. W., Wang, J., Wen, T. Q., Huang, H., Luo, D., Hong, M., y Zhang, D. B. (2006). The rice tapetum degeneration retardation gene is required for tapetum degradation and anther development. *Plant Cell*, *18*(11), 2999–3014.

Li, Y., Song, G., Gao, J., Zhang, S., Zhang, R., Li, W., Chen, M., Liu, M., Xia, X., Risacher, T., y Li, G. (2018). Enhancement of grain number per spike by RNA interference of cytokinin oxidase 2 gene in bread wheat. *Hereditas*, *155*(33), 1–8.

Liao, Y. Y., Buckhout, T. J., y Schmidt, W. (2011). Phosphate deficiency-induced cell wall remodeling: Linking gene networks with polysaccharide meshworks. *Plant Signaling and Behavior*, *6*(5), 700–702.

Lichter, R. (1982). Induction of Haploid Plants From Isolated Pollen of *Brassica napus*. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, *105*(5), 427–434.

Lionetti, V., Fabri, E., De Caroli, M., Hansen, A. R., Willats, W. G. T., Piro, G., y Bellincampi, D. (2017). Three pectin methylesterase inhibitors protect cell wall integrity for *Arabidopsis* immunity to Botrytis. *Plant Physiology*, *173*(3), 1844–1863.

Liu, C.-J., Zhao, Y., y Zhang, K. (2019). Cytokinin Transporters : Multisite Players in Cytokinin Homeostasis and Signal Distribution. *Frontiers in Plant Science*, *10*(693), 1–9.

Liu, H., Hu, M., Wang, Q., Cheng, L., y Zhang, Z. (2018). Role of papain-like cysteine proteases in plant development. *Frontiers in Plant Science*, *871*, 1–10.

Liu, Juan, Sharma, A., Niewiara, M. J., Singh, R., Ming, R., y Yu, Q. (2018). Papain-like cysteine proteases in *Carica papaya*: Lineage-specific gene duplication and expansion. *BMC Genomics*, *19*(26), 1–12.

Liu, Junli, Moore, S., Chen, C., y Lindsey, K. (2017). Crosstalk Complexities between Auxin, Cytokinin, and Ethylene in *Arabidopsis* Root Development: From Experiments to Systems Modeling, and Back Again. *Molecular Plant*, *10*(12), 1480–1496.

Liu, Y., y Bassham, D. C. (2012). Autophagy: Pathways for self-eating in plant cells. *Annual Review of Plant Biology*, *63*, 215–237.

Ljung, K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, *140*, 943–950.

Locascio, A., Roig-Villanova, I., Bernardi, J., y Varotto, S. (2014). Current perspectives on the hormonal control of seed development in *Arabidopsis* and maize: A focus on auxin. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 1–22.

Locato, V., Paradiso, A., Sabetta, W., de Gara, L., y de Pinto, M. C. (2016). Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in PCD Signaling. *Advances in Botanical Research*, *77*, 165–192.

Locato, V. y De Gara, L. (2018). Programmed cell death in plants: An overview. *Methods in Molecular Biology*, *1743*, 1–8.

Lomin, S N, Krivosheev, D. M., Steklov, M. Y., Osolodkin, D. I., y Romanov, G. A. (2012). Receptor Properties and Features of Cytokinin Signaling. *Acta Naturae*, *4*(3), 31–45.

Lomin, S. N., Krivosheev, D. M., Steklov, M. Y., Arkhipov, D. V, Osolodkin, D. I., Schmülling, T., y Romanov, G. A. (2015). Plant membrane assays with cytokinin receptors underpin the unique role of free cytokinin bases as biologically active ligands. *Journal of Experimental Botany*, *66*(7), 1851–1863.

Lopes, A. L., Costa, M. L., Sobral, R., Costa, M. M., Amorim, M. I., y Coimbra, S. (2016). Arabinogalactan proteins and pectin distribution during female gametogenesis in *Quercus suber* L. *Annals of Botany*, *117*, 949–961.

López de Heredia, U., y Gil, L. (2006). La diversidad en las especies forestales: un cambio de escala. El ejemplo del alcornoque. *Ecosistemas*, *15*(2), 24–33.

Losada, J. M., y Herrero, M. (2012). Arabinogalactan-protein secretion is associated with the acquisition of stigmatic receptivity in the apple flower. *Annals of Botany*, *110*, 573–584.

Losada, J. M., y Herrero, M. (2014). Glycoprotein composition along the pistil of *Malus x domestica* and the modulation of pollen tube growth. *BMC Plant Biology*, *14*(1), 1–14.

Losada, J. M., Herrero, M., Hormaza, J. I., y Friedman, W. E. (2014). Arabinogalactan proteins mark stigmatic receptivity in the protogynous flowers of *Magnolia virginiana* (Magnoliaceae). *American Journal of Botany*, *101*(11), 1963–1975.

Louvet, R., Cavel, E., Gutierrez, L., Guénin, S., Roger, D., Gillet, F., Guerineau, F., y Pelloux, J. (2006). Comprehensive expression profiling of the pectin methylesterase gene family during silique development in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, *224*, 782–791.

Loyola-Vargas, V. M., y Ochoa-Alejo, N. (2016). Somatic embryogenesis: Fundamental aspects and applications. Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications. Springer.

Ma, Y., Zeng, W., Bacic, A., y Johnson, K. (2018). AGPs Through Time and Space . *Annual Plant Reviews online*, Vol. 1.

Magoon, M. L., y Khanna, K. R. (1963). Haploids. *Caryologia*, *16*(1), 191–235.

Maheshwari, P. (1950). An Introduction to he Embryology of Angiosperms. McGraw-Hill Book Company.

Mahonen, A. P., Bonke, M., Riikonen, M., Benfey, Y., y Helariuta, Y. (2000). A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes y Development*, *14*(23), 2938–2943.

Majewska-sawka, A., y Nothnagel, E. A. (2000). Update on Extracellular Matrix The Multiple Roles of Arabinogalactan Proteins in Plant Development 1 COMPLEX STRUCTURES AMENABLE TO. *Plant Physiology*, *122*, 3–10.

Makowska, K., Kałużniak, M., Oleszczuk, S., Zimny, J., Czaplicki, A., y Konieczny, R. (2017). Arabinogalactan proteins improve plant regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *131*, 247–257.

Malik, M. R., Wang, F., Dirpaul, J. M., Zhou, N., Hammerlindl, J., Keller, W., Abrams, S. R., Ferrie, A. M. R., y Krochko, J. E. (2008). Isolation of an embryogenic line from non-embryogenic *Brassica napus* cv. Westar through microspore embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*, *59*(10), 2857–2873.

Maluszynski, M., Kasha, K. J., Forster, B. P., y Szarejko, I. (2003). Doubled Haploid Production in Crop Plants. *Doubled Haploid Production in Crop Plants*. Springer.

Man, S. M., y Kanneganti, T. D. (2016). Regulation of lysosomal dynamics and autophagy by CTSB/cathepsin B. *Autophagy*, *12*(12), 2504–2505.

Mansfield, S. G., Briarty, L. G., y Erni, S. (1991). Mansfield, S. G., Briarty, L. G., y Erni, S. (1991). Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. I. The mature embryo sac. *Canadian Journal of Botany*, *69*, 447–460.

Manzanera, J. A., Astorga, R., y Bueno, M. A. (1993). Somatic Embryo Induction and Germination in *Quercus suber* L. *Silvae Genetica*, *42*, 90–93.

Maraschin, S. F., De Priester, W., Spaink, H. P., y Wang, M. (2005). Androgenic switch: An example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *Journal of Experimental Botany*, *56*(417), 1711–1726.

Marinkovié, N., y Radojevié, L. (1992). The influence of bud length, age of the tree and culture media on androgenesis induction in *Aesculus carnea* Hayne anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *31*, 51–59.

Márquez-López, R. E., Quintana-Escobar, A. o., y Loyola-Vargas, V. M. (2019). Cytokinins , the Cinderella of plant growth regulators. *Phytochem Rev*, *18*, 1387–1408.

Marshall, R. S., y Vierstra, R. D. (2018). Autophagy: The Master of Bulk and Selective Recycling. *Annual Review of Plant Biology*, *69*, 173–208.

Martin, R. C., Mok, M. C., Habben, J. E., y Mok, D. W. S. (2001). A maize cytokinin gene encoding an O-glucosyltransferase specific to cis-zeatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(10), 5922–5926.

Martinez, M., y Diaz, I. (2008). The origin and evolution of plant cystatins and their target cysteine proteinases indicate a complex functional relationship. *BMC Evolutionary Biology*, *8*(198), 1–12.

Mascher, M., Gundlach, H., Himmelbach, A., Beier, S., Twardziok, S. O., Wicker, T., Radchuk, V., Dockter, C., Hedley, P. E., Russell, J., Bayer, M., Ramsay, L., Liu, H., Haberer, G., Zhang, X. Q., Zhang, Q., Barrero, R. A., Li, L., Taudien, S., … Stein, N. (2017). A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome. *Nature*, *544*, 427–433.

Masclaux-Daubresse, C., Chen, Q., y Havé, M. (2017). Regulation of nutrient recycling via autophagy. *Current Opinion in Plant Biology*, *39*, 8–17.

Matsuoka, K., Higuchi, T., Maeshima, M., y Nakamura, K. (1997). A vacuolar-type H+-ATPase in a nonvacuolar organelle is required for the sorting of soluble vacuolar protein precursors in tobacco cells. *Plant Cell*, *9*(4), 533–546.

Matsuura, A., Tsukada, M., Wada, Y., y Ohsumi, Y. (1997). Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, *192*(2), 245–250.

Mattsson, J., Ckurshumova, W., y Berleth, T. (2003). Auxin signaling in *Arabidopsis* leaf vascular development. *Plant Physiology*, *131*, 1327–1339.

Mauri, P. V., y Manzanera, J. A. (2003). Induction, maturation and germination of holm oak (*Quercus ilex* L.) somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *74*, 229–235.

Mayakaduwa, D. M. R. G., y Silva, T. D. (2018). Anther Culture as a Supplementary Tool for Rice Breeding. *Rice Crop - Current Developments*, 1–16.

McKim, S. M., Koppolu, R., y Schnurbusch, T. (2018). Barley Inflorescence Architecture. *The Barley Genome*, 171–208. Springer International Publishing.

McLuskey, K., y Mottram, J. C. (2015). Comparative structural analysis of the caspase family with other clan CD cysteine peptidases. *Biochemical Journal*, *466*, 219–232.

McNeil, M., Darvill, A. G., Fry, S. C., y Albersheim, P. (1984). Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annual Review of Biochemistry*, *53*, 625–663.

McRae, D. H., y Bonner, J. (1953). Chemicai Structure and Antiauxin Activity. *Physiologia Plantarum*, *6*(3), 485–510.

McSteen, P. (2010). Auxin and Monocot Development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(3), 1–17.

Merkle, S.A., Parrott, W. A., y Flinn, B. S. (1995). Morphogenic Aspects of Somatic Embryogenesis. *In vitro* Embryogenesis in Plants, Vol. 20, 155–203.

Merkle, Scott A., y Dean, J. F. D. (2000). Forest tree biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, *11*, 298–302.

Miersch, O. (1991). Synthesis of (±)-(10-2H, 11-2H2,12-2H3)Jasmonic Acid Otto Miersch. 1727–1729.

Mikkonen, A., Porali, I., Cercos, M., y Ho, T. H. D. (1996). A major cysteine proteinase, EPB, in germinating barley seeds: Structure of two intronless genes and regulation of expression. *Plant Molecular Biology*, *31*(2), 239–254.

Miller, C. O. (1961). A Kinetin-Like Compound in Maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *47*(2), 170–174.

Miller, C. O., Skoog, F., Von Saltza, M. H., y Strong, F. M. (1955). Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society*, *77*, 1392.

Minina, E. A., Filonova, L. H., Fukada, K., Savenkov, E. I., Gogvadze, V., Clapham, D., Sanchez-Vera, V., Suarez, M. F., Zhivotovsky, B., Daniel, G., Smertenko, A., y Bozhkov, P. V. (2013). Autophagy and metacaspase determine the mode of cell death in plants. *Journal of Cell Biology*, *203*(6), 917–927.

Minina, E. A., Moschou, P. N., Vetukuri, R. R., Sanchez-Vera, V., Cardoso, C., Liu, Q., Elander, P. H., Dalman, K., Beganovic, M., Lindberg Yilmaz, J., Marmon, S., Shabala, L., Suarez, M. F., Ljung, K., Novák, O., Shabala, S., Stymne, S., Hofius, D., y Bozhkov, P. V. (2018). Transcriptional stimulation of rate-limiting components of the autophagic pathway improves plant fitness. *Journal of Experimental Botany*, *69*(6), 1415–1432.

Minina, E. A., Smertenko, A. P., y Bozhkov, P. V. (2014). Vacuolar cell death in plants. *Autophagy*, *10*(5), 928–929.

Mironova, V., Teale, W., Shahriari, M., Dawson, J., y Palme, K. (2017). The Systems Biology of Auxin in Developing Embryos. *Trends in Plant Science*, *22*(3), 225–235.

Misas-Villamil, J. C., van der Hoorn, R. A. L., y Doehlemann, G. (2016). Papain-like cysteine proteases as hubs in plant immunity. *New Phytologist*, *212*, 902–907.

Mitchell, J. W., Mandava, N., Worley, J. F., Plimmer, J. R., y Smith, M. V. (1970). Brassins—a New Family of Plant Hormones from Rape Pollen. *Nature*, *225*(5237), 1065–1066.

Miyawaki, K., Matsumoto-kitano, M., y Kakimoto, T. (2004). Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis* : tissue speci ® city and regulation by auxin , cytokinin , and nitrate. *The Plant Journal*, *37*, 128–138.

Miyawaki, K., Tarkowski, P., Matsumoto-Kitano, M., Kato, T., Sato, S., Tarkowska, D., Tabata, S., Sandberg, G., y Kakimoto, T. (2006). Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(44), 16598–16603.

Mizushima, N. (2007). Autophagy: Process and function. *Genes and Development*, *21*, 2861–2873.

Mohnen, D. (1999). Biosynthesis of pectins and galactomannans. *Comprehensive Natural Products Chemistry. Carbohydrates and Their Derivatives including Tannins, Cellulose, and Related Lignins, 3*, 497–527. Oxford, Elsevier.

Moiteiro, C., Justino, F., Tavares, R., Marcelo-Curto, M. J., Florêncio, M. H., Nascimento, M. S. J., Pedro, M., Cerqueira, F., y Pinto, M. M. M. (2001). Synthetic secofriedelane and friedelane derivatives as inhibitors of human lymphocyte proliferation and growth of human cancer cell lines *in vitro*. *Journal of Natural Products*, *64*(10), 1273–1277.

Mok, David W S, y Mok, M. C. (2001). Cytokinin Metabolism and Action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *52*, 89–118.

Mok, M. C., Martin, R. C., Dobrev, P. I., Vankova, R., Ho, P. S., Mok, M. C., Vankova, R., Yonekura-sakakibara, K., Sakakibara, H., y Mok, D. W. S. (2005). Topolins and Hydroxylated Thidiazuron Derivatives Are Substrates of Cytokinin O -Glucosyltransferase with Position Specificity Related to Receptor Recognition. *Plant Physiology*, *137*, 1057–1066.

Möller, B., y Weijers, D. (2009). Auxin control of embryo patterning. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *1*(5), 1–13.

Moreno-Risueno, M. A., van Norman, J. M., Moreno, A., Zhang, J., Ahnert, S. E., y Benfey, P. N. (2010). Oscillating Gene Expression Determines Competence for Periodic *Arabidopsis* Root Branching. *Science*, *329*(5997), 1306–1311.

Moriyasu, Y., e Inoue, Y. (2008). Use of protease inhibitors for detecting autophagy in plants. *Methods in enzymology*, Vol. 451. Elsevier Inc.

Moubayidin, L., Di Mambro, R., y Sabatini, S. (2009). Cytokinin–auxin crosstalk. *Trends in Plant Science*, *14*(10), 557–562.

Mühlenbock, P., Plaszczyca, M., Plaszczyca, M., Mellerowicz, E., y Karpinski, S. (2007). Lysigenous aerenchyma formation in *Arabidopsis* is controlled by LESION SIMULATING DISEASE1. *Plant Cell*, *19*, 3819–3830.

Mukae, K., Inoue, Y., y Moriyasu, Y. (2015). ATG5-knockout mutants of physcomitrella provide a platform for analyzing the involvement of autophagy in senescence processes in plant cells. *Plant Signaling and Behavior*, *10*(11), 1–11.

Müller, B., y Sheen, j. (2008). Cytokinin and auxin interplay in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature*, *4*(7198), 1094–1097.

Müller, C. J., Larsson, E., Spíchal, L., y Sundberg, E. (2017). Cytokinin-auxin crosstalk in the gynoecial primordium ensures correct domain patterning. *Plant Physiology*, *175*(3), 1144–

Müller, D., y Leyser, O. (2011). Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. *Annals of Botany*, *107*, 1203–1212.

Müller, K., Levesque-Tremblay, G., Bartels, S., Weitbrecht, K., Wormit, A., Usadel, B., Haughn, G., y Kermode, A. R. (2013). Demethylesterification of cell wall pectins in *Arabidopsis* plays a role in seed germination. *Plant Physiology*, *161*(1), 305–316.

Munné-Bosch, S., y Müller, M. (2013). Hormonal cross-talk in plant development and stress responses. *Frontiers in Plant Science*, *4*(529), 1–2.

Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, *15*(3), 473–497.

Murovec, J., y Bohanec, B. (2012). Haploids and Doubled Haploids in Plant Breeding. *Plant Breeding*, 13.

Nagashima, A., Uehara, Y., y Sakai, T. (2008). The ABC subfamily B auxin transporter AtABCB19 is involved in the inhibitory effects of N-1-naphthyphthalamic acid on the phototropic and gravitropic responses of *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant and Cell Physiology*, *49*(8), 1250–1255.

Nelson, D., y Werck-Reichhart, D. (2011). A P450-centric view of plant evolution. *The Plant Journal*, *66*, 194–211.

Nguema-Ona, E., Coimbra, S., Vicré-Gibouin, M., Mollet, J. C., y Driouich, A. (2012). Arabinogalactan proteins in root and pollen-tube cells: distribution and functional aspects. *Annals of Botany*, *110*(2), 383–404. https://doi.org/10.1093/aob/mcs143

Nic-Can, G. I., y Loyola-Vargas, V. M. (2016). The Role of the Auxins During Somatic Embryogenesis. *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*,171–182. Springer International Publishing.

Niemann, M. C. E., Weber, H., Hluska, T., Leonte, G., Anderson, S. M., Novák, O., Senes, A., y Werner, T. (2018). The Cytokinin Oxidase / Dehydrogenase CKX1 Is a Membrane-Bound Protein Requiring Homooligomerization in the Endoplasmic Reticulum for Its Cellular Activity 1. *Plant Physiology*, *176*, 2024–2039.

Nishii, K., Wright, F., Chen, Y. Y., y Möller, M. (2018). Tangled history of a multigene family: The evolution of ISOPENTENYLTRANSFERASE genes. *PLoS ONE*, *13*(8), 1–23.

Nishimura, T., Toyooka, K., Sato, M., Matsumoto, S., Mercedes Lucas, M., Strnad, M., Baluska, F., y Koshiba, T. (2011). Immunohistochemical observation of indole-3-acetic acid at the IAA synthetic maize coleoptile tips. *Plant Signaling and Behavior*, *6*(12), 2013–2022.

Nitsch, J. P., y Nitsch, C. (1969). Haploid Plants from Pollen Grains. *Science*, *163*(3862), 85–87.

Nomura, T., Itouga, M., Kojima, M., Kato, Y., Sakakibara, H., y Hasezawa, S. (2015). Copper mediates auxin signalling to control cell differentiation in the copper moss *Scopelophila cataractae*. *Journal of Experimental Botany*, *66*(5), 1205–1213.

Nowicka, A., Juzoń, K., Krzewska, M., Dziurka, M., Dubas, E., Kopeć, P., Zieliński, K., y Żur, I. (2019). Chemically-induced DNA de-methylation alters the effectiveness of microspore embryogenesis in *triticale*. *Plant Science*, *287*, 1–12.

O'Neill, M., Albershein, P., y Darvill, A. (1990). The Pectic Polysaccharides of Primary Cell Walls. *Methods in Plant Biochemistry: Volume 2: Carbohydrates*. ACADEMIC PRESS LIMITED.

Ohsumi, Y. (2014). Historical landmarks of autophagy research. *Cell Research*, *24*, 9–23.

Olsen, F. L. (1987). Induction of microspore embryogenesis in cultured anthers of *Hordeum vulgare*. The effects of ammonium nitrate, glutamine and asparagine as nitrogen sources. *Carlsberg Research Communications*, *52*, 393–404.

Oono, Y., Ooura, C., Rahman, A., Aspuria, E. T., Hayashi, K., Tanaka, A., y Uchimiya, H. (2020). p -Chlorophenoxyisobutyric Acid Impairs Auxin Response in *Arabidopsis* Root. *Plant Physiology*, *133*, 1135–1147.

Ormancey, M., Thuleau, P., van der Hoorn, R. A. L., Grat, S., Testard, A., Kamal, K. Y., Boudsocq, M., Cotelle, V., y Mazars, C. (2019). Sphingolipid-induced cell death in *Arabidopsis* is negatively regulated by the papain-like cysteine protease RD21. *Plant Science*, *280*, 12–17.

Pacini, E., y Casadoro, G. (1981). Tapetum plastids of Olea europaea L. *Protoplasma*, *106*(3–4), 289–296.

Pacini, E, y Franchi, G. G. (1983). Pollen grain development in *Smilax aspera* L. and possible functions of the loculus. *Pollen biology and implications in Plant breeding*, 183–190. Elsevier Science publishing Co New York.

Pacini, E., Franchi, G. G., y Hesse, M. (1985). The tapetum: Its form, function, and possible phylogeny in Embryophyta. *Plant Systematics and Evolution*, *149*(3–4), 155–185.

Pak, C., y van Doorn, W. G. (2005). Delay of Iris flower senescence by protease inhibitors. *New Phytologist*, *165*(2), 473–480.

Palmer, C. E., Keller, W., y Kasha, K. J. (2005). Haploids in crop improvement II. Springer.

Panda, B. B., Sekhar, S., Dash, S. K., Behera, L., y Shaw, B. P. (2018). Biochemical and molecular characterisation of exogenous cytokinin application on grain filling in rice. *BMC Plant Biology*, *18*(1), 1–19.

Park, J., Lee, Y., Martinoia, E., y Geisler, M. (2017). Plant hormone transporters : what we know and what we would like to know. *BMC Biology*, *15*(93), 1–15. **Parrot, W. (1993).** Cell-Culture Techniques. *Biotechnology Applications for Banana and Plantain Improvement* (pp. 183–191).

Paulsen, B. S., Craik, D. J., Dunstan, D. E., Stone, B. A., y Bacic, A. (2014). The Yariv reagent: Behaviour in different solvents and interaction with a gum arabic arabinogalactan-protein. *Carbohydrate Polymers*, *106*, 460–468.

Pavlů, J., Novák, J., Koukalová, V., Luklová, M., Brzobohatý, B., y Černý, M. (2018). Cytokinin at the crossroads of abiotic stress signalling pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(8), 1–36.

Peaucelle, A., Braybrook, S. A., Le Guillou, L., Bron, E., Kuhlemeier, C., y Höfte, H. (2011). Pectin-induced changes in cell wall mechanics underlie organ initiation in *Arabidopsis*. *Current Biology*, *21*, 1720–1726.

Peer, W. A., Hosein, F. N., Bandyopadhyay, A., Makam, S. N., Otegui, M. S., Lee, G. J., Blakeslee, J. J., Cheng, Y., Titapiwatanakun, B., Yakubov, B., Bangari, B., y Murphy, A. S. (2009). Mutation of the membrane-associated M1 protease APM1 results in distinct embryonic and seedling developmental defects in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *21*(6), 1693–1721.

Pelloux, J., Rustérucci, C., y Mellerowicz, E. J. (2007). New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in Plant Science*, *12*(6), 267–277.

Peña, L., y Séguin, A. (2001). Recent advances in the genetic transformation of trees. *Trends in Biotechnology*, *19*, 500–506.

Pennell, R. I., y Lamb, C. (1997). Programmed cell death in plants. *Plant Cell*, *9*, 1157–1168.

Pereira, A. M., Lopes, A. L., y Coimbra, S. (2016). Arabinogalactan proteins as interactors along the crosstalk between the pollen tube and the female tissues. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 1–15.

Pereira, A. M., Masiero, S., Nobre, M. S., Costa, M. L., Solís, M. T., Testillano, P. S., Sprunck, S., y Coimbra, S. (2014). Differential expression patterns of arabinogalactan proteins in *Arabidopsis thaliana* reproductive tissues. *Journal of Experimental Botany*, *65*(18), 5459–5471.

P**érez-Pastrana, J., Testillano, P. S., Bárány, I., Canto-Flick, A., Álvarez-López, D., Pijeira-Fernández, G., Avilés-Viñas, S. A., Peña-Yam, L., Muñoz-Ramírez, L., Nahuat-Dzib, S., Islas-Flores, I., y Santana-Buzzy, N. (2021).** Endogenous auxin accumulation/localization during zygotic and somatic embryogenesis of *Capsicum chinense* Jacq. *Journal of Plant Physiology*, *258–259*.

Pérez-Pérez, M. E., Lemaire, S. D., y Crespo, J. L. (2012). Reactive oxygen species and autophagy in plants and algae. *Plant Physiology*, *160*(1), 156–164.

Pérez-Pérez, Y., Bárány, I., Berenguer, E., Carneros, E., Risueño, M. C., y Testillano, P. S. (2019). Modulation of autophagy and protease activities by small bioactive compounds to reduce cell death and improve stress-induced microspore embryogenesis initiation in rapeseed and barley. *Plant Signaling and Behavior*, *14*(2), 1–7.

Pérez-Pérez, Y., El-Tantawy, A. A., Solís, M. T., Risueño, M. C., y Testillano, P. S. (2019). Stress-Induced Microspore Embryogenesis Requires Endogenous Auxin Synthesis and Polar Transport in Barley. *Frontiers in Plant Science*, *10*(1200), 1–16.

Perianez-Rodriguez, J., Manzano, C., y Moreno-Risueno, M. A. (2014). Post-embryonic organogenesis and plant regeneration from tissues: Two sides of the same coin? *Frontiers in Plant Science*, *5*, 1–11.

Pernisova, M., Kuderova, A., y Hejatko, J. (2011). Cytokinin and Auxin Interactions in Plant Development: Metabolism,Signalling, Transport and Gene Expression. *Current Protein y Peptide Science*, *12*(2), 137–147.

Perrin, M., Martin, D., Joly, D., Demangeat, G., This, P., y Masson, J. E. (2001). Medium-dependent response of grapevine somatic embryogenic cells. *Plant Science*, *161*, 107–116.

Petrášek, J., y Friml, J. (2009). Auxin transport routes in plant development. *Development*, *136*, 2675–2688.

Phyo, P., Wang, T., Kiemle, S. N., O'Neill, H., Pingali, S. V., Hong, M., y Cosgrove, D. J. (2017). Gradients in wall mechanics and polysaccharides along growing inflorescence stems. *Plant Physiology*, *175*(4), 1593–1607.

Pils, B., y Heyl, A. (2009). Unraveling the Evolution of Cytokinin Signaling. *Plant Physiology*, *151*, 782–791.

Pintos, B., Martín, L., y Gómez-Garay, A. (2014). Embriogénesis del polen (embriogénesis gamética). *Reduca (Biología). Serie Botánica*, *7*(2), 19–33.

Pintos, B., Manzanera, J. A., y Bueno, M. A. (2007). Antimitotic agents increase the production of doubled-haploid embryos from cork oak anther culture. *Journal of Plant Physiology*, *164*, 1595–1604.

Pintos, B., Manzanera, J. A., y Bueno, M. A. (2010). Oak somatic and gametic embryos maturation is affected by charcoal and specific aminoacids mixture. *Annals of Forest Science*, *67*, 205.

Pintos, B. (2005). *Embriogénesis gamética y obtención de doble haploides en alcornoque quercus suber L.* Tesis Universidad Complutense de Madrid.

Poon, S., Heath, R. L., y Clarke, A. E. (2012). A chimeric arabinogalactan protein promotes somatic embryogenesis in cotton cell culture. *Plant Physiology*, *160*(2), 684–695.

Poręba, M., Strózyk, A., Salvesen, G. S., y Drąg, M. (2013). Caspase substrates and inhibitors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(8).

Prasad, K., y Dhonukshe, P. (2013). Polar Auxin Transport: Cell Polarity to Patterning. *Polar Auxin Transport. Signaling and Communication in Plants,* 17, 25–44. Springer.

Prem, D., Gupta, K., y Agnihotri, A. (2004). Doubled-haploids: a powerful biotechnological tool for genetic enhancement in oilseed Brassicas. *Plant biotechnology and molecular markers*, 18–28. Anamaya Publishers.

Prem, D., Solís, M. T., Bárány, I., Rodríguez-Sanz, H., Risueño, M. C., y Testillano, P. S. (2012). A new microspore embryogenesis system under low temperature which mimics zygotic embryogenesis initials, expresses auxin and efficiently regenerates doubled-haploid plants in *Brassica napus*. *BMC Plant Biology*, *12*, 1–19.

Pritchard, H. N. (1964). A Cytochemical Study of Embryo Development in Stellaria Media. *American Journal of Botany*, *51*(5), 472–479.

Pružinská, A., Shindo, T., Niessen, S., Kaschani, F., Tóth, R., Millar, A. H., y van der Hoorn, R. A. L. (2017). Major Cys protease activities are not essential for senescence in individually darkened *Arabidopsis* leaves. *BMC Plant Biology*, *17*(1), 1–10.

Puigderrajols, P., Fernández-Guijarro, B., Toribio, M., y Molinas, M. (1996). Origin and early development of secondary embryos in *Quercus suber* L. *Int. J. Plant Sci*, *157*, 674–684.

Punwani, J. A., Hutchison, C. E., Schaller, G. E., y Kieber, J. J. (2010). The subcellular distribution of the *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins is independent of cytokinin signaling. *The Plant Journal*, *62*, 473–482.

Qi, H., Xia, F. N., y Xiao, S. (2021). Autophagy in plants: Physiological roles and post-translational regulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, *63*, 161–179.

Rabbani, M. A., Maruyama, K., Abe, H., Khan, M. A., Katsura, K., Ito, Y., Yoshiwara, K., Seki, M., Shinozaki, K., y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003a). Monitoring Expression Profiles of Rice Genes under Cold, Drought, and High-Salinity Stresses and Abscisic Acid Application Using cDNA Microarray and RNA Gel-Blot Analyses. *Plant Physiology*, *133*, 1755–1767.

Radchuk, V., Kumlehn, J., Rutten, T., Sreenivasulu, N., Radchuk, R., Rolletschek, H., Herrfurth, C., Feussner, I., y Borisjuk, L. (2012). Fertility in barley flowers depends on Jekyll functions in male and female sporophytes. *New Phytologist*, *194*(1), 142–157.

Rademacher, E. H., Lokerse, A. S., Schlereth, A., Llavata-Peris, C. I., Bayer, M., Kientz, M., FreireRios, A., Borst, J. W., Lukowitz, W., Jürgens, G., y Weijers, D. (2012). Different Auxin Response Machineries Control Distinct Cell Fates in the Early Plant Embryo. *Developmental Cell*, *22*(1), 211–222.

Rademacher, E. H., Möller, B., Lokerse, A. S., Llavata-Peris, C. I., van Den Berg, W., y Weijers, D. (2011). A cellular expression map of the *Arabidopsis* AUXIN RESPONSE FACTOR gene family. *The Plant Journal*, *68*, 597–606.

Raemakers, C. J. J. M. (1993). *Primary and cyclic somatic embryogenesis in cassava (Manihot esculenta Crantz)*. Tesis Agricultural University Wagenigen.

Raghavan, V. (1986). Pollen embryogenesis. *Embryogenesis in angiosperms, a developmental and experimental study*, 153–189. Cambridge University Press.

Raghavan, V. (1990). From Microspore to Embryoid: Faces of the Angiosperm Pollen Grain. *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology* (pp. 213–221).

Raghavan, V. (2000). Developmental Biology of Flowering Plants. Springer New York.

Rancillac, M., Klinguer, A., Klingue, S., y Millet, B. (1996). Preliminary investigations on somatic embryogenesis from leaf discs of red oak (*Quercus rubra L* .). *Plant Growth Regulation, 20*, 67–73.

Rashotte, A. M., y Goertzen, L. R. (2010). The CRF domain defines Cytokinin Response Factor proteins in plants. *BMC Plant Biology*, *10*(74).

Rawlings, N. D., Barrett, A. J., y Bateman, A. (2010). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*, *38*(suppl_1), D227–D233.

Reape, T. J., Molony, E. M., y McCabe, P. F. (2008). Programmed cell death in plants: Distinguishing between different modes. *Journal of Experimental Botany*, *59*(3), 435–444.

Ren, J., Wu, P., Trampe, B., Tian, X., Lübberstedt, T., y Chen, S. (2017). Novel technologies in doubled haploid line development. *Plant Biotechnology Journal*, *15*, 1361–1370.

Rentrop, M., Knapp, B., Winter, H., y Schweizer, J. (1986). Aminoalkylsilane-treated glass slides as support for *in situ* hybridization of keratin cDNAs to frozen tissue sections under varying fixation and pretreatment conditions. *The Histochemical Journal*, *18*(5), 271–276.

Reumann, S., Voitsekhovskaja, O., y Lillo, C. (2010). From signal transduction to autophagy of plant cell organelles: Lessons from yeast and mammals and plant-specific features. *Protoplasma*, *247*, 233–256.

Ric-Varas, P., Barceló, M., Rivera, J. A., Cerezo, S., Matas, A. J., Schückel, J., Paul Knox, J., Posé, S., Pliego-Alfaro, F., y Mercado, J. A. (2020). Exploring the use of fruit callus culture as a model system to study color development and cell wall remodeling during strawberry fruit ripening. *Plants*, *9*, 1–16.

Richau, K. H., Kaschani, F., Verdoes, M., Pansuriya, T. C., Niessen, S., Stüber, K., Colby, T., Overkleeft, H. S., Bogyo, M., y van der Hoorn, R. A. L. (2012). Subclassification and biochemical analysis of plant papain-like cysteine proteases displays subfamily-specific characteristics. *Plant Physiology*, *158*, 1583–1599.

Riefler, M., Novak, O., Strnad, M., y Schmülling, T. (2006). *Arabidopsis* cytokinin receptors mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell*, *18*(1), 40–54.

Rijavec, T., Jain, M., Dermastia, M., y Chourey, P. S. (2011). Spatial and temporal profiles of cytokinin biosynthesis and accumulation in developing caryopses of maize. *Annals of Botany*, *107*(7), 1235–1245.

Robert, H. S., Grones, P., Stepanova, A. N., Robles, L. M., Lokerse, A. S., Alonso, J. M., Weijers, D., y Friml, J. (2013). Local auxin sources orient the apical-basal axis in *Arabidopsis* embryos. *Current Biology*, *23*(24), 2506–2512.

Robert, H. S., Park, C., Gutièrrez, C. L., Wójcikowska, B., Pěnčík, A., Novák, O., Chen, J., Grunewald, W., Dresselhaus, T., Friml, J., y Laux, T. (2018). Maternal auxin supply contributes to early embryo patterning in *Arabidopsis*. *Nature Plants*, *4*(8), 548–553.

Roberts, I. N., Caputo, C., Criado, M. V., y Funk, C. (2012). Senescence-associated proteases in plants. *Physiologia Plantarum*, 130–139.

Rocha, G. L., Fernandez, J. H., Oliveira, A. E. A., y Fernandes, K. V. S. (2017). Programmed Cell Death-Related Proteases in Plants. Enzyme Inhibitors and Activators.

Roche, D., Cong, P., Chen, Z., Hanna, W. W., Gustine, D. L., Sherwood, R. T., y Ozias-Akins, P. (1999). An apospory-specific genomic region is conserved between Buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L.) and *Pennisetum squamulatum* Fresen. *The Plant Journal*, *19*(2), 203–208.

Röckel, N., Wolf, S., Kost, B., Rausch, T., y Greiner, S. (2008). Elaborate spatial patterning of cell-wall PME and PMEI at the pollen tube tip involves PMEI endocytosis, and reflects the distribution of esterified and de-esterified pectins. *The Plant Journal*, *53*, 133–143.

Rodrigues-Otubo, B. M., Penteado, M. I. D. O., y Do Valle, C. B. (2000). Embryo rescue of interspecific hybrids of *Brachiaria spp. Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *61*, 175–182.

Rodríguez-Sanz, H., Manzanera, J. A., Solís, M. T., Gómez-Garay, A., Pintos, B., Risueño, M. C., y Testillano, P. S. (2014). Early markers are present in both embryogenesis pathways from microspores and immature zygotic embryos in cork oak, *Quercus suber* L. *BMC Plant Biology*, *14*(224), 1–18.

Rodríguez-Sanz, H., Solís, M. T., Lopez, M. F., Gómez-Cadenas, A., Risueño, M. C., y Testillano, P. S. (2015). Auxin biosynthesis, accumulation, action and transport are involved in stress-induced microspore embryogenesis initiation and progression in *Brassica napus*. *Plant and Cell Physiology*, *56*(7), 1401–1417.

Rodríguez-Serrano, M., Bárány, I., Prem, D., Coronado, M. J., Risueño, M. C., y Testillano, P. S. (2012). NO, ROS, and cell death associated with caspase-like activity increase in stress-induced microspore embryogenesis of barley. *Journal of Experimental Botany*, *63*(5), 2007–2024.

Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M. C., Pazmino, D. M., Testillano, P. S., Risueno, M. C., Del Río, L. A., y Sandalio, L. M. (2009). Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: Cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. *Plant Physiology*, *150*(1), 229–243.

Rossini, L., Muehlbauer, G. J., Okagaki, R., Salvi, S., y von Korff, M. (2018). Genetics of Whole Plant Morphology and Architecture. *The Barley Genome*, 209–231. Springer International Publishing.

Rowley, J. R., y El-Ghazaly, G. (1992). Lipid in wall and cytoplasm of solidago pollen. *Grana*, *31*(4), 273–283.

Ruiz de la Torre, J. (2006). Flora Mayor. *Organismo Autónomo Parques Nacionales. Dirección General para la Biodiversidad*, 706–718.

Rumyantseva, N. I. (2005). Arabinogalactan proteins: Involvement in plant growth and morphogenesis. *Biokhimiya*, *70*(10), 1301–1317.

Rustgi, S., Ankrah, N. O., Brew-Appiah, R. A. T., Sun, Y., Liu, W., y von Wettstein, D. (2017). Doubled Haploid Transgenic Wheat Lines by Microspore Transformation. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1679, 213–234.

Ryabovol, V. V., y Minibayeva, F. V. (2016). Molecular mechanisms of autophagy in plants: Role of ATG8 proteins in formation and functioning of autophagosomes. *Biochemistry*, *81*(4), 348–363.

Ryden, P., Sugimoto-Shirasu, K., Smith, A. C., Findlay, K., Reiter, W. D., y McCann, M. C. (2003). Tensile properties of *Arabidopsis* cell walls depend on both a xyloglucan cross-linked microfibrillar network and rhamnogalacturonan II-borate complexes. *Plant Physiology*, *132*, 1033–1040.

Saffer, A. M. (2018). Expanding roles for pectins in plant development. *Journal of Integrative Plant Biology*, *60*(10), 910–923.

Sagare, A. P., Lee, Y. L., Lin, T. C., Chen, C. C., y Tsay, H. S. (2000). Cytokinin-induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Corydalis yanhusuo* (*Fumariaceae*) - A medicinal plant. *Plant Science*, *160*(1), 139–147.

Salehin, M., Bagchi, R., y Estelle, M. (2015). SCF TIR1 / AFB -Based Auxin Perception : Mechanism and Role in Plant Growth and Development. *The Plant Cell*, *27*, 9–19.

Salinas-Grenet, H., Herrera-Vásquez, A., Parra, S., Cortez, A., Gutiérrez, L., Pollmann, S., León, G., y Blanco-Herrera, F. (2018). Modulation of Auxin Levels in Pollen Grains Affects Stamen Development and Anther Dehiscence in *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(9), 2480.

Šamaj, J., Šamajová, O., Peters, M., Baluška, F., Lichtscheidl, I., Knox, J. P., y Volkmann, D. (2000). Immunolocalization of LM2 arabinogalactan protein epitope associated with endomembranes of plant cells. *Protoplasma*, *212*(3–4), 186–196.

Šamaj, Jozef, Bobák, M., Blehová, A., y Pret'Ová, A. (2005). Importance of cytoskeleton and cell wall in somatic embryogenesis. *Plant Cell Monographs*, *2*, 35–50.

Sánchez-Romero, C., Márquez-Martín, B., y Pliego-Alfaro, F. (2005). Somatic and Zygotic Embryogenesis in Avocado. *Plant Cell Monographs*, 2, 271–284. Springer.

Santner, A., Calderon-Villalobos, L. I. A., y Estelle, M. (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology*, *5*(5), 301–307.

Santner, A., y Estelle, M. (2009). Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature*, *459*, 1071–1078.

Sardar, H. S., y Showalter, A. M. (2007). A Cellular Networking Model Involving Interactions Among Glycosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-Anchored Plasma Membrane Arabinogalactan Proteins (AGPs), Microtubules and F-actin in Tobacco BY-2 Cells. *Plant Signaling y Behavior*, *2*(1), 8–9.

Satpute, G. K., Long, H., Seguí-Simarro, J. M., Risueño, M. C., y Testillano, P. S. (2005). Cell architecture during gametophytic and embryogenic microspore development in *Brassica napus* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, *27*(4), 665–674.

Schaller, G. E., Bishopp, A., y Kieber, J. J. (2015). The yin-yang of hormones: Cytokinin and auxin interactions in plant development. *Plant Cell*, *27*(1), 44–63.

Schlicht, M., Strnad, M., Scanlon, M. J., Mancuso, S., Hochholdinger, F., Palme, K., Volkmann, D., Menzel, D., y Baluska, F. (2006). Auxin Immunolocalization Implicates Vesicular Neurotransmitter-Like Mode of Polar Auxin Transport in Root Apices. *Plant Signaling y Behavior*, *1*(3), 122–133.

Schmülling, T. (2004). Cytokinin. Encyclopedia of Biological Chemistry. Academic Press/Elsevier Science.

Schmülling, Thomas, Werner, T., Riefler, M., Krupková, E., y Bartrina, I. (2003). Structure and function of cytokinin oxidase / dehydrogenase genes of maize , rice , *Arabidopsis* and other species. *Journal of Plant Research*, *116*, 241–252.

Schultz, C. J., Johnson, K. L., Currie, G., y Bacic, A. (2000). The classical arabinogalactan protein gene family of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *12*(9), 1751–1767.

Schulz, S. R., y Jensen, W. (1968). Capsella embryogenesis: The early embryo. *Journal of Ultrasructure Research*, *22*(5–6), 376–392.

Scott, R. J., Spielman, M., y Dickinson, H. G. (2004). Stamen structure and function. *Plant Cell*, *16*, 46–61.

Seguí-Simarro, J. M., Corral-Martínez, P., Corredor, E., Raska, I., Testillano, P. S., y Risueño, M. C. (2011). A change of developmental program induces the remodeling of the interchromatin domain during microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. *Journal of Plant Physiology*, *168*, 746–757.

Seguí-Simarro, José M., y Nuez, F. (2008). How microspores transform into haploid embryos: Changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, *134*, 1–12.

Segura, J. (2008). Fundamentos de Fisiología Vegetal. *Citoquininas*, 421–444. McGraw-Hill-Interamérica de España, Barcelona.

Seifert, G. J., y Roberts, K. (2007). The biology of arabinogalactan proteins. *Annual Review of Plant Biology*, *58*, 137–161.

Shakya, R., y Bhatla, S. C. (2018). Pollination, Fertilization and Seed Development. *Plant Physiology, Development and Metabolism*, 821–856. Springer Singapore.

Shao, A., Ma, W., Zhao, X., Hu, M., He, X., Teng, W., Li, H., y Tong, Y. (2017). The auxin biosynthetic TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE RELATED TaTAR2.1-3A increases grain yield of wheat. *Plant Physiology*, *174*(4), 2274–2288.

Shariatpanahi, M. E., Belogradova, K., Hessamvaziri, L., Heberle-Bors, E., y Touraev, A. (2006). Efficient embryogenesis and regeneration in freshly isolated and cultured wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores without stress pretreatment. *Plant Cell Reports*, *25*, 1294–1299.

Sharp, W. R., Larsen, P. O., Paddock, E. F., y Raghavan, V. (1979). *Plant Cell and Tissue Culture Principles and Applications.* (Vol. 31, Issue 4). Ohio State University Press.

Shi, J., Cui, M., Yang, L., Kim, Y. J., y Zhang, D. (2015). Genetic and Biochemical Mechanisms of Pollen Wall Development. *Trends in Plant Science*, *20*(11), 741–753.

Shimizu-Sato, S., Tanaka, M., y Mori, H. (2009). Auxin–cytokinin interactions in the control of shoot branching. *Plant Molecular Biology*, *69*(4), 429–435.

Shin, K. D., Lee, H. N., y Chung, T. (2014). A revised assay for monitoring autophagic flux in *Arabidopsis Thaliana* reveals involvement of autophagy-related9 in autophagy. *Molecules and Cells*, *37*(5), 399–405.

Shindo, T., Misas-Villamil, J. C., Hörger, A. C., Song, J., y van der Hoorn, R. A. L. (2012). A role in immunity for *Arabidopsis* cysteine protease RD21, the ortholog of the tomato immune protease C14. *PLoS ONE*, *7*(1), 1–9.

Shirley, N. J., Aubert, M. K., Wilkinson, L. G., Bird, D. C., Lora, J., Yang, X., y Tucker, M. R. (2019). Translating auxin responses into ovules, seeds and yield: Insight from *Arabidopsis* and the cereals. *Journal of Integrative Plant Biology*, *61*(3), 310–336.

Shivanna, K. R. (2003). *Pollen Biology and Biotechnology*. CRC Press.

Shivanna, K. R., y Johri, B. M. (1985). The Angiosperm Pollen: Structure and Function. New Delhi: Wiley Eastern

Showalter, A. M. (2001). Arabinogalactan-proteins: Structure, expression and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *58*, 1399–1417.

Showalter, A. M., y Basu, D. (2016). Extensin and arabinogalactan-protein biosynthesis: Glycosyltransferases, research challenges, and biosensors. *Frontiers in Plant Science*, *7*.

Showalter, A. M., Keppler, B., Lichtenberg, J., Gu, D., y Welch, L. R. (2010). A bioinformatics approach to the identification, classification, and analysis of hydroxyproline-rich glycoproteins. *Plant Physiology*, *153*(2), 485–513.

Silva, J., Ferraz, R., Dupree, P., Showalter, A. M., y Coimbra, S. (2020). Three Decades of Advances in Arabinogalactan-Protein Biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, *11*.

Silva, T. D. (2012). Microspore Embryogenesis. *Embryogenesis*, 573–596.

Simm, S., Scharf, K., Jegadeesan, S., Chiusano, M. L., Firon, N., y Schleiff, E. (2016). Survey of Genes Involved in Biosynthesis , Transport , and Signaling of Phytohormones with Focus on *Solanum lycopersicum*. *Bioinformatics and Biology Insights*, *10*, 185–207.

Sinha, R. K., Pospíšil, P., Maheshwari, P., y Eudes, F. (2016). Bcl-2△21 and Ac-DEVD-CHO inhibit death of wheat microspores. *Frontiers in Plant Science*, *7*(1931), 1–12.

Skoog, F., y Miller, C. O. (1957). Chemical Regulation of Growth and Organ Formation In Plant Tissue Cultured *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, *11*, 118–131.

Sláviková, S., Shy, G., Yao, Y., Glozman, R., Levanony, H., Pietrokovski, S., Elazar, Z., y Galili, G. (2005). The autophagy-associated Atg8 gene family operates both under favourable growth conditions and under starvation stresses in *Arabidopsis* plants. *Journal of Experimental Botany*, *56*, 2839–2849.

Smallwood, M., Yates, E. A., Willats, W. G. T., Martin, H., y Knox, J. P. (1996). Immunochemical comparison of membrane-associated and secreted arabinogalactan-proteins in rice and carrot. *Planta*, *198*(3), 452–459.

Smertenko, A., y Bozhkov, P. V. (2014). Somatic embryogenesis: Life and death processes during apical-basal patterning. *Journal of Experimental Botany*, *65*(5), 1343–1360.

Smýkal, P. (2000). Pollen embryogenesis - The stress mediated switch from gametophytic to sporophytic development. Current status and future prospects. *Biologia Plantarum*, *43*(4), 481–489.

Solís, M. T., Berenguer, E., Risueño, M. C., y Testillano, P. S. (2016). BnPME is progressively induced after microspore reprogramming to embryogenesis, correlating with pectin de-esterification and cell differentiation in *Brassica napus*. *BMC Plant Biology*, *16*(1), 1–15.

Solís, M. T., Chakrabarti, N., Corredor, E., Cortés-Eslava, J., Rodríguez-Serrano, M., Biggiogera, M., Risueño, M. C., y Testillano, P. S. (2014). Epigenetic changes accompany developmental programmed cell death in tapetum cells. *Plant and Cell Physiology*, *55*(1), 16–29.

Soriano, M., Li, H., y Boutilier, K. (2014). Microspore embryogenesis: Establishment of embryo identity and pattern in culture. *Plant Reproduction*, *26*, 181–196.

Souto, E. B., da Ana, R., Souto, S. B., Zielińska, A., Marques, C., Andrade, L. N., Horbańczuk, O. K., Atanasov, A. G., Lucarini, M., Durazzo, A., Silva, A. M., Novellino, E., Santini, A., y Severino, P. (2020). *In vitro* characterization, modelling, and antioxidant properties of Polyphenon-60 from green tea in Eudragit s100-2 Chitosan Microspheres. *Nutrients*, *12*(967), 1–15.

Spíchal, L, Werner, Popa, I., Riefler, M., Schmülling, T., y Strnad, M. (2009). The purine derivative PI-55 blocks cytokinin action via receptor inhibition. *The FEBS Journal*, *276*, 244–253.

Spíchal, Lukáš, Rakova, N. Y., Riefler, M., Mizuno, T., Romanov, G. A., Strnad, M., y Schmülling, T. (2004). Two Cytokinin Receptors of *Arabidopsis thaliana* , CRE1 / AHK4 and AHK3 , Differ in their Ligand Specificity in a Bacterial Assay. *Plant Cell Physiology*, *45*(9), 1299–1305.

Spíchal, Lukáš, Werner, T., Popa, I., Riefler, M., Schmülling, T., y Strnad, M. (2009). The purine derivative PI-55 blocks cytokinin action via receptor inhibition. *FEBS Journal*, *276*(1), 244–253.

Srivastava, Priyanka, y Chaturvedi, R. (2008). *In vitro* androgenesis in tree species: An update and prospect for further research. *Biotechnology Advances*, *26*(5), 482–491.

Stanley, R. G., y Linskens, H. F. (1974). *Pollen*. Springer Berlin Heidelberg.

Steward, F. C., Mapes, M. O., Kent, A. E., y Holsten. (1964). Growth and Development of Cultured Plant Cells. *Science*, *143*(3601), 20–27.

Stieglitz, H. (1977). Role of β-1,3-glucanase in postmeiotic microspore release. *Developmental Biology*, *57*(1), 87–97.

Su, Y. H., Liu, Y. B., Bai, B., y Zhang, X. S. (2015). Establishment of embryonic shoot-root axis is involved in auxin and cytokinin response during *Arabidopsis* somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 1–9.

Su, Y. H., Liu, Y. B., y Zhang, X. S. (2011). Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant*, *4*(4), 616–625.

Sueldo, D. J., y van der Hoorn, R. A. L. (2017). Plant life needs cell death, but does plant cell death need Cys proteases? *The FEBS Journal*, *284*, 1577–1585.

Sun, J., Hirose, N., Wang, X., Wen, P., Xue, L., Sakakibara, H., y Zuo, J. (2005). *Arabidopsis* SOI33 / AtENT8 Gene Encodes a Putative Equilibrative Nucleoside Transporter That Is Involved in Cytokinin Transport In Planta. *Journal of Integrative Plant Biology*, *47*(5), 588–603.

Sundberg, E., y Østergaard, L. (2009). Distinct and dynamic auxin activities during reproductive development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *1*(6), 1–14.

Supena, E. D. J., Winarto, B., Riksen, T., Dubas, E., van Lammeren, A. Offringa, R., Boutilier, K., y Custers, J. (2008). Regeneration of zygotic-like microspore-derived embryos suggests an important role for the suspensor in early embryo patterning. *Journal of Experimental Botany*, *59*, 803–8014.

Sutton, B. (2002). Commercial delivery of genetic improvement to conifer plantations using somatic embryogenesis. *Annals of Forest Science*, *59*, 657–661.

Suzuki, T., Imamura, A., Ueguchi, C., y Mizuno, T. (1998). Histidine-Containing Phosphotransfer (HPt) Signal Transducers Implicated in His-to-Asp Phosphorelay in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology*, *39*(12), 1258–1268.

Swe, M., y Sit, K. H. (2000). zVAD-fmk and DEVD-cho induced late mitosis arrest and apoptotic expressions. *Apoptosis*, *5*(1), 29–36.

Szemenyei, H., Hannon, M., y Long, J. A. (2008). TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during *Arabidopsis* embryogenesis. *Science*, *319*(5868), 1384–1386.

Taiz, L y Zaiger, E. (2006). Fisiología vegetal. *Ciènces experimentals,* 10.

Takei, K., Sakakibara, H., y Sugiyama, T. (2001). Identification of Genes Encoding Adenylate Isopentenyltransferase , a Cytokinin Biosynthesis Enzyme , in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(28), 26405–26410.

Takei, K., Sakakibara, H., Taniguchi, M., y Sugiyama, T. (2001). Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: Implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant and Cell Physiology*, *42*(1), 85–93.

Takei, K., Yamaya, T., y Sakakibara, H. (2004). *Arabidopsis CYP735A1 and CYP735A2 Encode Cytokinin Hydroxylases That Catalyze the Biosynthesis of trans -Zeatin*. *279*(40), 41866–41872.

Tan, L., Eberhard, S., Pattathil, S., Warder, C., Glushka, J., Yuan, C., Hao, Z., Zhu, X., Avci, U., Miller, J. S., Baldwin, D., Pham, C., Orlando, R., Darvill, A., Hahn, M. G., Kieliszewski, M. J., y Mohnena, D. (2013). An *Arabidopsis* cell wall proteoglycan consists of pectin and arabinoxylan covalently linked to an arabinogalactan protein. *Plant Cell*, *25*, 270–287.

Tan, S. (2021). Action mode of NPA: direct inhibition on PIN auxin transporters. *Molecular Plant*, *14*, 198–199.

Tanaka, Y., Suzuki, T., Yamashino, T., y Mizuno, T. (2014). Comparative Studies of the AHP Histidine- containing Phosphotransmitters Implicated in His- to-Asp Phosphorelay in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *68*(2), 462–465.

Tang, X. C., He, Y. Q., Wang, Y., y Sun, M. X. (2006). The role of arabinogalactan proteins binding to Yariv reagents in the initiation, cell developmental fate, and maintenance of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. *Journal of Experimental Botany*, *57*(11), 2639–2650.

Taylor, M. A. J., Baker, K. C., Briggs, G. S., Connerton, I. F., Cummings, N. J., Pratt, K. A., Revell, D. F., Freedman, R. B., y Goodenough, P. W. (1995). Recombinant pro-regions from papain and papaya proteinase iv are selective high affinity inhibitors of the mature papaya enzymes. *Protein Engineering*, *8*(1), 59–62.

Tchórzewska, D., Luchowski, R., Gruszecki, W. I., y Winiarczyk, K. (2018). Comparative studies of live tapetum cells in sterile garlic (Allium sativum) and fertile leek (*Allium ampeloprasum*) using the fluorescence lifetime imaging analytical method. *South African Journal of Botany*, *117*, 222–231.

Teale, W., y Palme, K. (2018). Naphthylphthalamic acid and the mechanism of polar auxin transport. *Journal of Experimental Botany*, *69*(2), 303–312.

T**estillano, P. S., Georgiev, S., Mogensen, H. L., Coronado, M. J., Dumas, C., Risueno, M. C., y Matthys-Rochon, E. (2004).** Spontaneous chromosome doubling results from nuclear fusion during *in vitro* maize induced microspore embryogenesis. *Chromosoma*, *112*, 342–349.

Testillano, P. S. (2019). Microspore embryogenesis: targeting the determinant factors of stress-induced cell reprogramming for crop improvement. *Journal of Experimental Botany*, *70*(11), 2965–2978.

Testillano, P. S., Coronado, M. J., Thierry, A. M., Matthys-Rochon, E., y Risueño, M. C. (2010). *In situ* detection of Esr proteins secretion during maize microspore embryogenesis and their secretion blockage show effects on the culture progression. *Functional Plant Biology*, *37*, 985–994.

Testillano, P. S., Gómez-Garay, A., Pintos, B., y Risueño, M. C. (2018). Somatic Embryogenesis of Quercus suber L. From Immature Zygotic Embryos. *Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology*, Vol. 1815, 247–256. Humana Press.

Thompson, H. J. M., y Knox, J. P. (1998). Stage-specific responses of embryogenic carrot cell suspension cultures to arabinogalactan protein-binding β-glucosyl Yariv reagent. *Planta*, *205*, 32–38.

Tisserat, B., Esan, E. B., y Murashige, T. (1979). Somatic Embryogenesis in Angiosperms. *Horticultural Reviews*, 1–78.

To, J. P. C., y Kieber, J. J. (2008). Cytokinin signaling : two-components and more. *Trends in Plant Science*, *13*(2), 27–30.

Toribio, M. (1986). *Callus initiation and primary morphogenic responses from Quercus suber L. cotyledons cultured in vitro* (p. 863). Proc. 18th. IUFRO World Congress. Div. 2, Vol II.

Toribio, M., Celestino, C., Gallego, J., y Martinez, I. (2000). Induction of somatic embryogenesis in tissues from mature oak trees. Development of Integrated Systems for large-scale Propagation of elite Plants using In vitro Techniques, 236–237. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.

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*(1), 144–152.

Touraev, Alisher, Pfosser, M., y Heberle-Bors, E. (2001). The microspore: A haploid multipurpose cell. *Advances in Botanical Research,* 35, 53–109.

Tran, T. H., Bui, T. V., y Feng, T. Y. (2016). The role of auxin and cytokinin on somatic embryogenesis from cell suspension cultures of the banana cultivar au Man. *Acta Horticulturae*, *1114*, 219–226.

Trindade, H., y Pais, M. (2003). Meristematic nodule culture : A new pathway for *in vitro* propagation of Meristematic nodule culture : a new pathway for *in vitro* propagation of *Eucalyptus globulus*. *17*, 308–315.

Tsukada, M., y Ohsumi, Y. (1993). Isofation and characterization of autophagy-defective mutants of Sacharomyces cerevisiae. *FEBS Letters*, *333*(1,2), 169–174.

Turk, B., y Stoka, V. (2007). Protease signalling in cell death: caspases versus cysteine cathepsins. *FEBS Letters*, *581*(15), 2761–2767.

Valdés, A. E., Ordás, R. J., Fernández, B., y Centeno, M. L. (2001). Relationships between hormonal contents and the organogenic response in *Pinus pinea* cotyledons. *Plant Physiology and Biochemistry*, *39*(5), 377–384.

van der Hoorn, R. A. L. (2008). Plant proteases: From phenotypes to molecular mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, *59*, 191–223.

van der Hoorn, R. A. L., Leeuwenburgh, M. A., Bogyo, M., Joosten, M. H. A. J., y Peck, S. C. (2004). Activity Profiling of Papain-Like Cysteine Proteases in Plants10.1104/pp.104.041467. *Plant Physiology*, *135*(3), 1170–1178.

van Doorn, W. G., Beers, E. P., Dangl, J. L., Franklin-Tong, V. E., Gallois, P., Hara-Nishimura, I., Jones, A. M., Kawai-Yamada, M., Lam, E., Mundy, J., Mur, L. A. J., Petersen, M., Smertenko, A., Taliansky, M., VanBreusegem, F., Wolpert, T., Woltering, E., Zhivotovsky, B., y Bozhkov, P. V. (2011). Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death and Differentiation*, *18*, 1241–1246.

van Durme, M., y Nowack, M. K. (2016). Mechanisms of developmentally controlled cell death in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, *29*, 29–37.

van Hautegem, T., Waters, A. J., Goodrich, J., y Nowack, M. K. (2015). Only in dying, life: Programmed cell death during plant development. *Trends in Plant Science*, *20*(2), 102–113.

van Hengel, A. J., Tadesse, Z., Immerzeel, P., Schols, H., van Kammen, A., y De Vries, S. C. (2001). N-acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiology*, *125*, 1880–1890.

van Hengel, Arjon J., van Kammen, A., y De Vries, S. C. (2002). A relationship between seed development, Arabinogalactan-proteins (AGPS) and the AGP mediated promotion of somatic embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, *114*, 637–644.

van Overbeek, J., Conklin, M., y Blakeslee, A. (1941). Factors in coconut milk essential for growth and development of *Datura* embryos. *Science*, *94*(2441), 350–351.

Varnier, A. L., Mazeyrat-Gourbeyre, F., Sangwan, R. S., y Clément, C. (2005). Programmed cell death progressively models the development of anther sporophytic tissues from the tapetum and is triggered in pollen grains during maturation. *Journal of Structural Biology*, *152*(2), 118–128.

Velasco-Arroyo, B., Diaz-Mendoza, M., Gandullo, J., Gonzalez-Melendi, P., Santamaria, M. E., Dominguez-Figueroa, J. D., Hensel, G., Martinez, M., Kumlehn, J., y Diaz, I. (2016). HvPap-1 C1A protease actively participates in barley proteolysis mediated by abiotic stresses. *Journal of Experimental Botany*, *67*(14), 4297–4310.

Verdugo-Perales, M., Velez-de la Rocha, R., León-Félix, J., Osuna-Enciso, T., Heredia, J. B., Osuna-Castro, J. A., Islas-Osuna, M. A., y Sañudo-Barajas, J. A. (2018). Gene expression of an arabinogalactan lysine-rich protein CaAGP18 during vegetative and reproductive development of bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *3 Biotech*, *8*(1).

Verhertbruggen, Y., Marcus, S. E., Haeger, A., Ordaz-Ortiz, J. J., y Knox, J. P. (2009). An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturonan. *Carbohydrate Research*, *344*, 1858–1862.

Verma, S., Dixit, R., y Pandey, K. C. (2016). Cysteine proteases: Modes of activation and future prospects as pharmacological targets. *Frontiers in Pharmacology*, *7*(107).

Vizcay-Barrena, G., y Wilson, Z. A. (2006). Altered tapetal PCD and pollen wall development in the *Arabidopsis* ms1 mutant. *Journal of Experimental Botany*, *57*(11), 2709–2717.

Voiniciuc, C., Pauly, M., y Usadel, B. (2018). Monitoring polysaccharide dynamics in the plant cell wall. *Plant Physiology*, *176*(4), 2590–2600.

Vondrakova, Z., Dobrev, P. I., Pesek, B., Fischerova, L., Vagner, M., y Motyka, V. (2018). Profiles of endogenous phytohormones over the course of norway spruce somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 1–13.

Walden, R., Reiss, B., Koncz, C., y Schell, J. (1997). The impact of TI-plasmid-derived gene vectors on the study of the mechanism of action of phytohormones. *Annual Review of Phytopathology*, *35*, 45–66.

Wang, C., Yan, X., Chen, Q., Jiang, N., Fu, W., Ma, B., Liu, J., Li, C., Bednarek, S. Y., y Pan, J. (2013). Clathrin light chains regulate clathrin-mediated trafficking, auxin signaling, and development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *25*(2), 499–516.

Wang, H., Li, J., Bostock, R. M., y Gilchrist, D. G. (1996). Apoptosis: A Functional Paradigm for Programmed Plant Cell Death lnduced by a Host-Selective Phytotoxin and lnvoked during Development. *The Plant Cell*, *8*, 375–391.

Wang, M., van Bergen, S., y van Duijn, B. (2000). Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding. *Plant Physiology*, *124*, 523–530.

Wang, Maojun, Yuan, D., Gao, W., Li, Y., Tan, J., y Zhang, X. (2013). A Comparative Genome Analysis of PME and PMEI Families Reveals the Evolution of Pectin Metabolism in Plant Cell Walls. *PLoS ONE*, *8*(8), 1–12.

Wang, R., y Estelle, M. (2014). Diversity and specificity: auxin perception and signaling through the TIR1/AFB pathway. *Current Opinion in Plant Biology*, 51–58.

Wang, X., Wang, H., Wang, J., Sun, R., Wu, J., Liu, S., Bai, Y., Mun, J. H., Bancroft, I., Cheng, F., Huang, S., Li, X., Hua, W., Wang, J., Wang, X., Freeling, M., Pires, J. C., Paterson, A. H., Chalhoub, B., … Zhang, Z. (2011). The genome of the mesopolyploid crop species Brassica rapa. *Nature Genetics*, *43*, 1035–1040.

Wang, Y., y Jiao, Y. (2018). Auxin and above-ground meristems. *Journal of Experimental Botany*, *69*(2), 147–154.

Weijers, D., y Jürgens, G. (2005). Auxin and embryo axis formation: The ends in sight? *Current Opinion in Plant Biology*, *8*(1), 32–37.

Weijers, D., Nemhauser, J., y Yang, Z. (2018). Auxin: small molecule, big impact. *Journal of Experimental Botany*, *69*(2), 133–136.

Werner, T., Holst, K., Pörs, Y., Guivarc'h, A., Mustroph, A., Chriqui, D., Grimm, B., y Schmülling, T. (2008). Cytokinin deficiency causes distinct changes of sink and source parameters in tobacco shoots and roots. *Journal of Experimental Botany*, *59*(10), 2659–2672.

Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., van Onckelen, H., y Schmülling, T. (2003). Cytokinin-Deficient Transgenic *Arabidopsis* Plants Show Multiple Developmental Alterations Indicating Opposite Functions of Cytokinins in the Regulation of Shoot and Root Meristem Activity. *Plant Cell*, *15*(11), 2532–2550.

West, M. A. L., y Harada, J. J. (1993). Embryogenesis in higher plants: An overview. *Plant Cell*, *5*, 1361–1369.

Wiesner, J. (1892). Die Elementarstructur und das Wachstum der lebenden Substanz / Von Julius Wiesner. A. Hölder.

Willats, W. G. T., y Knox, J. P. (1999). Immunoprofiling of pectic polysaccharides. *Analytical Biochemistry*, *268*, 143–146.

Willats, W. G. T., Knox, J. P., y Mikkelsen, J. D. (2006). Pectin: New insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science and Technology*, *17*, 97–104.

Willats, W. G. T., Marcus, S. E., y Knox, J. P. (1998). Generation of a monoclonal antibody specific to (1->5) -alpha- arabinan. *Hybridoma*, *308*, 149–152.

Willats, W. G. T., Mccartney, L., Mackie, W., y Knox, J. P. (2001). *Pectin: cell biology and prospects for functional analysis*. *47*, 9–27.

Willats, W. G. T., Orfila, C., Limberg, G., Buchholt, H. C., van Alebeek, G. J. W. M., Voragen, A. G. J., Marcus, S. E., Christensen, T. M. I. E., Mikkelsen, J. D., Murray, B. S., y Knox, J. P. (2001). Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls: Implications for pectin methyl esterase action, matrix properties, and cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(22), 19404–19413.

Williams, E. G., y Maheshwaran, G. (1986). Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany*, *57*, 443–462.

Wilson, Z. A., y Zhang, D. B. (2009). From *Arabidopsis* to rice: Pathways in pollen development. *Journal of Experimental Botany*, *60*(5), 1479–1492.

Wójcik, A. M., Wójcikowska, B., y Gaj, M. D. (2020). Current perspectives on the auxin-mediated genetic network that controls the induction of somatic embryogenesis in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(4), 1–19.

Wójcikowska, B., y Gaj, M. D. (2017). Expression profiling of AUXIN RESPONSE FACTOR genes during somatic embryogenesis induction in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*, *36*(6), 843–858.

Wolf, S., Mouille, G., y Pelloux, J. (2009). Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Molecular Plant*, *2*(5), 851–860.

Wormit, A., y Usadel, B. (2018). The multifaceted role of pectin methylesterase inhibitors (PMEIs). *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(2878), 1–19.

Worthington, M., Heffelfinger, C., Bernal, D., Quintero, C., Zapata, Y. P., Perez, J. G., De Vega, J., Miles, J., Dellaporta, S., y Tohme, J. (2016). A parthenogenesis gene candidate and evidence for segmental allopolyploidy in apomictic *Brachiaria decumbens*. *Genetics*, 203, 1117–1132.

Wu, H. C., Bulgakov, V. P., y Jinn, T. L. (2018). Pectin methylesterases: Cell wall remodeling proteins are required for plant response to heat stress. *Frontiers in Plant Science*, *871*, 1–21.

Wu, X., y McSteen, P. (2007). The role of auxin transport during inflorescence development in maize (*Zea mays, Poaceae*). *American Journal of Botany*, *94*(11), 1745–1755.

Wybouw, B., y De Rybel, B. (2019). Cytokinin – A Developing Story. *Trends in Plant Science*, *24*(2), 177–185.

Xie, Q., Frugis, G., Colgan, D., y Chua, N. (2000). *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes y Development*, *14*(23), 3024–3036.

Xie, Z., Jiang, D., Dai, T., Jing, Q., y Cao, W. (2004). Effects of exogenous ABA and cytokinin on leaf photosynthesis and grain protein accumulation in wheat ears cultured *in vitro*. *Plant Growth Regulation*, *44*(1), 25–32.

Xu, L., Najeeb, U., Tang, G. X., Gu, H. H., Zhang, G. Q., He, Y., y Zhou, W. J. (2007). Haploid and Doubled Haploid Technology. *Advances in Botanical Research*, 181–216.

Yang, D., Li, Y., Shi, Y., Cui, Z., Luo, Y., Zheng, M., Chen, J., Li, Y., Yin, Y., y Wang, Z. (2016). Exogenous Cytokinins Increase Grain Yield of Winter Wheat Cultivars by Improving Stay-Green Characteristics under Heat Stress. *PLoS ONE*, *11*(5), 1–19.

Yang, J., Sardar, H. S., McGovern, K. R., Zhang, Y., y Showalter, A. M. (2007). A lysine-rich arabinogalactan protein in *Arabidopsis* is essential for plant growth and development, including cell division and expansion. *The Plant Journal*, *49*(4), 629–640.

Yang, J., y Showalter, A. M. (2007). Expression and localization of AtAGP18, a lysine-rich arabinogalactan- protein in *Arabidopsis*. *Planta*, *226*(1), 169–179.

Yang, X. , y Bassham, D. C. (2015). New Insight into the Mechanism and Function of Autophagy in Plant Cells. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 320. Elsevier Ltd.

Yang, X., Zhang, X., Yuan, D., Jin, F., Zhang, Y., y Xu, J. (2012). Transcript profiling reveals complex auxin signalling pathway and transcription regulation involved in dedifferentiation and redifferentiation during somatic embryogenesis in cotton. *BMC Plant Biology*, *12*(110).

Yang, Z., y Klionsky, D. J. (2009). An Overview of the Molecular Mechanism of Autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol*, *335*, 1–32.

Yano, K., Yanagisawa, T., Mukae, K., Niwa, Y., Inoue, Y., y Moriyasu, Y. (2015). Dissection of autophagy in tobacco BY-2 cells under sucrose starvation conditions using the vacuolar H+-ATPase inhibitor concanamycin A and the autophagy-related protein ATG8. *Plant Signaling and Behavior*, *10*(11), 1–12.

Yariv, J., Lis, H., y Katchalski, E. (1967). Precipitation of arabic acid and some seed polysaccharides by glycosylphenylazo dyes. *Biochemical Journal*, *105*, 1C-2C.

Yariv, J., Rapport, M. M., y Graff, L. (1962). The interaction of glycosides and saccharides with antibody to the corresponding phenylazo glycosides. *The Biochemical Journal*, *85*(2), 383–388.

Yi, S., Xia, S., Ruozhong, W., y Langtao, X. (2017). Hormone Metabolism and Signaling in Plants. *Phytohormonal quantification based on biological principles*, 431–470.

Yu, M., y Zhao, J. (2012). The cytological changes of tobacco zygote and proembryo cells induced by beta-glucosyl Yariv reagent suggest the involvement of arabinogalactan proteins in cell division and cell plate formation. *BMC Plant Biology*, *12*.

Yu, Q., Zhang, Y., Wang, J., Yan, X., Wang, C., Xu, J., y Pan, J. (2016). Clathrin-Mediated Auxin Efflux and Maxima Regulate Hypocotyl Hook Formation and Light-Stimulated Hook Opening in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, *9*(1), 101–112.

Yuan, S. xia, Su, Y. bin, Liu, Y. mei, Fang, Z. yuan, Yang, L. mei, Zhuang, M., Zhang, Y. yong, y Sun, P. tian. (2012). Effects of pH, MES, arabinogalactan-proteins on microspore cultures in white cabbage. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *110*, 69–76.

Zalewski, W., Galuszka, P., Gasparis, S., Orczyk, W., y Nadolska-Orczyk, A. (2010). Silencing of the HvCKX1 gene decreases the cytokinin oxidase/dehydrogenase level in barley and leads to higher plant productivity. *Journal of Experimental Botany*, *61*(6), 1839–1851.

Zazimalova, E., Murphy, A. S., Yang, H., Hoyerova, K., y Hosek, P. (2010). Auxin Transporters-Why So Many? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*, 1–14.

Zhang, Dabing, Luo, X., y Zhu, L. (2011). Cytological analysis and genetic control of rice anther development. *Journal of Genetics and Genomics*, *38*(9), 379–390.

Zhang, Dandan, Liu, D., Lv, X., Wang, Y., Xun, Z., Liu, Z., Li, F., y Lu, H. (2014). The cysteine protease CEP1, a key executor involved in tapetal programmed cell death, regulates pollen development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *26*, 2939–2961.

Zhang, K., Novak, O., Wei, Z., Gou, M., Zhang, X., Yu, Y., Yang, H., Cai, Y., Strnad, M., y Liu, C.-J. (2014). *Arabidopsis* ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins. *Nature Communication*, *5*(3274).

Zhang, L., Cai, X., Wu, J., Liu, M., Grob, S., Cheng, F., Liang, J., Cai, C., Liu, Z., Liu, B., Wang, F., Li, S., Liu, F., Li, X., Cheng, L., Yang, W., Li, M. he, Grossniklaus, U., Zheng, H., y Wang, X. (2018). Improved *Brassica rapa* reference genome by single-molecule sequencing and chromosome conformation capture technologies. *Horticulture Research*, *5*(50).

Zhang, Y. X., Lespinasse, Y., y Chevreau, E. (1990). Induction of haploidy in fruit trees. *Acta Horticulturae*, *280*, 293–304.

Zhang, Y., Yu, Q., Jiang, N., Yan, X., Wang, C., Wang, Q., Liu, J., Zhu, M., Bednarek, S. Y., Xu, J., y Pan, J. (2017). Clathrin regulates blue light-triggered lateral auxin distribution and hypocotyl phototropism in *Arabidopsis*. *Plant Cell and Environment*, *40*(1), 165–176.

Zhao, C., Johnson, B. J., Kositsup, B., y Beers, E. P. (2000). Exploiting secondary growth in *Arabidopsis*. Construction of xylem and bark cDNA libraries and cloning of three xylem endopeptidases. *Plant Physiology*, *123*, 1185–1196.

Zhao, P., Zhou, X. mei, Zhang, L. yao, Wang, W., Ma, L. gang, Yang, L. bo, Peng, X. bo, Bozhkov, P. V., y Sun, M. xiang. (2013). A Bipartite Molecular Module Controls Cell Death Activation in the Basal Cell Lineage of Plant Embryos. *PLoS Biology*, *11*(9).

Zhao, Y. (2014). Auxin Biosynthesis. A. S. of P. Biologists (Ed.), *The Arabidopsis Book*, 12, 1–14.

Zhong, J., Ren, Y. J., Yu, M., Ma, T. F., Zhang, X. L., y Zhao, J. (2011). Roles of arabinogalactan proteins in cotyledon formation and cell wall deposition during embryo development of *Arabidopsis*. *Protoplasma*, *248*, 551–563.

Zhou, J., Wang, J., Yu, J. Q., y Chen, Z. (2014). Role and regulation of autophagy in heat stress responses of tomato plants. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 1–12.

Ziemlanski, S., y Budzynska-Topolowska, J. Kochman, E. (1977). Physiopathological effects or erucic acid-poor rapeseed oil on rat adrenal glands. *Annals of Nutrition and Alimentation*, *31*(1), 69–84.

Zohary, D., Hopf, M., y Weiss, E. (2012). Domestication of Plants in the Old World. Oxford University Press.

Zorzatto, C., Chiari, L., De Araújo Bitencourt, G., Do Valle, C. B., De Campos Leguizamón, G. O., Schuster, I., y Pagliarini, M. S. (2010). Identification of a molecular marker linked to apomixis in *Brachiaria humidicola* (*Poaceae*). *Plant Breeding*, *129*, 734–736.

Zur, I., Dubas, E., Golemiec, E., Szechyńska-Hebda, M., Gołebiowska, G., y Wedzony, M. (2009). Stress-related variation in antioxidative enzymes activity and cell metabolism efficiency associated with embryogenesis induction in isolated microspore culture of *triticale* (*x Triticosecale* Wittm.). *Plant Cell Reports*, *28*(8), 1279–1287.

Zürcher, E., Liu, J., di Donato, M., Geisler, M., y Müller, B. (2016). Plant development regulated by cytokinin sinks. *Plant Science*, *353*(6303), 1027–1030.

PUBLICACIONES