



# EFECTO DE LA MODULACIÓN DE LA AUTOFAGIA Y LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS

Autora: Eva Luna Muñoz Vidal  
 Tutor: José María Seguí Simarro  
 Cotutora: Patricia Corral Martínez

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA  
 CURSO ACADÉMICO 2019-2020  
 Valencia, julio de 2020

λαφύων ἀλλ' ἡμῶν οὐκ ἔστιν ἄλλο ἢ τὸ πρῶτον...

**Title:** Autophagy and Programmed Cell Death modulation effect in microspore embryogenesis

**Abstract:**

In the coming years, the rising demand for quality plant products turns perfecting the strategies used in Plant Genetic Improvement to obtain pure lines into one of the most cutting-edge and necessary fields of research today. The interest in the development of pure lines resides in the fact that, when crossing two homozygous individuals, the offspring present heterosis or hybrid vigour, namely, virtues superior to those of the parents, in addition to other practical advantages. Using *in vitro* culture techniques that allow embryogenic reprogramming of microspores induced by exogenous stress, it is possible to obtain completely homozygous and viable individuals called double haploids (DHs), in a more timely and less costly manner. The study and understanding of the mechanisms involved in the processes that constitute these technologies are likely to increase their performance and accelerate the obtention of pure lines. Nonetheless, one of its major constraint is the high percentage of cell mortality, triggered by the autophagy phenomenon and programmed cell death (PCD) in response to applied stress, particularly in the so-called recalcitrant species. Although these processes are well documented in animal cells, there is still a lot to investigate and characterize regarding plants. This is why, the adequate regulation of the levels of these mechanisms, in order to ensure that as many of the induced microspores as possible successfully complete the embryogenic development program constitutes, now-a-days, one of the greatest challenges in the design of efficient protocols to obtain DHs. With the present contribution we intend to shed light on the effects of the modulation of autophagy and PCD on the embryogenesis of microspores of two species as relevant as the *Brassica napus* (rapeseed) and the recalcitrant *Solanum melongena* (aubergine), through the use of various pharmacological treatments.

**Keywords:**

Embryogenesis / Microspore / Autophagy / Programmed Cell Death / Doubled Haploids

**Título:** Efecto de la modulación de la autofagia y la muerte celular programada durante la embriogénesis de microsporas

**Resumen:**

La creciente demanda de productos vegetales de calidad en los próximos años hace que el perfeccionamiento de las estrategias empleadas en la Mejora Genética Vegetal para obtener líneas puras sea un campo de investigación muy puntero y necesario hoy en día. Este interés por desarrollar líneas puras reside en que, al cruzar dos individuos homocigóticos, la descendencia presenta heterosis o vigor híbrido, es decir, cualidades superiores a las de los progenitores además de otras ventajas prácticas. Mediante técnicas de cultivo *in vitro* que permiten la reprogramación embriogénica de las microsporas, inducida por un estrés exógeno, podemos obtener individuos completamente homocigóticos y viables denominados dobles haploides (DHs), con un tiempo de generación y costes muy reducidos. El estudio y comprensión de los mecanismos involucrados en los procesos que constituyen estas tecnologías son susceptibles de incrementar su rendimiento y acelerar la obtención de líneas puras. No obstante, una de sus mayores limitaciones es el alto porcentaje de mortalidad celular desencadenada por el fenómeno de la autofagia y la muerte celular programada (PCD) como respuesta al estrés aplicado, especialmente en las denominadas especies recalcitrantes. Aunque estos procesos están muy bien descritos en las células animales, en las vegetales aún queda mucho por indagar y caracterizar. Es por todo ello que la adecuada regulación de los niveles de dichos mecanismos para asegurar que el mayor número posible de microsporas inducidas completen con éxito el programa de desarrollo embriogénico constituye un reto en el diseño de protocolos eficientes de producción de líneas DH. Con la presente contribución pretendemos arrojar luz sobre los efectos de la modulación de la autofagia y la PCD en la embriogénesis de microsporas de dos especies tan relevantes como *Brassica napus* (colza) y la recalcitrante *Solanum melongena* (berenjena), mediante empleo de diversos tratamientos farmacológicos.

**Palabras clave:**

Embriogénesis / Microsporas / Autofagia / Muerte Celular Programada / Dobles Haploides

**Autora:** Eva Luna Muñoz Vidal

Valencia, julio de 2020

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

**Cotutora:** Dña. Patricia Corral Martínez

## AGRADECIMIENTOS:

En primer lugar, quisiera agradecer a mis tutores José María Seguí Simarro y Patricia Corral Martínez por brindarme la oportunidad de incorporarme a su equipo de investigación para la elaboración de este trabajo y por ayudarme y guiarme en todo este proceso. También agradezco a mis compañeros de laboratorio: Tono, Mireia, Ricardo, Rosa y Kamil por haberme dado su apoyo siempre que lo necesitaba.

Por otro lado, quiero dar las gracias a mis padres y amigos, en especial a Alicia, Laura y Carlota, por su paciencia (sobre todo) y apoyo incondicional en todo momento.

**Referencia de la portada:** Dibujo de un uróboro (“tragador de cola”), criatura fantástica con forma de serpiente que se devora a sí misma, haciendo alusión al concepto de autofagia. En la Antigüedad, dicho símbolo era empleado para representar el ciclo eterno de la vida y la naturaleza que está en constante recreación y transformación. Dibujo realizado por el copista griego Theodoros Pelecanos en 1478 del Codex Parisinus graecus 2327, reproducción de un antiguo tratado de alquimia atribuido a Sinesio de Cirene (d.412). Biblioteca Nacional de Francia (The Oxford Classical Dictionary, 4ª edición, 2012).



## ÍNDICE INTERACTIVO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1. LA HETEROSIS EN LA MEJORA GENÉTICA VEGETAL</b>	<b>1</b>
1.1.1. RELEVANCIA DE LOS HÍBRIDOS	1
1.1.2. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE LAS LÍNEAS PURAS	1
<b>1.2. HAPLOIDES Y DOBLES HAPLOIDES</b>	<b>2</b>
1.2.1. RELEVANCIA Y UTILIDAD	2
1.2.2. METODOS DE OBTENCION DE INDIVIDUOS HAPLOIDES	2
1.2.2.1. GENERACIÓN ESPONTÁNEA	3
1.2.2.2. METODOS DE INDUCCIÓN	3
1.2.2.3. ANDROGÉNESIS	4
1.2.2.3.1. RUTAS ANDROGÉNICAS	4
1.2.2.3.2. EMBRIOGÉNESIS DERIVADA DE MICROSPORAS	5
1.2.2.3.3. VENTAJAS Y LIMITACIONES	7
1.2.3. DUPLICACIÓN CROMOSÓMICA	7
<b>1.3. COLZA</b>	<b>8</b>
1.3.1. TAXONOMÍA	8
1.3.2. ORIGEN	8
1.3.3. RELEVANCIA ECONÓMICA	9
<b>1.4. BERENJENA</b>	<b>10</b>
1.4.1. TAXONOMÍA	10
1.4.2. ORIGEN	10
1.4.3. RELEVANCIA ECONÓMICA	11
<b>1.5. RESPUESTA A ESTRÉS EN PLANTAS</b>	<b>11</b>
1.5.1. RESPUESTA A ESTRÉS EN EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS	11
1.5.2. RESPUESTA A ESTRÉS TÉRMICO EN <i>Brassica napus</i> Y <i>Solanum melongena</i>	13

<b>1.6. AUTOFAGIA EN PLANTAS</b>	<b>14</b>
1.6.1. AUTOFAGIA EN PLANTAS COMO RESPUESTA AL ESTRÉS	14
1.6.2. AUTOFAGIA EN PLANTAS COMO RESPUESTA AL ESTRÉS EN EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS	16
<b>1.7. MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN PLANTAS</b>	<b>17</b>
1.7.1. MUERTE CELULAR PROGRAMADA COMO RESPUESTA AL ESTRÉS	17
1.7.2. MUERTE CELULAR PROGRAMADA COMO RESPUESTA AL ESTRÉS EN EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS	18
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>20</b>
3.1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO	20
3.2. CULTIVO DE MICROSPORAS	20
3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	23
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>24</b>
4.1. CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO DE MICROSPORAS	24
4.2. EFECTO DE LA MODULACIÓN DE LA AUTOFAGIA Y LA PCD EN EL CULTIVO DE MICROSPORAS DE COLZA	25
<u>4.2.1. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE PROTEASAS DE TIPO CASPASA EN EL CULTIVO DE MICROSPORAS DE COLZA</u>	26
<u>4.2.2. EFECTO DEL OBATOCCLAX EN EL CULTIVO DE MICROSPORAS DE COLZA</u>	27
<u>4.2.3. EFECTO DE LA NARINGINA EN EL CULTIVO DE MICROSPORAS DE COLZA</u>	28
4.3. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA AUTOFAGIA Y LA PCD EN EL CULTIVO DE MICROSPORAS DE BERENJENA	30
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>34</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>35</b>

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

**Figura 1** – Diferentes rutas androgénicas para la reprogramación del desarrollo gametofítico de la microspora o polen (ruta 0) a uno esporofítico.

**Figura 2** – Representación esquemática de las diferentes vías de desarrollo de la microspora *in vivo* e *in vitro* sin (A, B) y con (C, D) inducción de estrés térmico.

**Figura 3** – Producción (t) de los diez principales cultivos oleaginosos en el mundo en 2018.

**Figura 4** – Área (ha) y producción (t) de aceite de colza a nivel mundial entre 1988 y 2018.

**Figura 5** – Producción (t) de los diez principales cultivos de hortalizas en el mundo en 2018.

**Figura 6** – Área (ha) y producción (t) de berenjena a nivel mundial entre 1988 y 2018.

**Figura 7** – Representación gráfica de los efectos a diferentes niveles de la autofagia en plantas como respuesta al estrés.

**Figura 8** – Fotografía de la cabina de flujo laminar con el material necesario antes de empezar el cultivo de microsporas.

**Figura 9** – Representación esquemática del protocolo del cultivo de microsporas de colza.

**Figura 10** – Evolución del cultivo de microsporas de *Brassica napus* L.

**Figura 11** – Evolución del cultivo de microsporas de *Solanum melongena* L.

**Figura 12** – Efecto del tratamiento continuo con Ac-DEVD-CHO y Z-VAD-FMK en cultivos de microsporas de colza mediante análisis cuantitativo del número de embriones por placa.

**Figura 13** – Efecto del tratamiento continuo con Obatoclastax en cultivos de microsporas de colza mediante análisis cuantitativo del número de embriones por placa.

**Figura 14** – Efecto del tratamiento continuo con Naringina en cultivos de microsporas de colza mediante análisis cuantitativo del número de embriones por placa.

**Figura 15** – Efecto del tratamiento continuo con Naringina a diferentes concentraciones (1, 10 y 100  $\mu$ M) en cultivos de microsporas de berenjena de anteras de 5,20 a 5,90 mm mediante análisis cuantitativo del número de callos por placa.

## **ÍNDICE DE TABLAS**

**Tabla 1** – Clasificación taxonómica de la colza.

**Tabla 2** – Clasificación taxonómica de la berenjena.

**Tabla 3** – Moduladores de la autofagia y la PCD con sus respectivas dianas empleados en el presente trabajo.

**Tabla 4** – Composición del medio NLN13 a pH 5.8 empleado para el cultivo de microsporas de colza.

**Tabla 5** - Condiciones ensayadas para cada compuesto en el cultivo de microsporas.

**Tabla 6** – Composición del medio NLN a pH 5.9 empleado para el cultivo de microsporas de berenjena.

## **ABREVIATURAS**

- **2,4-D:** Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
- **AFLP:** Amplified Fragment Length Polymorphisms
- **AL-PCD:** Apoptotic Like-Programmed Cell Death
- **ATG:** AuTophagy related Genes
- **Bcl-2:** B-Cell Lymphoma 2
- **BSA:** Bulk Segregant Analysis
- **DH:** Doble Haploide
- **F1:** Filial 1
- **F2:** Filial 2
- **HSP:** Heat-Shock Protein
- **PCD:** Programmed Cell Death
- **NO:** Nitric oxide
- **ROS:** Reactive Oxygen Species

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1. LA HETEROSIS EN LA MEJORA GENÉTICA VEGETAL**

### **1.1.1. RELEVANCIA DE LOS HÍBRIDOS**

La mejora vegetal es una actividad iniciada por nuestros antepasados desde la aparición de la agricultura. Esta mejora intuitiva, denominada selección masal, se basaba en la elección de las semillas o vegetales que presentaban mejores características fenotípicas (Cubero, 2003). Posteriormente, debido al progreso de las tecnologías y el conocimiento, esta mejora se vuelve científica y permite la manipulación genética de las especies vegetales para conferirles características optimizadas con el fin de satisfacer necesidades sociales y económicas.

Uno de los mecanismos más relevantes y estudiados en el ámbito de la mejora genética vegetal, por las numerosas ventajas que aporta, es la obtención de variedades híbridas. La heterosis, o vigor híbrido, hace referencia al comportamiento superior de la descendencia híbrida obtenida a partir de unos progenitores genéticamente diferentes entre sí. Dicho fenómeno fue observado por primera vez en el siglo XVIII por el botánico alemán Joseph Gottlieb Kölreuter al cruzar dos variedades distintas de tabaco y estudiado posteriormente por Charles R. Darwin en numerosas especies vegetales. Sin embargo, no fue hasta 1914, con George H. Shull, que dicho fenómeno fue definido y denominado “heterosis”.

Entre las ventajas que presenta este fenómeno genético cabe destacar la obtención de un cultivo híbrido totalmente homogéneo el cual permite un seguimiento de los periodos de maduración y recolección más claro y fácil para los agricultores. Esto se debe a que, si los híbridos son fruto de un cruce entre parentales de líneas puras u homocigóticas, es decir, que poseen las mismas copias de alelos para cada par de cromosomas homólogos, sólo se podrá obtener un genotipo híbrido en la generación F1. Por otra parte, este fenómeno fomenta el estudio y producción de semillas híbridas a partir de líneas puras ya que son las de mayor interés para los agricultores y, además, sólo pueden usarlas para una generación puesto que la siguiente (F2) presentaría una heterogeneidad no deseada al cruzarse híbridos entre sí.

### **1.1.2. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE LAS LÍNEAS PURAS**

Al ser los híbridos el resultado de un cruce entre líneas puras, el objetivo de la mejora vegetal es obtener estas últimas de la manera más eficaz y rápida posible. En la metodología clásica, se procede a realizar ciclos de autofecundación de determinada variante durante numerosas generaciones y posterior selección, lo cual posee diversas desventajas: en primer lugar, conlleva un notable gasto económico debido, sobre todo, a la necesidad de mano de obra y otros recursos durante un dilatado período de tiempo y, por otro lado, no garantiza la obtención de líneas 100% homocigóticas. El método tradicional presenta numerosos inconvenientes y no es el más adecuado, principalmente en el caso de las especies leñosas que poseen ciclos reproductivos mucho más largos y, en ciertos casos, incompatibilidad para la autofecundación (Germanà, 2006). Por todo ello, el desarrollo de técnicas alternativas que permitan la obtención de líneas puras de una forma fiable y rápida es de gran necesidad en este campo. En el presente estudio nos centraremos en la obtención de dobles haploides (DHs) mediante cultivo *in vitro*.

## **1.2. HAPLOIDES Y DOBLES HAPLOIDES**

Los vegetales haploides se caracterizan por ser individuos esporofíticos con un número de cromosomas propio de un gameto, es decir, igual a la mitad de la cantidad normal ( $n$  en vez de  $2n$ ). Este fenómeno se debe a que se originan a partir de un solo gameto o célula reproductora y no de la fusión de dos, como suele pasar en el ciclo reproductivo tradicional, con el fin de mantener constante la dotación cromosómica generación tras generación. Cuando se produce una duplicación del genoma de este tipo de individuos, obtenemos un DH que se caracteriza por ser homocigótico para todos sus *loci*, convirtiéndolo en una línea pura.

### **1.2.1. RELEVANCIA Y UTILIDAD**

El principal uso de los DHs en los programas de mejora genética vegetal es la obtención de individuos 100% homocigóticos en tan solo una generación frente a las siete u ocho requeridas en los métodos tradicionales, lo que los convierte en el elemento clave de un método alternativo mucho más rápido y barato.

No obstante, los DHs también presentan otras ventajas aplicables al campo de la investigación genética, un ejemplo de ello es la cartografía genética. Mediante los mapas genéticos, los mejoradores pueden identificar y localizar genes de interés económico para poder manipularlos y producir los mejores recombinantes (Forster y Thomas, 2005). La posibilidad de obtener individuos homocigóticos en un corto periodo de tiempo que pueden autoperpetuarse gracias a la autofecundación los convierte en candidatos ideales para estudios básicos de ligamiento y estimación de fracciones de recombinación. Por otro lado, el uso de estos individuos en estudios de transgénesis permite la generación de vegetales transformados con el transgen en ambos cromosomas homólogos evitando así la formación de hemicigotos, además de ahorrar tiempo y costes (Seguí-Simarro, 2010a). Los DHs constituyen una opción óptima para establecer asociaciones marcador molecular – carácter fenotípico por medio del “Bulked Segregant Analysis” (BSA). Ello se debe a que, al depender la eficacia de tal método estadístico del correcto fenotipado de los individuos de la población, los DHs permiten ser analizados repetidamente, así como proporcionar datos muy fiables. El uso combinado de DHs y BSA ha tenido mucho éxito en la selección basada en marcadores para numerosos caracteres de mejora, como es el caso de resistencia a plagas y enfermedades, o caracteres de calidad (Forster *et al.*, 2007). Además, los DHs son una herramienta muy útil para la selección y detección de mutantes recesivos ya que su fenotipo no puede verse afectado por los efectos de la dominancia al poseer las mismas copias de alelos para cada par de cromosomas homólogos. Aquellos individuos que presenten caracteres determinados por genes recesivos serán fáciles de identificar. Finalmente, los DHs pueden servir como sistema modelo para estudiar el desarrollo embriogénico *in vitro* sin la interferencia del tejido materno, empleando el cultivo de microsporas puesto que presenta numerosas similitudes con la embriogénesis cigótica (Seguí-Simarro, 2010a).

### **1.2.2. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE INDIVIDUOS HAPLOIDES**

La formación de individuos haploides puede darse de manera espontánea o inducida mediante técnicas que requieren tratamientos *in vivo* o *in vitro* a partir de los gametofitos masculino y femenino (Dunwell, 2010).

### 1.2.2.1. GENERACIÓN ESPONTÁNEA

Muchas especies tienen la capacidad de generar individuos haploides de manera espontánea. La primera especie en la cual fue observado y descrito dicho fenómeno fue en la *Datura stramonium* (Blakeslee *et al.*, 1922) seguida de *Nicotiana tabacum* (Clausen y Mann, 1924) y *Triticum aestivum* (Gaines y Aase, 1926). La generación espontánea de haploides puede producirse ya sea por el fenómeno de la partenogénesis (producción de un embrión a partir de un huevo no fecundado por un gameto masculino), androgénesis espontánea (la célula huevo sí que es fecundada pero el material genético materno es inactivado) o por apogamia (producción de un embrión a partir de una célula gametofítica diferente al huevo). No obstante, las escasas especies dotadas de tal anomalía biológica generan individuos haploides en pequeñas cantidades y con una baja viabilidad (Germanà, 2006; Seguí-Simarro, 2010a), por ende, los mejoradores vegetales se centran principalmente en estudiar y mejorar los protocolos de obtención de los haploides de manera inducida.

### 1.2.2.2. MÉTODOS DE INDUCCIÓN

Actualmente existen muchos métodos de obtención de haploides de manera inducida *in vivo* e *in vitro*:

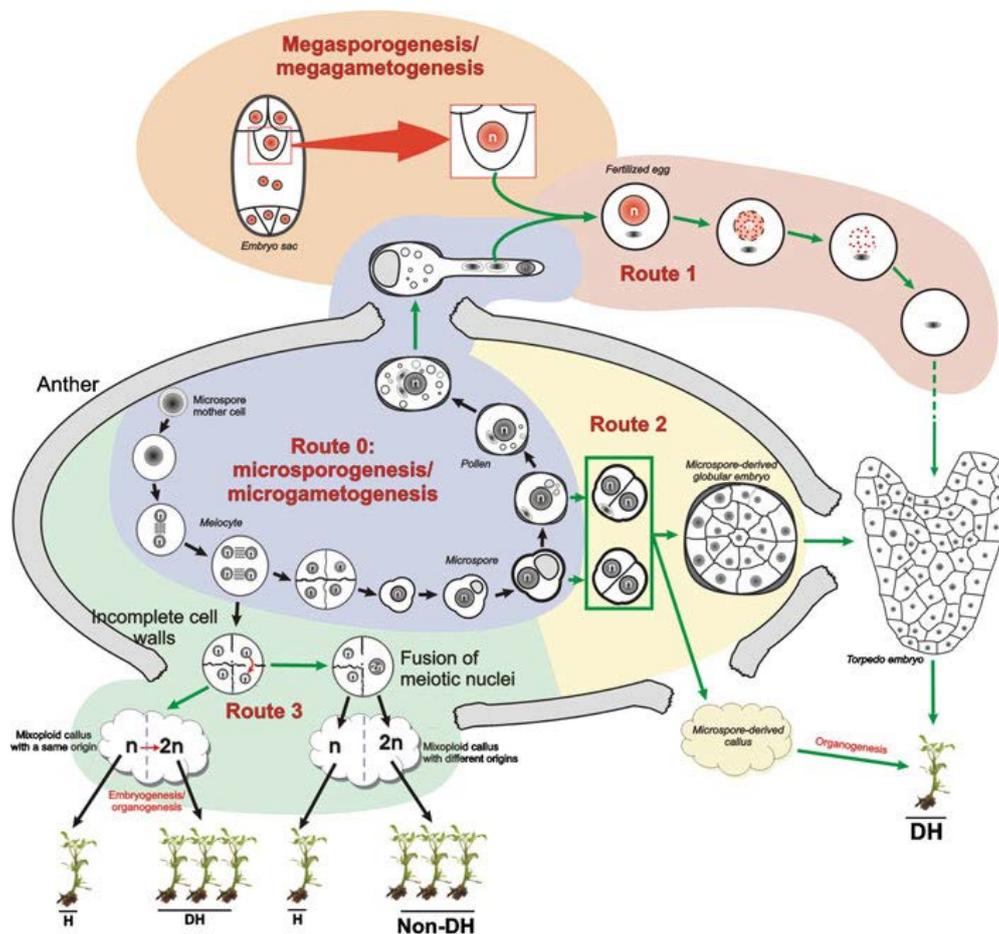
- **Hibridación interespecífica:** cruzamiento de dos especies incompatibles sexualmente entre sí, lo que resulta en el desarrollo de un individuo haploide proveniente exclusivamente del gameto femenino, excluyendo cualquier influencia genética del padre (Seguí-Simarro, 2010a). La primera vez que se observó este fenómeno fue al cruzar un gameto femenino de la especie *Hordeum vulgare* con uno masculino extraído de *Hordeum bulbosum*, lo que produjo en un primer momento un embrión híbrido que posteriormente eliminó progresivamente los cromosomas donados por el padre debido a incompatibilidades post-cigóticas (Devaux, 2003).
- **Partenogénesis mediante polinización con polen irradiado:** el polen mantiene inactivadas las células reproductoras masculinas y, por ende, es incapaz de fusionarse con la célula reproductora femenina pero sí de desencadenar el desarrollo embrionario (Seguí-Simarro, 2010a). Este método se ha llevado a cabo en especies tan importantes como el trigo, la cebolla, el maíz o el tabaco (Dunwell, 2010).
- **Ginogénesis:** capacidad de generación de individuos haploides o DHs a partir del gametofito femenino no fecundado. Se puede desarrollar cultivando *in vitro* óvulos y ovarios inmaduros hasta ser alcanzada la maduración del saco embrionario donde se desarrollará el embrión ginogénico (Seguí-Simarro, 2010b). Este método es empleado en especies que no presentan resultados satisfactorios con otras técnicas de inducción debido a su baja eficiencia (Seguí-Simarro, 2010a).
- **Androgénesis:** capacidad de generación de individuos haploides o DHs a partir del gametofito masculino (polen bicelular) o de su precursor, la microspora como explicaremos en el siguiente epígrafe.

### 1.2.2.3. ANDROGÉNESIS

La androgénesis engloba el conjunto de rutas de desarrollo embriogénico, alternativas a la cigótica, donde un individuo haploide se obtiene a partir del gametofito masculino. El haploide resultante será fruto de una reprogramación de la ruta gametofítica de la célula reproductora masculina a una esporofítica. Por ello, presentará exclusivamente los caracteres genéticos de la planta donante paterna (Seguí-Simarro y Nuez, 2008a).

#### 1.2.2.3.1. RUTAS ANDROGÉNICAS

Tres son las posibles rutas androgénicas que puede seguir la microspora o grano de polen inmaduro para engendrar individuos haploides y DHs (Figura 1).



**Figura 1** – Diferentes rutas androgénicas para la reprogramación del desarrollo gametofítico de la microspora o polen (ruta 0) a uno esporofítico. Ruta 1: Embriogénesis del haploide en el saco embrionario mediante fecundación de la célula huevo con un núcleo desactivado. Ruta 2: Embriogénesis u ocasional calogénesis seguida de organogénesis a partir de microspora vacuolada o polen joven. Ruta 3: Calogénesis derivada de meiocitos que puede dar haploides y DHs pero también diploides heterocigóticos (Seguí-Simarro, 2010a).

#### **RUTA 1: Embriogénesis haploide en el saco embrionario**

En esta primera vía androgénica el embrión es originado a partir de la fecundación de una célula huevo cuyo núcleo ha sido inactivado o eliminado permitiendo así que sólo se mantengan los genes paternos. Esta ruta fue descrita por primera vez en 1929 (Clausen y Lammerts, 1929; Kostoff, 1929) puesto que se puede producir de manera espontánea en algunas especies.

Lamentablemente, no se ha avanzado mucho en el estudio de sus procesos celulares y el control genético de éstos a lo largo de estos años, probablemente debido a su escasa aparición en la naturaleza.

### **RUTA 2: Embriogénesis a partir de microsporas o polen**

En esta ruta, la microspora (generalmente en estado vacuolado) o el grano de polen joven son desviados de su ruta gametofítica original hacia la embriogénesis o callogénesis (Seguí-Simarro, 2010a). Esta vía androgénica es la más efectiva y usada para desarrollar haploides y DHs, por ello es la que nos vamos a basar en el presente estudio.

### **RUTA 3: Callogénesis a partir de meiocitos**

Bajo condiciones *in vitro* apropiadas, los meiocitos pueden ser inducidos a proliferar como callos. Posteriormente, los individuos haploides y DHs podrán ser formados ya sea por embriogénesis indirecta u organogénesis. Al igual que la primera ruta descrita, la callogénesis a partir de meiocitos es muy poco frecuente y ha sido poco estudiada desde su descubrimiento en los años 70 debido, en parte, a que los meiocitos son células difíciles de utilizar en cultivo *in vitro* (Seguí-Simarro, 2010a).

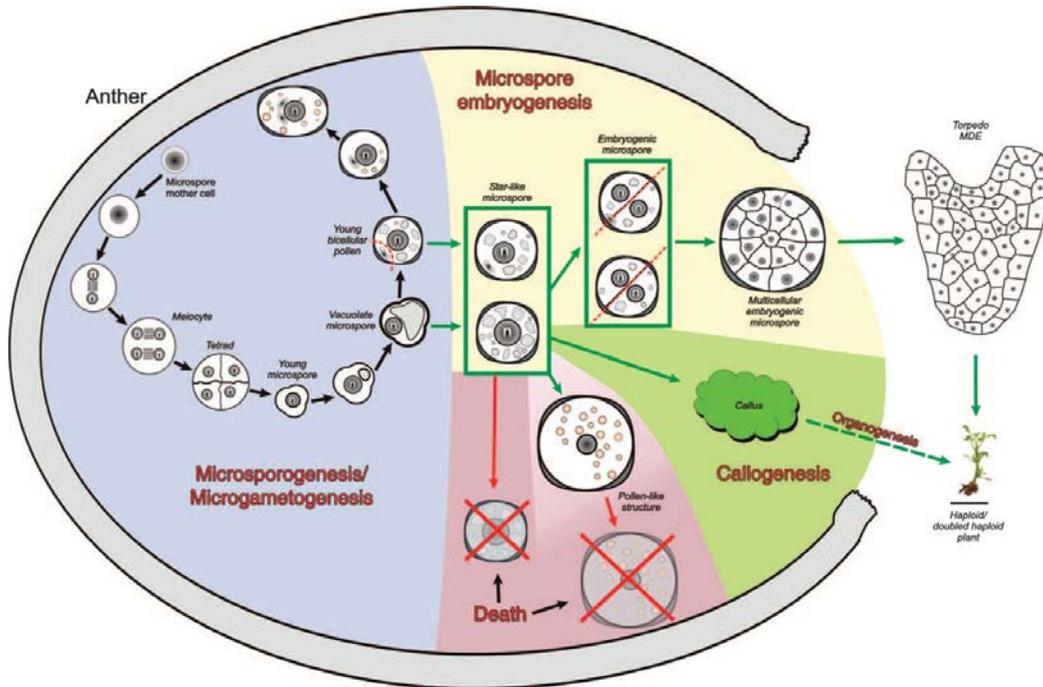
#### **1.2.2.3.2. EMBRIOGÉNESIS DERIVADA DE MICROSPORAS**

La embriogénesis derivada de microsporas es un sistema *in vitro* en el cual la microspora haploide es reprogramada mediante el empleo de tratamientos externos de estrés para emprender la vía embriogénica (Figura 2). Los individuos haploides resultantes podrán duplicar su genoma de manera espontánea o inducida para poder convertirse en DHs completamente homocigóticos para cada uno de sus locus (Testillano, 2019), tal como veremos más adelante. Este método fue descrito por primera vez en *Datura innoxia* (Guha y Maheshwari, 1964) y su eficacia se ha podido verificar desde entonces en más de 250 especies distintas (Maluszynski *et al.*, 2003) convirtiéndolo en el sistema de obtención de DHs más eficiente y usado actualmente.

Actualmente existen dos técnicas que pueden ser empleadas para obtener DHs mediante inducción de embriogénesis derivada de microsporas: el cultivo de anteras y el cultivo de microsporas aisladas.

La primera técnica hace referencia al cultivo *in vitro* de las anteras conteniendo las microsporas en su interior. Se realiza mediante aislamiento y selección de las anteras contenidas en las yemas florales en el estadio adecuado para inducir la embriogénesis seguido de su cultivo *in vitro* en un medio de cultivo a semisólido a base de agar generalmente. Unas semanas después, las microsporas que se hallan dentro del saco polínico se transforman en embriones o callos y emergen de la antera que desarrollará necrosis (Seguí-Simarro, 2016). Por otro lado, el cultivo de microsporas aisladas se basa en extraer directamente las microsporas que se hallan dentro de las anteras e inocularlas en medio líquido (Seguí-Simarro, 2010a). La primera técnica es más simple ya que se requiere menos equipamiento y precauciones que para la segunda. Además, al cultivar también el tejido de la antera, las microsporas crecen en un ambiente menos artificial y más adecuado para su desarrollo (Seguí-Simarro y Nuez, 2008a), no obstante, en las especies en las que el cultivo de microsporas aisladas resulta efectivo, se prefiere dicha metodología dado que permite investigar mejor los procesos celulares, fisiológicos, bioquímicos y moleculares

involucrados en la embriogénesis visto que, al no estar presente el tejido de la antera, se evitan sus posibles efectos sobre las microsporas (Forster *et al.*, 2007; Germanà, 2011). Además, se ha verificado que es un método más eficiente y rápido, puesto que el cultivo de anteras requiere periodos temporales de semanas a meses para producir unos pocos embriones por antera cultivada frente a los cientos, o incluso miles, de embriones que se pueden obtener a partir de las microsporas de una sola antera en pocas semanas en ciertas especies herbáceas con el cultivo de microsporas aisladas (Seguí-Simarro, 2016).



**Figura 2** – Representación esquemática de las diferentes rutas de desarrollo embriogénico de la microspora. En azul se ve representada la ruta gametofítica tradicional del desarrollo del polen a partir de la microspora que puede ser inducida a desviarse hacia una embriogénica (en amarillo) caracterizada por un mayor tamaño y una división simétrica. En verde se ha representado la vía de calogénesis que puede formar DHs a partir de la organogénesis y en rojo las posibles rutas mortales que puede proseguir la microspora. (Seguí-Simarro y Nuez, 2008a)

Diversos factores, tanto endógenos como exógenos, influyen en la eficiencia de la inducción embriogénica de las microsporas. En cuanto a los endógenos cabe mencionar el genotipo y condiciones de la planta donante dado que, dependiendo de la especie, la respuesta a la inducción embriogénica será mejor o peor. Se cree que la competencia androgénica tiene una base genética visto que puede ser heredada en la descendencia y es controlada por más de un gen con carácter recesivo (Rudolf *et al.*, 1999; Smykal, 2000). Por otro lado, como factor endógeno crucial encontramos el estado de desarrollo de la microspora. En la mayoría de especies el periodo óptimo para inducir la embriogénesis y así obtener una mayor respuesta en el cultivo se ubica aproximadamente en la primera mitosis del polen, es decir, entre el estadio de microspora vacuolada y el de polen bicelular joven ya que su estado transcripcional no se encuentra diferenciado, sino más bien proliferativo, a diferencia del caso del polen maduro. Por último, los factores exógenos que influyen en esta técnica se refieren principalmente a las condiciones de cultivo (composición del medio, pH, luz, temperatura...) y el tipo de estrés aplicado, tema que trataremos más adelante.

### 1.2.2.3.3. VENTAJAS Y LIMITACIONES

La androgénesis presenta numerosas ventajas y por ello constituye la técnica de obtención de DHs más empleada y eficiente. Según Corral-Martínez (2010), entre ellas cabe destacar:

- Técnica perfeccionada en un mayor número de especies en comparación con la hibridación interespecífica y la ginogénesis que sólo pueden ser realizadas en un número muy reducida de éstas.
- Mayor eficiencia al obtener DHs en comparación con los otros métodos posibles.
- Obtención de un mayor porcentaje de individuos que duplican espontáneamente su genoma sin necesitar métodos de inducción adicionales como la hibridación interespecífica que requiere de un tratamiento de colchicina.
- La floración sincronizada de los parentales no es requerida, condición necesaria en la hibridación interespecífica.

No obstante, exceptuando las especies modelos como la cebada, el tabaco o la colza, la eficacia de la técnica sigue siendo muy baja, sobre todo en especies recalcitrantes de alto interés agronómico como la familia de las solanáceas (Seguí-Simarro, 2016). Los principales factores limitantes son los altos niveles de muerte celular y baja eficiencia de reprogramación de las microsporas al inicio del proceso de inducción (Testillano, 2019). Por todo ello, se pretende investigar más a fondo dichos protocolos androgénicos para poder alcanzar una mayor eficiencia en la técnica en un mayor número de especies.

### 1.2.3. DUPLICACIÓN CROMOSÓMICA

Por razones prácticas se desea obtener DHs fértiles a partir de los individuos haploides obtenidos tras el empleo de algunos de los métodos mencionados previamente mediante duplicación cromosómica, ya que éstos presentan un tamaño reducido, son menos vigorosos, más susceptibles de enfermar y, sobre todo, estériles. En muchas especies, esta duplicación cromosómica ocurre de manera espontánea en un porcentaje variable de individuos a causa de las condiciones *in vitro* empleadas para inducir la androgénesis (Seguí-Simarro y Nuez, 2008b). No obstante, no en todos los casos esa cantidad de individuos es satisfactoria y, por tanto, se debe recurrir a tratamientos con agentes químicos de inducción de duplicación cromosómica para elevarlo.

En cuanto a los mecanismos involucrados en la duplicación cromosómica espontánea cabe destacar la endoreduplicación y la fusión nuclear. El primero se caracteriza por la adición de una o más rondas de duplicación de las cromátidas (aparte de la que ocurre normalmente en la fase S del ciclo celular) y un bloqueo de la mitosis en la fase M. En segundo lugar, la fusión nuclear presenta una mitosis y cariocinesis normal, pero con ausencia de citocinesis posterior lo que provoca una fusión de los núcleos que acababan de separarse.

Ahora bien, si el número de DHs espontáneos no se da en la cantidad deseada, existen métodos de inducción como la duplicación cromosómica por c-mitosis. Este fenómeno hace referencia a la duplicación cromosómica artificial producida por la adición de colchicina, alcaloide extraído de varias especies del género *Colchicum* (Seguí-Simarro y Nuez, 2008b). Este compuesto bloquea la mitosis de la célula uniéndose a la tubulina, lo que inhibe la formación de microtúbulos y, a

su vez, la migración polar de los cromosomas resultando en una célula con un número de cromosomas por duplicado (Barnabás *et al.*, 1999). Se ha comprobado que el momento de aplicación del alcaloide más eficiente es al principio del proceso, es decir, durante la inducción de la androgénesis de cultivo ya que los niveles de quimerismo se reducen drásticamente y se requiere menos cantidad de colchicina que dispensar (Zhou *et al.*, 2002; Seguí-Simarro y Nuez, 2008b). También se han estudiado alternativas a dicho alcaloide como es el caso de algunos herbicidas (la trifluralina, el amiprofos-metil o la orizalina), que han respondido adecuadamente en *Brassica napus* (Hansen y Andersen, 1998). No obstante, estos tratamientos con herbicidas alternativos están más limitados dado que no funcionan en tantas especies como la colchicina (Seguí-Simarro y Nuez, 2008b).

### 1.3. COLZA

#### 1.3.1. TAXONOMÍA

La colza (*Brassica napus* L.) es una planta herbácea perteneciente a la familia de las brasicáceas (Tabla 1) que se suele cultivar como anual pero puede ser bienal en ciertos casos.

**Tabla 1** – Clasificación taxonómica de la colza (USDA, NRCS Plants database)

Nivel Taxonómico	Nombre Científico
Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Tracheobionta</i> (Plantas vasculares)
Superdivisión	<i>Spermatophyta</i> (Plantas con semilla)
División	<i>Magnoliophyta</i> (Plantas con flores)
Clase	<i>Magnoliopsida</i> (Dicotiledóneas)
Subclase	Dilleniidae
Orden	<i>Capparales</i>
Familia	<i>Brassicaceae/Cruciferae</i>
Género	<i>Brassica</i> L.
Especie	<i>Brassica napus</i> L.

La colza comparte género taxonómico con especies tan relevantes como el brócoli (*B. oleracea italica*), el nabo (*B. rapa rapa*) o las múltiples mostazas que existen. De la especie *B. napus* se derivan tres subespecies: *B. napus oleifera* (colza), *B. napus pabularia* (nabicol) y *B. napus rapifera* (colinabo), sin embargo, al poseer la colza una relevancia económica mayor que el nabo y el colinabo, se suele hacer referencia a ella como *Brassica napus* sin necesidad de especificar la subespecie. La planta de la colza se caracteriza por presentar unas flores con pétalos de color amarillo intenso y un tallo que no supera la altura del metro y medio.

#### 1.3.2. ORIGEN

Se considera que la especie *Brassica napus* tiene su origen a raíz de una serie de hibridaciones interespecíficas naturales (Gómez-Campo y Prakash, 1999) entre especies del mismo género taxonómico hace 7.000 años aproximadamente, *Brassica rapa* constituiría el ancestro materno y *Brassica oleracea* el paterno (Lu *et al.*, 2019). La ubicación exacta del origen de la especie no

se sabe con certeza ya que ambas especies progenitoras poseen lugares de crecimiento salvaje diversos. Se estima que *Brassica napus* no es una especie presente en la naturaleza de manera salvaje sino que surge de forma espontánea en un entorno agrícola. Su domesticación se estima por el 1600, año en el que la colza ya fue empleada como cultivo para extraer su aceite y usarlo con fines alimenticios y utilitarios (Gómez-Campo y Prakash, 1999).

### 1.3.3. RELEVANCIA ECONÓMICA

El aceite extraído de las semillas de colza representa el cultivo oleaginoso a nivel mundial más producido después de la soja (Figura 3; FAOSTAT 2018). Su aceite es extraído para diversas funciones, siendo la alimenticia la predominante, pero pudiendo servir también para ejercer como biocombustible (Banuelos *et al.*, 2013). El aceite de colza natural posee unos niveles de ácido erúxico y glucosinolatos muy elevados que pueden ser perjudiciales para la salud si se consumen con regularidad. Es consecuencia, en las últimas décadas se ha impulsado el desarrollo de cultivos modificados que presentasen bajos niveles de estos compuestos. El primero se desarrolló en 1968 y fue denominado *Oro*, el cultivo presentaba un bajo contenido en ácido erúxico, y posteriormente se desarrollaron los cultivos “canola”, siendo el denominado *Tower* el pionero en 1974. Estas variedades de *B. napus* y *B. rapa* se caracterizan por contar en su composición con menos del 2% de ácido erúxico en aceite y 30 mmol/gramo de glucosinolatos en la torta de semilla. En 1986 fueron añadidas a la lista GRAS (del inglés, *Generally Recognized As Safe*) de alimentos en Estados Unidos (Eskin y Przybylski, 2003) y por ello el cultivo de esta planta ha crecido muy rápido en los últimos años consiguiendo triplicar su producción mundial así como doblando el área de cosecha (Figura 4).

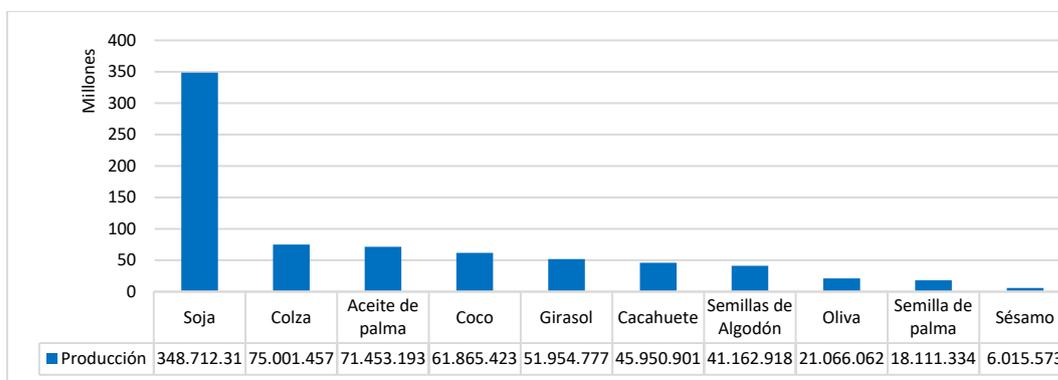


Figura 3 – Producción (t) de los diez principales cultivos oleaginosos en el mundo en 2018 (FAOSTAT 2018)

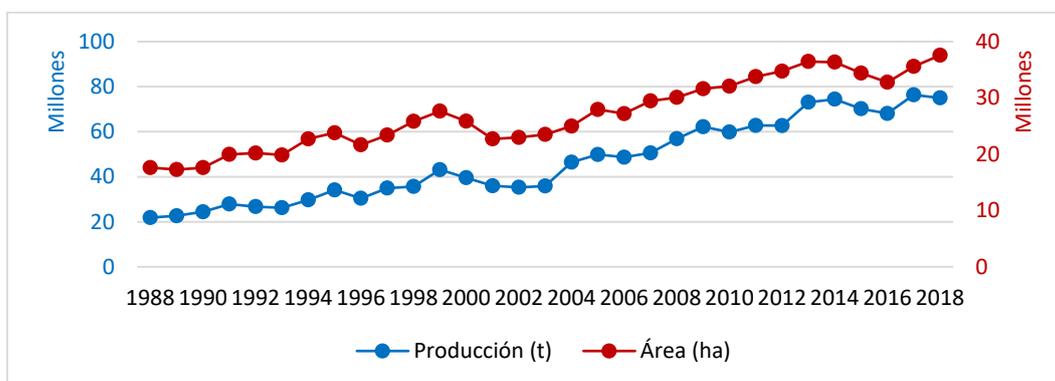


Figura 4 – Área (ha) y producción (t) de aceite de colza a nivel mundial entre 1988 y 2018 (FAOSTAT 2018)

El principal país productor de aceite de colza en 2018 fue China con 11.838.002,32 toneladas seguido de Canadá (11.290.468 t) e India (6.481.864 t). El cuarto mayor productor de aceite de colza mundial y primero de Europa fue Alemania con 4.405.523,64 toneladas (FAOSTAT 2018).

## 1.4. BERENJENA

### 1.4.1. TAXONOMÍA

La berenjena (*Solanum melongena* L.) es una hortaliza perteneciente a la familia de las solanáceas (Tabla 2) que, aun pudiendo ser perenne, se suele cultivar como anual.

Tabla 2 – Clasificación taxonómica de la berenjena (USDA, NRCS Plants database)

Nivel Taxonómico	Nombre Científico
Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Tracheobionta</i> (Plantas vasculares)
Superdivisión	<i>Spermatophyta</i> (Plantas con semilla)
División	<i>Magnoliophyta</i> (Plantas con flores)
Clase	<i>Magnoliopsida</i> (Dicotiledóneas)
Subclase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Solanales</i>
Familia	<i>Solanaceae</i>
Género	<i>Solanum</i> (Belladona)
Especie	<i>Solanum melongena</i> L.

La familia *Solanaceae* está compuesta por plantas herbáceas, arbóreas o arbustivas y dentro de ella encontramos especies tan importantes como la de la patata (*Solanum tuberosum*), el tabaco (*Nicotiana tabacum*, *N. rustica*) o el tomate (*Solanum lycopersicum*). *Solanum melongena* es una especie diploide que posee una baya como fruto cuyas características dependen de la variedad empleada, las formas que prevalecen son las ovoides y alargadas de color violeta, morado oscuro, amarillo o blanco.

### 1.4.2. ORIGEN

Se considera que *Solanum melongena* tuvo origen en la región indo-birmana como propuso Vavilov en 1951 y que fue el resultado de una domesticación llevada a cabo en la especie silvestre *Solanum incanum*, predominante en África tropical y Oriente Medio, como sugirieron posteriormente Lester y Hasan (1991) quienes se centraron en estudiar las isozimas de ambas especies. *S. incanum* habría migrado hacia el Sudeste Asiático gracias a los desplazamientos humanos realizados en épocas prehistóricas donde se diferenciaría a *S. melongena* (Meyer *et al.*, 2012). Todas estas hipótesis fueron respaldadas en estudios posteriores que emplearon técnicas de análisis molecular tomando como muestra ADN cloroplástico (Sakata y Lester, 1997), mediante AFLPs (Mace *et al.*, 1999; Furini y Wunder, 2004; Meyer *et al.*, 2012) o comparación de secuencias nucleotídicas (Weese y Bohs, 2010) entre otros.

Se cree que la domesticación de *Solanum melongena* se produjo de manera independiente tanto en India (Mace *et al.*, 1999; Weese y Bohs, 2010) como en China (Wang *et al.*, 2008), añadiendo

un tercer posible origen en Malasia. Más adelante, su migración a Europa, África y Oeste Asiático habría sido llevada a cabo gracias a la ruta de la seda y a los comerciantes árabes en el siglo XIV (Meyer *et al.*, 2012).

### 1.4.3. RELEVANCIA ECONÓMICA

La berenjena forma parte de la dieta base de numerosos países en todo el mundo y, por ello, es uno de los cultivos más importantes representando la quinta hortaliza más producida mundialmente (Figura 5) después del tomate, la cebolla, el pepino y pepinillo y el repollo (FAOSTAT 2018).

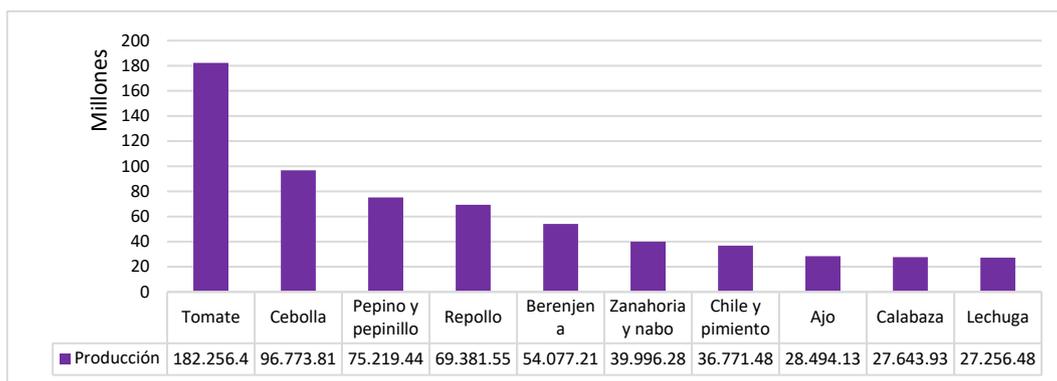


Figura 5 – Producción (t) de los diez principales cultivos de hortalizas en el mundo en 2018 (FAOSTAT 2018)

En los últimos treinta años, tanto su producción como su área de cultivo se han duplicado hasta superar los 50 millones de toneladas y 1.500 hectáreas respectivamente (Figura 6). Según los datos de la FAO, el principal país productor de la hortaliza en 2018 fue China contando con 17.379.184,97 toneladas, seguido de India (8.341.090,97 toneladas) y Egipto (868.857,1 t). El primer país productor europeo y octavo del mundo es Italia con 315.058,52 t.

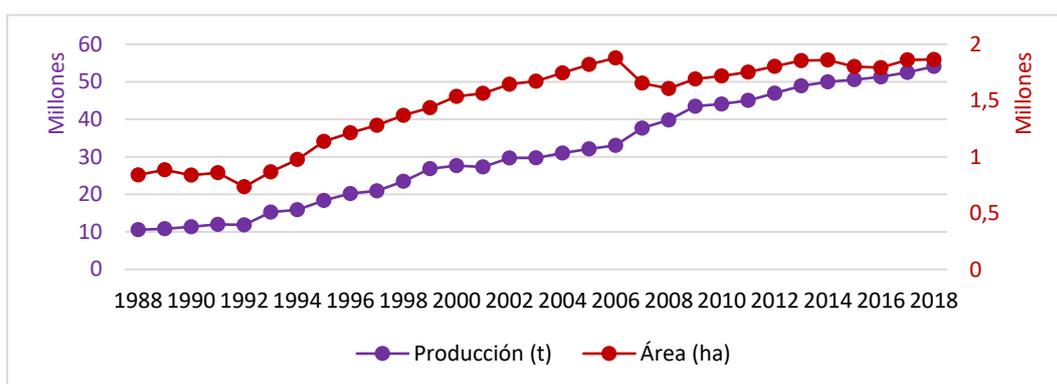


Figura 6 – Área (ha) y producción (t) de berenjena a nivel mundial entre 1988 y 2018 (FAOSTAT 2018)

## 1.5. RESPUESTA A ESTRÉS EN PLANTAS

### 1.5.1. RESPUESTA A ESTRÉS EN EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS

El hecho de aplicar un estrés al cultivo de microsporas tiene como finalidad desencadenar una serie de cambios de desarrollo en éstas para inducir la correcta reprogramación hacia la

embriogénesis. A pesar de existir una amplia variedad de estreses diversos que se pueden emplear, la microspora cultivada sufre una serie de procesos celulares similar en todos los casos: aumento de tamaño, replicación del ADN o mitosis seguida de una detención del ciclo celular, autofagia del citoplasma, reorganización del citoesqueleto y del citoplasma que conlleva el desplazamiento del núcleo al centro de la microspora, formación de una nueva pared celular por debajo de la gametofítica, compactación de la cromatina y cambios en la expresión génica (Zorinians *et al.*, 2005). No obstante, cada estrés posee sus peculiaridades e induce cambios en la microspora diferentes. Los estreses usados mayoritariamente son el frío, el calor, el ayuno de carbono y la adición de colchicina en bajas concentraciones, sin embargo, otros tipos de estrés han sido estudiados como es el caso de un elevado pH en el medio o la adición a éste de metales pesados (Shariatpanahi *et al.*, 2006).

El estrés con frío puede durar de días a semanas en temperaturas cercanas a los 4-10°C y se suele emplear como pre-tratamiento antes de realizar el cultivo puesto que se ha verificado que reduce los procesos de degradación, al igual que incrementa el contenido en aminoácidos de los tejidos de la antera protegiendo y nutriendo mejor a las microsporas. También potencia la endorreproducción y por tanto, el número de DHs obtenidos (Shariatpanahi *et al.*, 2006).

El estrés con calor puede durar de varias horas a días en temperaturas entorno a los 33-37°C (Shariatpanahi *et al.*, 2006). Es un desencadenante muy efectivo para cambiar el desarrollo de la ruta gametofítica a embriogénica en microsporas y, aparte de los efectos mencionados previamente, se caracteriza por inducir la síntesis de Heat Shock Proteins (HSPs). Las HSPs son unas chaperonas que tienen como función ayudar al correcto plegamiento de otras proteínas y degradar moléculas inestables, no son exclusivas del choque térmico visto que también son sintetizadas en plantas a raíz de tratamientos osmóticos, oxidativos o de metales pesados. En el contexto de la inducción de embriogénesis en microsporas, se cree que las HSPs interfieren en la síntesis de proteínas necesarias para la diferenciación a polen de la microspora, por lo tanto, facilitarían el desarrollo esporofítico de ésta (Telmer *et al.*, 1993). También se ha detectado la presencia y desarrollo de componentes ligados al ciclo celular como las quinasas activadas por mitógeno (MAPKs) o el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) en microsporas reprogramadas tras inducción con choque térmico (Zorinians *et al.*, 2005). Al ser el choque de calor el tipo de estrés más efectivo será el que empleemos en nuestro estudio y detallaremos en el siguiente punto en relación con las especies examinadas.

El ayuno de carbono en el cultivo de microsporas constituye una herramienta muy útil y efectiva para inducir la embriogénesis en numerosas especies (Touraev *et al.*, 2001). Este tipo de estrés provoca cambios citoplasmáticos y nucleares en la microspora tales como la desdiferenciación de plástidos, dilatación de la pared celular, pérdida de poros nucleares en el núcleo vegetativo o cambios en la cromatina entre otros (Shariatpanahi *et al.*, 2006).

La colchicina es empleada para inducir la duplicación cromosómica como ya hemos mencionado antes. No obstante, también se usa como factor estresante para inducir la embriogénesis en el cultivo de microsporas ya que provoca una despolimerización de los microtúbulos al unirse a los heterodímeros de tubulina. Esta despolimerización permite que el núcleo sea liberado de su anclaje a la pared celular de la microspora, se sitúe en la zona central de la microspora (Simmonds, 1994) y la asimetría de ésta desaparezca bloqueando así el desarrollo gametofítico

normal (Zhao *et al.*, 1996). También se considera que esta despolimerización induce cambios en el ciclo celular de la microspora que favorecen el desarrollo embriogénico así como una elevada cantidad de tubulinas libres en la célula, lo que reprimiría la síntesis de nuevas tubulinas, incluyendo las específicas del desarrollo del polen (Zoriniants *et al.*, 2005).

### **1.5.2. RESPUESTA A ESTRÉS TÉRMICO EN *Brassica napus* Y *Solanum melongena***

Los primeros estudios sobre inducción de embriogénesis en microsporas de *Brassica napus* fueron llevados a cabo realizando un cultivo de anteras con un pre-tratamiento de frío y, posteriormente, se verificó que el añadir un estrés térmico de tres días a 32°C la eficiencia de la reprogramación esporofítica incrementaba considerablemente (Lichter, 1982; Chuong y Beversdorf, 1985). Las principales respuestas celulares ante tal estrés en las microsporas de colza son la migración del núcleo a una posición central por la aparición de la banda de preprofase que no aparecen en la ontogenia usual del polen, síntesis de almidón por los plastidios, el desarrollo de una pared celular gruesa por debajo de la intina, la aparición de gránulos en el citoplasma y la característica división simétrica de la microspora propia del cambio de la ruta de desarrollo gametofítica a la esporofítica (Zaki y Dickinson, 1990; Telmer *et al.*, 1993; Touraev *et al.*, 2001; Simmonds, 1994). También se ha verificado la síntesis *de novo* de ARNs y HSPs específicos del choque térmico (Touraev *et al.*, 2001) y se ha prestado especial atención en la translocación del citoplasma al núcleo de la proteína HSP70 sugiriendo que posee una función específica en la embriogénesis inducida por estrés térmico (Seguí-Simarro *et al.*, 2003). Asimismo, se sabe que el choque de calor fluidiza las membranas plasmáticas lo que facilitaría el flujo de iones como el calcio, haciendo aumentar sus niveles intracelulares en la microspora (Ahmadi *et al.*, 2018).

*Solanum melongena* es una especie recalcitrante y, actualmente, no presenta unos resultados muy satisfactorios en el cultivo de microsporas. Uno de los inconvenientes más importantes es la formación de callos en vez de embriones tras el cultivo, lo que acarrea, en muchas ocasiones, anomalías genéticas no deseadas (Isouard *et al.*, 1979). Los primeros estudios para obtener individuos haploides en berenjena se realizaron a partir de cultivo de anteras sin emplear el estrés térmico (Chinese Research Group of Haploid Breeding, 1978; Isouard *et al.*, 1979), no obstante, presentaban una eficiencia bastante baja. Pocos años después, Dumas de Vaultx y Chambonnet (1982) propusieron un protocolo empleando un tratamiento de inducción por calor incubando las anteras durante los ocho primeros días de cultivo a 35°C. Tomando como control un cultivo que no sufrió el estrés térmico (incubado a 25°C durante todo el proceso), la eficacia de embriogénesis se triplicó al añadir el estrés por altas temperaturas. Además, el añadir al medio de cultivo 2,4-D y kinetina a bajas concentraciones también hizo aumentar el rendimiento del experimento. El protocolo original se ha ido mejorando con los avances del conocimiento científico, sin embargo, el cultivo de anteras en *Solanum melongena* posee ciertos inconvenientes. El grosor particular de las paredes de la antera es uno de ellos ya que limita la difusión de ciertos componentes del medio a la microspora, reduciendo así la inducción embriogénica y por tanto la eficiencia del proceso (Salas *et al.*, 2012). Además, el cultivo de anteras no impide la formación de callos somáticos o embriones provenientes del tejido de la antera y, al cultivarla junto a las microsporas, no es posible estudiar los primeros estadios de la embriogénesis de éstas debido a la presencia de su pared celular (Corral-Martínez y Seguí-Simarro, 2012). Es por todo ello que hay un gran interés en desarrollar un protocolo de cultivo

de microsporas aisladas eficiente en berenjena, puesto que solventaría las limitaciones ya mencionadas. No obstante, los estudios llevados a cabo en este campo (Miyoshi, 1996; Corral-Martínez y Seguí-Simarro, 2012, 2014) son aún muy escasos, siendo aún numerosas las incógnitas por resolver.

## **1.6. AUTOFAGIA EN PLANTAS**

La autofagia es un mecanismo celular catabólico universal y conservado en las células eucarióticas que tiene como objetivo degradar y reciclar componentes celulares dañados o tóxicos propios, así como nutrientes. En las células animales, el orgánulo responsable de la digestión al contener enzimas hidrolíticas y proteolíticas, es el lisosoma mientras que en levaduras y plantas es la vacuola.

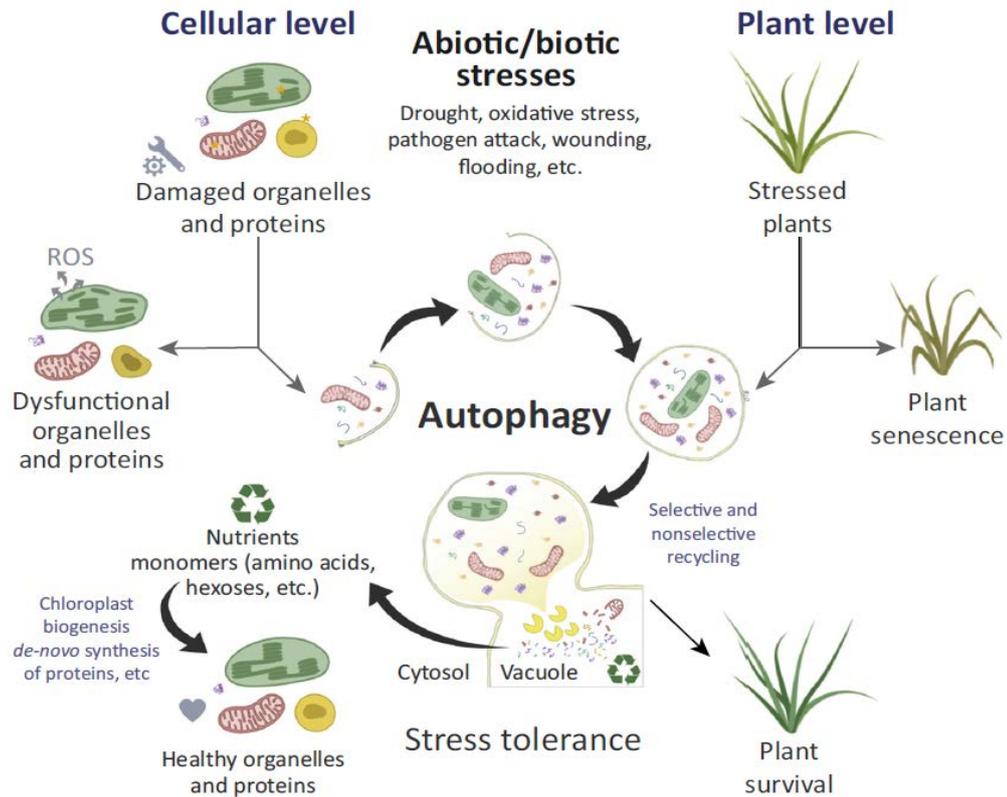
En el reino vegetal encontramos tres tipos distintos de autofagia: microautofagia, macroautofagia y mega-autofagia. El primero hace referencia al secuestro de pequeñas porciones del citoplasma dentro de vacuolas mientras que la macroautofagia, el tipo más común y denominada “autofagia” a partir de este punto, es el secuestro de porciones citoplasmáticas mayores (pudiendo llegar hasta orgánulos enteros) en estructuras con membrana doble denominadas autofagosomas que se fusionan posteriormente con el tonoplasto para degradar el cuerpo autofágico constituido por la membrana interna y el contenido del autofagosoma (Bassham, 2007). El tercer tipo está estrechamente ligado a la muerte celular programada (PCD en inglés, de *Programmed Cell Death*, a partir de este punto nos referiremos con estas siglas a dicho proceso) y se denomina mega-autofagia dado que es la degradación de componentes celulares de manera masiva y no selectiva por la liberación de hidrolasas vacuolares debido a la ruptura del tonoplasto (van Doorn y Woltering, 2005).

En líneas generales, el mecanismo de autofagia comienza con la inducción y reconocimiento del material citoplasmático a degradar, seguido de una formación, expansión y cierre del fagóforo para acabar formando el autofagosoma. Éste se fusionará con el tonoplasto para proceder a la descomposición (Su *et al.*, 2020). Los genes responsables del proceso son los denominados ATG (del inglés *AuTophagy-related Genes*) que fueron identificados por primera vez en levadura pero que, actualmente, ya se conocen la mayoría de sus homólogos en muchas especies vegetales (Tang y Bassham, 2018).

En condiciones normales, se estima que los organismos mantienen unos niveles de autofagia basales constantes y necesarios para mantener su homeostasis (Yoshimoto *et al.*, 2004). Sin embargo, la autofagia es también un mecanismo de defensa que surge como respuesta a estreses exógenos.

### **1.6.1. AUTOFAGIA EN PLANTAS COMO RESPUESTA AL ESTRÉS**

Al ser individuos sésiles, las plantas deben adaptarse a diversas situaciones estresantes como puede ser la falta de nutrientes, el estrés oxidativo o el térmico, entre otros. Como respuesta a estos estreses, los organismos vegetales desarrollan mecanismos de autofagia para degradar y reutilizar proteínas o componentes celulares dañados y sobrevivir (Figura 7).



**Figura 7** – Representación gráfica de los efectos a diferentes niveles de la autofagia en plantas como respuesta al estrés (Signorelli *et al.*, 2019)

El cultivo de células en suspensión bajo condiciones de ayuno de carbono es un sistema modelo óptimo para estudiar los procesos autofágicos en plantas (Bassham *et al.*, 2006). En el cultivo de células de arroz sin presencia de azúcares en el medio, se pudo medir un incremento de la autofagia vacuolar y de la expresión de las  $\alpha$ -amilasas junto a la presencia de gránulos de almidón en las vacuolas (Chen *et al.*, 1994) mientras que en el de sicómoro se percibió que, tras seis días de ayuno, la cantidad de peroxisomas, leucoplastos y mitocondrias en el citoplasma se redujo a menos del 20% total, además de la aparición de vacuolas autofágicas (Aubert *et al.*, 1996). Se verificó también que, ante una situación de falta de nitrógeno en el medio en *Arabidopsis thaliana*, la autofagia permitía el reciclaje y movilización de nutrientes (Guiboileau *et al.*, 2012) así como un desarrollo más eficiente de la elongación de las raíces (Yoshimoto *et al.*, 2004). Por otra parte, la exposición ante un estrés oxidativo como la adición de  $H_2O_2$  en *Arabidopsis thaliana* también conllevó una transferencia de proteínas oxidativas a la vacuola con el fin de degradarlas por mecanismos autofágicos (Bassham, 2007). En último lugar, la respuesta autofágica en plantas ante un estrés térmico también ha sido largamente estudiado en especies como *Arabidopsis*, tomate o pimiento sugiriendo que dicho mecanismo confiere una termotolerancia a la planta en cuestión (Tang y Bassham, 2018).

Todas estas observaciones convergen en un mismo punto: la autofagia es una respuesta celular de adaptación y supervivencia frente a un estrés exógeno. No obstante, en la embriogénesis derivada de cultivo de microsporas, este mecanismo podría ser el detonante de una serie de consecuencias fatales que podría desembocar en la muerte celular (Bárány *et al.*, 2018) como se explicará en el siguiente epígrafe.

### 1.6.2. AUTOFAGIA EN PLANTAS COMO RESPUESTA AL ESTRÉS EN EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS

En cuanto a los mecanismos autofágicos en embriogénesis de microsporas con estrés térmico a 32°C de *Brassica napus*, algunos estudios han observado la formación de autofagosomas, vacuolas autofágicas y plástidos (denominados en este caso “plastolisomas”) involucrados en la eliminación de componentes citoplasmáticos dañados (Corral-Martínez *et al.*, 2013; Parra-Vega *et al.*, 2015). Se ha contemplado que, en el caso de los autofagosomas y las vacuolas, el cuerpo autofágico es digerido sin necesidad de fusión con la vacuola central y excretado fuera de la célula. Este mecanismo de defensa podría deberse a la prevención por la misma microspora de un crecimiento excesivo de la vacuola que acarrearía cambios estructurales y de crecimiento irreversibles que podría inducir una estructura no embriogénica y posterior muerte celular (Corral-Martínez *et al.*, 2013). Este proceso de autofagia es característico de las microsporas inducidas a reprogramar su ruta desarrollo mediante un estrés térmico y sería un mecanismo de limpieza masivo e indispensable para adaptarse a la nueva situación (Corral-Martínez *et al.*, 2013; Parra-Vega *et al.*, 2015).

Por otra parte, en *Hordeum vulgare* (cebada), Bárány *et al.* (2018) concluyeron que el estrés térmico de 4°C aplicado para que las microsporas fueran inducidas a formar embriones produjo autofagia en las células puesto que se detectó una sobre-expresión de genes autofágicos (*HvATG5* y *HvATG6*) así como un incremento en la cantidad de estructuras similares a los autofagosomas que contenían proteínas ATG5 y ATG8. No obstante, cantidades excesivas de este mecanismo en las células conlleva a una destrucción de éstas, por tanto, decidieron establecer la relación entre autofagia y muerte celular en la embriogénesis de microsporas probando ciertos inhibidores de autofagia como la 3-metiladenina que altera la síntesis de autofagosomas, el compuesto E-64 o la concanamicina A que, bloqueando a las cisteín-proteasas y las bombas de protones vacuolares respectivamente, inhiben la degradación del cuerpo autofágico. Los cultivos con tratamiento mejoraron sus niveles de embriogénesis y disminuyeron los de muerte celular lo que permitió concluir que la autofagia es un factor determinante en la muerte celular en la embriogénesis de microsporas. Estos efectos también fueron verificados en *Brassica napus* (Pérez-Pérez *et al.*, 2018).

En sendos estudios y en otro posterior en colza (Berenguer *et al.*, 2019) se utilizó un inhibidor de proteasas de tipo caspasa 3 denominado Ac-DEVD-CHO (N-acetil-L- $\alpha$ -aspartil-L- $\alpha$ -glutamil-N-(2-carboxil-1-formiletil)-L-valinamida) y se verificó que presentaba resultados satisfactorios, al igual que el resto de inhibidores, permitiendo relacionar la actividad de la proteasa de tipo caspasa 3 con la autofagia y PCD. Es por ello que lo emplearemos también en los cultivos del presente trabajo para poder verificar la relación entre autofagia y PCD en *Brassica napus* y en una especie en la que nunca se ha probado antes, *Solanum melongena*.

Como ya hemos comentado previamente, la autofagia puede ser uno de los factores claves para el desarrollo de la muerte celular, sin embargo, no es el único mecanismo desencadenante de ésta como veremos a continuación.

## 1.7. MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN PLANTAS

La PCD se define como un programa de suicidio celular regulado genéticamente y empleado tanto en organismos unicelulares como multicelulares con el objetivo de eliminar células dañadas o redundantes y promover así una adaptación evolutiva de la especie (Kabbage *et al.*, 2017; Locato y De Gara, 2018).

En las células animales, actualmente, se reconocen tres formas posibles de PCD: apoptosis (encogimiento, ruptura y fagocitosis de la célula), muerte celular por autofagia (explicada previamente) y necrosis (muerte más descontrolada caracterizada por la inflamación de la célula) (Locato y De Gara, 2018). No obstante, en los organismos vegetales, a día de hoy, aún no se ha llegado a un acuerdo en la clasificación universal de los diversos mecanismos celulares involucrados en la PCD debido a las diferencias que presentan con los animales, como la ausencia de caspasas (proteínas principales de la apoptosis en animales), o la confusión de los investigadores al emplear el mismo término para definir procesos de muerte muy divergentes (Reape *et al.*, 2008). Algunos autores afirman que se deben clasificar en esos tres tipos pero con una denominación más adecuada para la clase apoptótica como “PCD de tipo apoptótico” (AL-PCD en inglés) al no poseer exactamente las mismas características que la animal, pero sí mucha similitud (Reape *et al.*, 2008; Kabbage *et al.*, 2017). En cambio, otros investigadores proponen diferenciarlos en dos grupos: PCD autolítica y no-autolítica (van Doorn, 2011) o muerte regulada por el desarrollo y muerte inducida por el entorno (Locato y De Gara, 2018).

La PCD es crucial para el correcto desarrollo del organismo vegetal. Un nivel basal constante es necesario para mantener la homeostasis y, de este modo, desarrollar procesos tan fundamentales como la maduración del gametofito, el crecimiento de las raíces o la senescencia, entre otros. Asimismo, frente a un estrés exógeno (biótico o abiótico), posee una función de adaptación y defensa muy importante para asegurar la supervivencia de la célula mediante reciclaje de nutrientes y eliminación de elementos innecesarios (Kabbage *et al.*, 2017; Locato y De Gara, 2018).

### 1.7.1. MUERTE CELULAR PROGRAMADA COMO RESPUESTA AL ESTRÉS

Al sufrir un estrés del entorno, la PCD es un mecanismo de defensa y supervivencia innato en los organismos vegetales. Dependiendo de la intensidad de dicho estrés, la muerte celular resultante puede ser de tipo apoptótico o necrótico. Esta declaración fue verificada en células de zanahoria tras aplicar un estrés térmico de altas temperaturas (55°C durante 10 minutos), donde se produjo la AL-PCD en el 90% de las células, las cuales desarrollaron ciertos cambios morfológicos característicos como la reducción del protoplasto, condensación del citoplasma y el núcleo y escisión del ADN por las endonucleasas varias horas después (McCabe y Leaver, 2000). En cambio, el aumentar la intensidad del estrés térmico a 75°C hizo que las células murieran por necrosis sin presentar encogimiento alguno y una ruptura inmediata del ADN causada por las altas temperaturas (y no por las endonucleasas como en el caso anterior). Este cambio de respuesta celular ante la intensidad del estrés térmico aplicado también se ha observado en otras especies como *Arabidopsis*, tabaco o soja (Reape y McCabe, 2008; Reape *et al.*, 2008), lo que nos indica que es un proceso conservado en varias especies vegetales. Otros

estreses como el frío o la irradiación con rayos UV, también han sido analizados para provocar una respuesta de PCD en células vegetales (McCabe y Leaver, 2000).

Como ya hemos mencionado en el epígrafe dedicado a la autofagia, estos mecanismos celulares son necesarios para que la célula vegetal pueda defenderse ante un estrés exógeno, pero en el caso de la embriogénesis de microsporas constituyen una limitación muy grave ya que la eficiencia del cultivo depende de su viabilidad.

### 1.7.2. MUERTE CELULAR PROGRAMADA COMO RESPUESTA AL ESTRÉS EN EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS

Al emplear un estrés térmico de 4°C en el cultivo de microsporas aisladas de cebada se verificó un incremento de la mortalidad de las células acompañado de un aumento de la actividad de las proteasas de tipo caspasa 3 así como de la producción de especies ROS y NO. En condiciones normales, estas moléculas son producidas de manera constante y a bajos niveles para mantener la homeostasis, no obstante, un exceso de su producción puede alterar la viabilidad de las microsporas ya que actúan como moléculas señalizadores en el desarrollo de procesos relacionados con la PCD (Rodríguez-Serrano *et al.*, 2012).

En cuanto a *B. napus* se refiere, solamente las investigaciones mencionadas previamente que relacionaban el cultivo de microsporas con la autofagia y PCD han sido llevadas a cabo en este campo, mientras que en *Solanum melongena* no existe ningún estudio publicado al respecto. Es por ello que hay un gran interés en estudiar más a fondo el efecto de la modulación de los mecanismos involucrados en la PCD en el cultivo de microsporas de ambas especies. En el presente trabajo, aparte del compuesto Ac-DEVD-CHO, emplearemos dos inhibidores de la PCD como posible tratamiento: la Naringina (4',5',7'trihidroxi-flavonona 7-ramnoglucósido), un fitofármaco derivado del tomate, pomelo y otros cítricos que posee propiedades anti-oxidantes y anti-apoptóticas (Bharti *et al.*, 2014; Caglayan *et al.*, 2018) y el inhibidor de pan caspasas denominado Z-VAD-FMK (carbобензохи-валил-аланил-аспартил-[O-метил]-флуорометилкетона) que ha sido administrado previamente en células animales y vegetales con éxito (Montolio *et al.*, 2005; Qu *et al.*, 2009). Asimismo, estudiaremos un tratamiento pionero con Obatoclax ([2Z]-2-[(5Z)-5-[(3,5-dimetil-1H-pirrol-2-il)metilideno]-4-metoxipirrol-2-ilideno]indol), un mimético BH3 con propiedades anti-cancerígenas que sólo ha sido probado previamente en células animales con éxito y que ha demostrado aumentar la mortalidad de las células defectuosas induciendo su PCD mediante bloqueo del proceso autofágico (Yu *et al.*, 2016; Tabla 3).

**Tabla 3** – Moduladores de la autofagia y la PCD con sus respectivas dianas empleados en el presente trabajo

Compuesto	Diana
Ac-DEVD-CHO	Caspasa 3
Z-VAD-FMK	Pan caspasas
Naringina	ROS
Obatoclax	Familia proteica Bcl-2

## 2. OBJETIVOS

La finalidad del presente estudio es dilucidar los efectos de la modulación de la autofagia y PCD en el cultivo de microsporas de *Brassica napus* y *Solanum melongena*. Para ello, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Emplear como tratamiento tres compuestos inhibitorios de la autofagia y PCD y un cuarto que induce esta última mediante bloqueo de la autofagia en el cultivo de ambas especies y observar el nivel de respuesta embriogénica resultante.
- Determinar el compuesto, concentración y tiempo de aplicación más eficaces de entre los diversos analizados.
- Comparar las diferentes respuestas celulares de ambas especies ante las mismas condiciones de tratamiento.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO

Los genotipos de *Brassica napus* L. y *Solanum melongena* L. empleados en el presente estudio fueron dos líneas DH denominadas DH12075 (baja respuesta androgénica) y DH36 (alta respuesta androgénica) respectivamente.

Ambas plantas donantes fueron cultivadas en cámara a 20°C, con una intensidad lumínica de 200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  con fotoperiodos de 16 horas y una humedad relativa del 60 al 65%. En el caso de la colza, una vez comenzada la floración, las plantas fueron transferidas a otra cámara con una temperatura de 15°C para favorecer la respuesta embriogénica, sin embargo, en el caso de la berenjena, esa transferencia se realizó al alcanzar las plantas una altura de 10 - 15 cm y a un invernadero con luz natural y temperatura de entre 20 y 25°C.

#### 3.2. CULTIVO DE MICROSPORAS

Basándonos en el protocolo de Corral-Martínez *et al.* (2020) para el cultivo de colza y en el de Corral-Martínez y Seguí-Simarro (2012) para el de berenjena, antes de recolectar el material vegetal, se encendió el flujo de la cabina de flujo laminar, ésta se limpió con etanol al 70%, se introdujeron los materiales que se conservan a temperatura ambiente dentro y se mantuvo encendida la luz UV durante 30 minutos aproximadamente para desinfectarla.

Mientras tanto, se extrajeron las inflorescencias con yemas de la planta que contendrían las microsporas y se mantuvieron en hielo hasta volver al laboratorio. En el caso de la colza, se seleccionaron las yemas que presentaban un tamaño de 2,40 a 3,00 mm gracias a la lupa estereoscópica y la escala milimetrada del micrómetro. Las yemas seleccionadas se clasificaron en dos grupos: el primero correspondiente a un tamaño de 2,40 a 2,70 mm y el segundo de 2,71 a 3,00 mm. Para el cultivo de berenjena, se extrajeron las anteras de éstas con un escalpelo y se seleccionaron las que poseían un tamaño de 5,20 a 5,90 mm con la ayuda de un pie de rey. El tamaño de la yema o antera está directamente relacionado con el estadio de las microsporas que contiene dentro, por tanto, es importante escoger las que tengan un tamaño adecuado puesto que serán las que contengan las microsporas en el estadio óptimo (microspora vacuolada) para inducir la androgénesis. Para la selección se procuró mantener en todo momento las yemas en hielo para prevenir su degradación. Finalmente, cada grupo de yemas o anteras se introdujo en un filtro de té y se transportó a la cabina de flujo laminar (Figura 8) donde se continuó el protocolo en condiciones de esterilidad.



Figura 8 – Fotografía de la cabina de flujo laminar con el material necesario antes de empezar el cultivo de microsporas

En primer lugar, se procedió a la esterilización y lavado de las yemas o anteras mediante inmersión de los filtros de té durante 30 segundos en etanol al 70% seguido de 10 minutos en hipoclorito sódico 4 g/L y tres lavados consecutivos de 5 minutos por lavado en agua destilada. Todas las soluciones se esterilizaron previamente con el autoclave y fueron conservadas a 4°C. Tras el último lavado, los filtros de té se dejaron secar en papel Whatman y el contenido de cada uno se introdujo, con la ayuda de pinzas estériles, en vasos de precipitado de 50 mL diferentes conteniendo 5 mL de solución de sacarosa al 13% (w/v) disuelta en agua destilada (pH 5.8) para el cultivo de colza y agua destilada (pH 5.8) para el de berenjena. Empleando un émbolo estéril de jeringuilla, se machacaron vigorosamente todas las yemas o anteras para extraer las microsporas y la suspensión resultante se filtró en tubos de plástico estériles de 15 mL mediante un filtro de nylon de 41 µm. Acto seguido, los tubos se centrifugaron a 800 rpm durante 5 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante y se añadieron 10 mL de la solución de sacarosa mencionada previamente (colza) o agua destilada (berenjena) para resuspender el sedimento de microsporas. El paso de centrifugación y resuspensión se repitió tres veces. Al acabar la última centrifugación, se resuspendió el sedimento en 1 mL de medio NLN13 (Tabla 4) en el caso de colza y agua destilada en el de berenjena y se calculó la concentración de microsporas tomando una alícuota de 30 µL empleando la cámara de Neubauer. Considerando como óptima la concentración final de 40.000 microsporas/mL en colza y de 200.000 microsporas/mL en berenjena, se contó el número de microsporas en la cámara y, empleando la Fórmula 1, se calculó el volumen de medio ( $Vol_{final}$ ) necesario para cada tamaño.

$$Vol_{final}(mL) = \frac{N^{\circ} \text{ microsporas} \times \text{cuadrículas} (5) \times Vol_{inicial} (1 \text{ mL})}{Concentración_{final} (40.000 \text{ microsporas/mL}) \times Vol_{cámara} (0,0001 \text{ mL})} \quad \text{(Fórmula 1)}$$

**Tabla 4** – Composición del medio NLN13 a pH 5.8 empleado para el cultivo de microsporas de colza

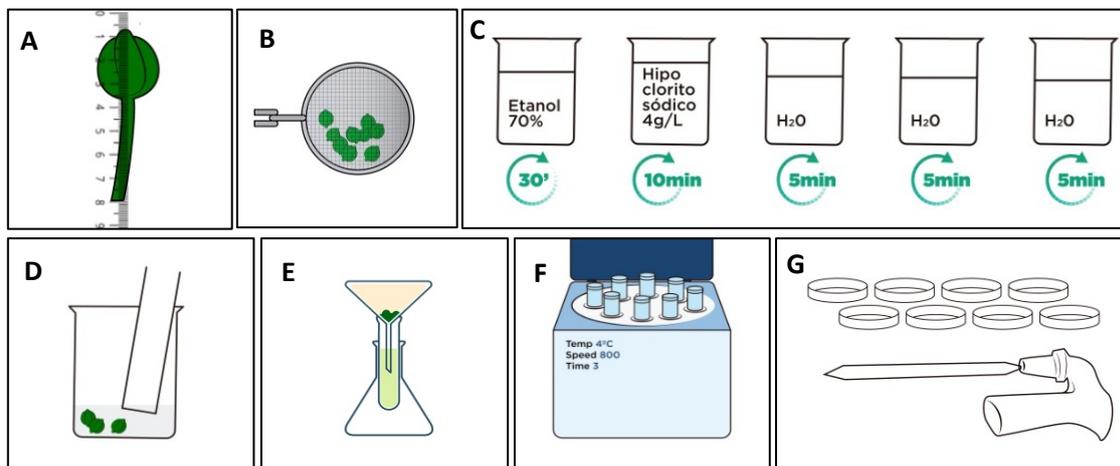
Componente	Cantidad (g/L)
Sacarosa	130
NLN Base Vitamin Mixture	1,04
Nitrato de Calcio Tetrahidratado	0,5
NLN Base Salt Mixture	0,39

Tras obtener el volumen de medio NLN13 o agua destilada necesario, se procedió a resuspender el mL de sedimento en éste y a dividir el volumen obtenido en tubos de plástico estériles de 15 mL llenándolos con 6 mL por cada condición de compuesto y tamaño ensayados. A cada tubo se le añadió el volumen de la concentración de compuesto necesaria para analizar todas las condiciones (Tabla 5). Todos los compuestos fueron comprados a través de la empresa MedChemExpress (MCE).

**Tabla 5** – Condiciones ensayadas para cada compuesto en el cultivo de microsporas

Compuesto	Condiciones (µM)						Tiempo de aplicación	
	Control	50	100	500	1000	5000		
OBATOCLAX	Control	50	100	500	1000	5000	CONTINUO	TRES DÍAS
NARINGINA	Control	1	10	20	100		CONTINUO	TRES DÍAS
AC-DEV-CHO	Control	0,1	1	10			CONTINUO	TRES DÍAS
Z-VAD-FMK	Control	0,1	1	10			CONTINUO	TRES DÍAS

En último lugar, se indujo la embriogénesis mediante estrés térmico. En el cultivo de colza se dividió el volumen total en placas de 1 mL y 3 cm de diámetro en las condiciones de continuidad y se mantuvo en tubos de plástico para las de tres días mientras que en berenjena se mantuvo el cultivo en tubos de plástico en todos los casos. Tanto placas como tubos fueron sellados con papel Parafilm e incubados durante tres días en oscuridad a 35°C (Figura 9).



**Figura 9** – Representación esquemática del protocolo del cultivo de microsporas de colza. (A) Yema observada a la lupa estereoscópica y medida con el micrómetro. (B) Filtro de té conteniendo las yemas. (C) Esterilización y lavado de las yemas. (D) Machacado de las yemas con un émbolo de jeringuilla estéril en solución de sacarosa al 13% (w/v) disuelta en agua destilada en vaso de precipitado. (E) Filtrado de las microsporas con filtro de nylon colocado en un embudo estéril empleando un erlenmeyer como soporte. (F) Centrifugación de los tubos a 800 rpm durante 5 minutos a 4°C. (G) División del cultivo en placas en la cabina de flujo laminar haciendo uso de la pipeta automática.

Pasadas las 72 horas, las placas fueron trasladadas a una cámara a 25°C en oscuridad y los tubos se centrifugaron a 800 rpm durante 5 minutos para retirar el sobrenadante y resuspender el sedimento con medio NLN13 en el caso de colza y NLN (Tabla 6), añadiendo compuesto para las condiciones de continuidad, en el de berenjena. Posteriormente, se dividió el cultivo en placas de 1 mL y 3 cm de diámetro que fueron selladas con papel Parafilm e incubadas en la cámara a 25°C en oscuridad.

**Tabla 6** – Composición del medio NLN a pH 5.9 empleado para el cultivo de microsporas de berenjena

Componente	Cantidad (g/L)
Sacarosa	20
NLN Base Vitamin Mixture	1,04
NLN Base Salt Mixture	0,39
Ácido Naftalenacético (NAA)	0,0005
Benziladenina (BAP)	0,0005

La incubación duró tres semanas para el cultivo de colza y un mes para el de berenjena puesto que es a partir de esos intervalos temporales cuando los embriones y callos son visibles para realizar un recuento empleando la lupa estereoscópica.

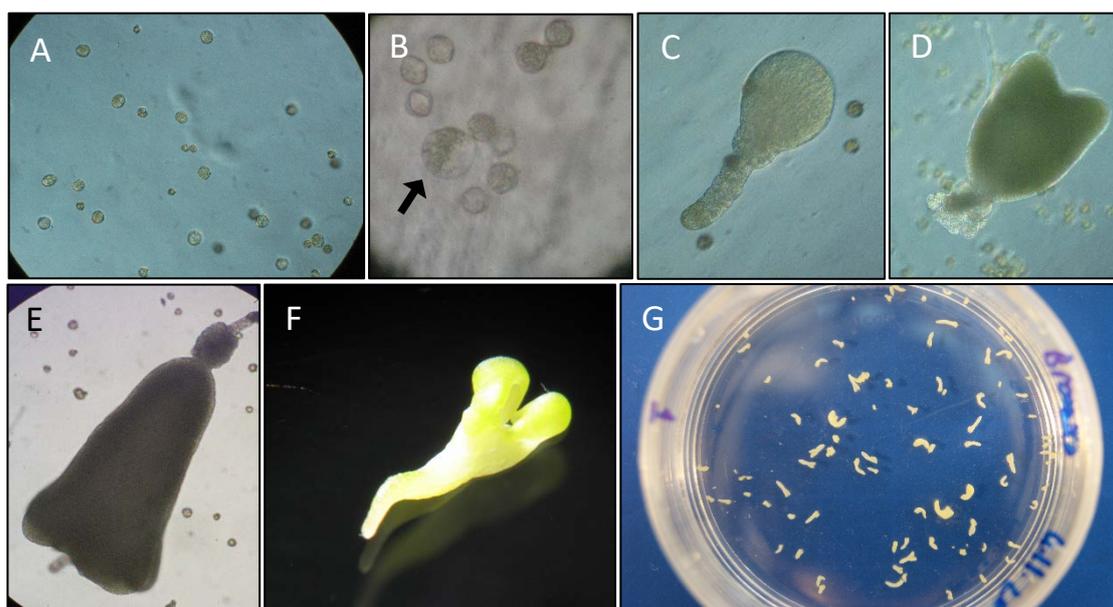
### **3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Empleando el programa informático *GraphPad Prism 8*, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) y el test de Tukey (P valor < 0,05) para detectar diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes condiciones y poder compararlas entre sí.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO DE MICROSPORAS

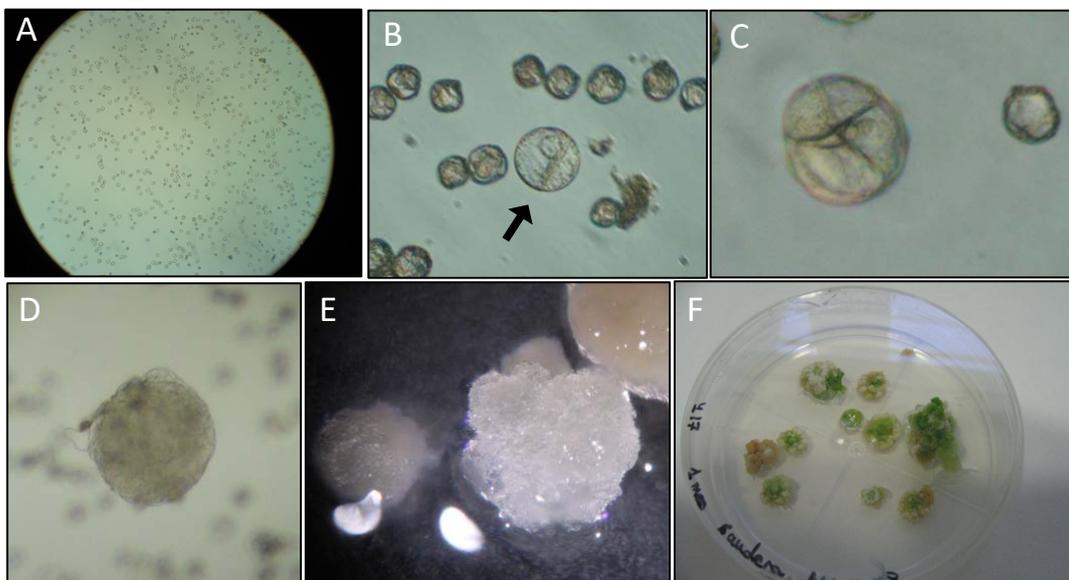
Tras aislar y cultivar las microsporas de *Brassica napus* en estadio vacuolar (Figura 10A), se indujo un estrés térmico a 35°C durante tres días para posteriormente, dejar crecer los cultivos en una cámara a 25°C. A los cinco días, se observaron divisiones simétricas en las microsporas reprogramadas para proseguir una ruta embriogénica (Figura 10B) y, unos días más tarde, se pudo discernir el desarrollo del embrión a estadio globular con desarrollo de suspensor (Figura 10C). Después, el embrión evolucionó al estadio cordiforme caracterizado por la morfología de corazón en el cual se distinguen los dos futuros cotiledones en la parte superior (Figura 10D). Finalmente, los embriones viables adquirieron la conformación de torpedo que se caracteriza por una elongación de los cotiledones e hipocótilo (Figura 10E) para formar, a las tres semanas de haber aislado las microsporas, un embrión cotiledonar (Figura 10F). El número total de embriones por placa se contabilizó gracias a la lupa estereoscópica (Figura 10G).



**Figura 10** – Evolución del cultivo de microsporas de *Brassica napus* L. (A) Microsporas aisladas bajo la lupa del microscopio. (B) Microspora esporofítica (indicada por la flecha) rodeada de microsporas con un desarrollo detenido o muertas. (C) Embrión en estado globular. (D) Embrión adquiriendo la forma de corazón o cordiforme. (E) Embrión-torpedo. (F) Embrión cotiledonar. (G) Placa de cultivo con embriones cotiledonares.

Como en el de *Brassica napus*, el primer paso del cultivo de *Solanum melongena* consistió en aislar las microsporas vacuoladas de las anteras (Figura 11A) y aplicar un estrés térmico a 35°C y de ayuno durante tres días. A los cinco días de permanecer en la cámara a 25°C ya se podían distinguir cambios morfológicos (tamaño más grande, división simétrica...) en las microsporas reprogramadas a proseguir una ruta esporofítica y no gametofítica, de detención o muerte celular (Figura 11B). A la semana de cultivo, se pudieron identificar microsporas divididas en cuatro células lo que indicaba el principio de la ruta embriogénica (Figura 11C) para, posteriormente, desarrollar un embrión globular con protoderma en formación (Figura 11D) que se transformaría en una estructura proliferativa no diferenciada, es decir, un callo (Figura 11E). Este cambio de naturaleza se debe seguramente a las condiciones de cultivo empleadas.

A día de hoy, no existe un protocolo de cultivo de microsporas que permita la formación de embriones de berenjena sin desarrollar la estructura de callo. Los callos viables se contabilizaron bajo la lupa estereoscópica y se traspasaron a un medio de cultivo sólido para que pudiesen proseguir con la organogénesis (Figura 11F).



**Figura 11** – Evolución del cultivo de microsporas de *Solanum melongena* L. (A) Microsporas aisladas bajo la lupa del microscopio. (B) Microspora esporofítica (indicada por la flecha) rodeada de microsporas con un desarrollo detenido o muertas. (C) Microspora tras división en cuatro células. (D) Embrión globular con protodermo desarrollándose. (E) Callos en medio líquido. (F) Callos organogénicos en medio sólido.

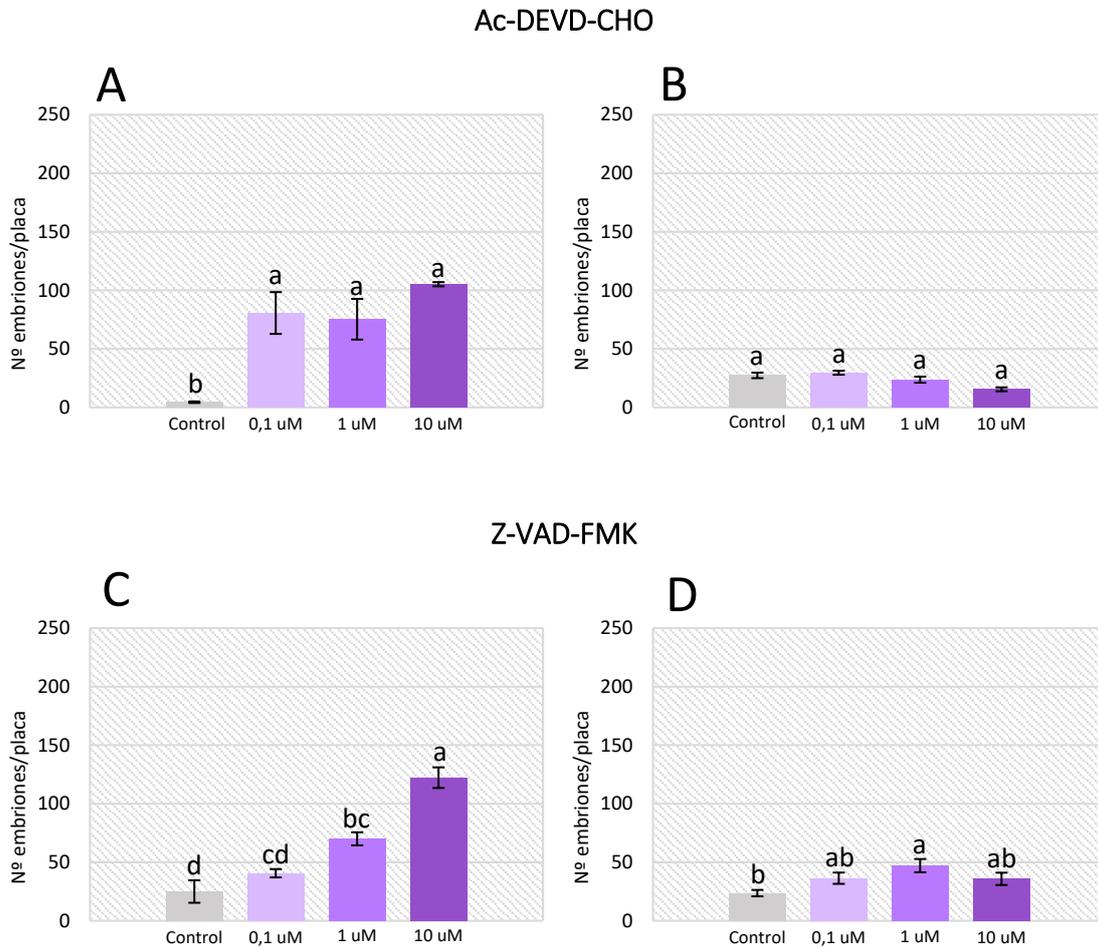
#### **4.2. EFECTO DE LA MODULACIÓN DE LA AUTOFAGIA Y LA PCD EN EL CULTIVO DE MICROSPORAS DE COLZA**

Con el fin de estudiar el efecto de la inhibición de la autofagia y la PCD en el cultivo de microsporas de *Brassica napus* se contabilizó el número de microsporas por placa de cultivo en condiciones de ausencia (Control) y presencia de tratamiento con los compuestos inhibidores a diversas concentraciones y tiempos de aplicación (continuo o 72 horas) para comprobar si éste confería un efecto de mejora en la embriogénesis del cultivo. En ese caso, se determinó qué condición fue la más eficiente para cada tamaño de yema analizado (tamaño 1 haciendo referencia a 2,40 a 2,70 mm y tamaño 2 a 2,71 a 3,00 mm). Posteriormente, se calcularon los valores medios del número de embriones por placa para cada condición y se analizaron estadísticamente mediante el test ANOVA y el de Tukey para determinar diferencias significativas entre ellas.

Cabe mencionar que ninguno de los cultivos con un tratamiento aplicado durante 72 horas presentó datos de mejora del rendimiento por lo que no han sido representados en los resultados finales. Por otro lado, no se pudo realizar el número de réplicas deseado para cada tratamiento debido a la situación excepcional del estado de alarma por la pandemia de la COVID-19. Aun así, consideramos que estos resultados preliminares pueden ser la base para futuros estudios más exhaustivos, con los cuales se podría llegar a determinar con exactitud las concentraciones óptimas de compuestos que mejoren el rendimiento del cultivo de microsporas de ambas especies.

#### 4.2.1. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE PROTEASAS DE TIPO CASPASA EN EL CULTIVO DE MICROSPORAS DE COLZA

El tratamiento fue llevado a cabo añadiendo al medio de cultivo los compuesto inhibidores de proteasas de tipo caspasa Ac-DEVD-CHO (Figura 12A y 12B) y Z-VAD-FMK (Figura 12C y 12D) con concentraciones de 0,1; 1 y 10  $\mu$ M. En el caso del primer compuesto se realizaron dos cultivos por cada tamaño de yema mientras que en el del segundo se llevaron a cabo tres cultivos.



**Figura 12** – Efecto del tratamiento continuo con Ac-DEVD-CHO (**A, B**) y Z-VAD-FMK (**C, D**) en cultivos de microsporas de colza mediante análisis cuantitativo del número de embriones por placa. (**A, C**) Número de embriones por placa sin tratamiento (Control) y con tratamiento a diferentes concentraciones (0,1; 1 y 10  $\mu$ M) para el tamaño de yema 1 (2,40 a 2,70 mm). (**B, D**) Número de embriones por placa sin tratamiento (Control) y con tratamiento a diferentes concentraciones (0,1; 1 y 10  $\mu$ M) para el tamaño de yema 2 (2,71 a 3,00 mm). Las barras de error se calcularon con el error estándar para cada condición. Las diferentes letras sobre cada columna indican una diferencia significativa entre las condiciones en base al test ANOVA y el de Tukey con un P valor < 0,05.

En primer lugar, los cultivos control del tamaño 1 (Figura 12A y 12C) presentan un número de embriones estadísticamente significativo más bajo que el resto de condiciones analizadas para ambos compuestos, siendo el del inhibidor de proteasas de tipo caspasa 3, Ac-DEVD-CHO, especialmente reducido (Figura 12A). No obstante, en el tamaño 2 (Figura 12B y 12D), no sucedió lo mismo puesto que no hay diferencias prácticamente entre el número de embriones

del cultivo control y el resto de condiciones, salvo en la segunda correspondiente al compuesto Z-VAD-FMK (1  $\mu$ M) donde se puede percibir un mayor número de embriones por placa (Figura 12D). Como consecuencia, podemos concluir que ambos tratamientos mejoran la respuesta del cultivo de microsporas al incrementar, en la mayoría de los casos, el número de embriones por placa de cultivo, siendo mucho más notable dicho efecto en el tamaño más pequeño de yema estudiado (2,40 a 2,70 mm).

Por otra parte, cabe resaltar que en el cultivo de yemas de tamaño menor (Figura 12A y 12C), de las tres concentraciones empleadas para cada inhibidor (0,1; 1 y 10  $\mu$ M), la que mejores resultados proporciona es la más concentrada en ambos compuestos, es decir, 10  $\mu$ M. Podemos deducir que es la concentración más eficaz para reducir la autofagia y PCD de las microsporas e incrementar la inducción de embriogénesis del cultivo en este estudio. Sin embargo, no se ha experimentado con concentraciones mayores a los 10  $\mu$ M, sería, por tanto, adecuado realizar más cultivos con tratamientos más concentrados para confirmar que 10  $\mu$ M es la concentración óptima o, por lo contrario, determinar si existe una mejor.

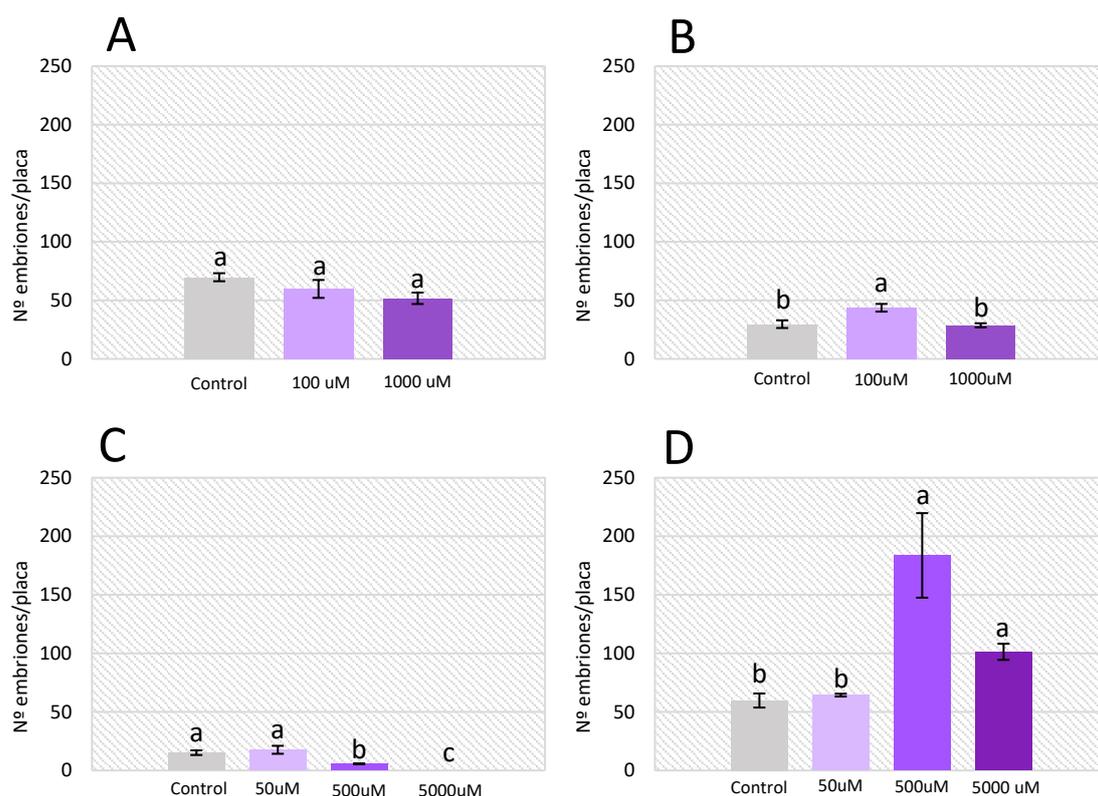
En los cultivos del tamaño de yema mayor (2,71 a 3,00 mm; Figura 12B y 12D), solamente el tratamiento con Z-VAD-FMK a 1  $\mu$ M mejora la eficiencia del cultivo dado que el resto de condiciones de tratamiento ensayadas no aumenta la eficacia de la embriogénesis derivada de microsporas al presentar resultados muy similares con el cultivo control. De hecho, en el tratamiento con Ac-DEVD-CHO, el cultivo sin tratamiento proporciona un número de embriones más elevado que el contabilizado para la condición de tratamiento mayor (10  $\mu$ M). Este hecho nos indica que una cantidad de inhibidor tan elevada en el medio de cultivo del tamaño de yema mayor podría producir el efecto inverso al deseado, es decir, fomentar la mortalidad de las microsporas por un exceso de inhibición autofágica y PCD.

#### 4.2.2. EFECTO DEL OBATOCCLAX EN EL CULTIVO DE MICROSPORAS DE COLZA

En este caso, las concentraciones examinadas para el tratamiento con el mimético BH3 Obatoclax fueron 50, 100, 500, 1000 y 5000  $\mu$ M (Figura 13). Se realizaron dos cultivos, pero con una sola réplica por cada condición examinada en cada tamaño de yema.

En el primer tamaño (Figura 13A y 13C), no se percibe un efecto positivo tras tratamiento con ninguna concentración, de hecho, se observa una respuesta con una tendencia más bien negativa puesto que el número de embriones por placa es menor en casi todos los cultivos tratados en comparación al control. En cambio, en el tamaño mayor (Figura 13B y 13D), constatamos un aumento del rendimiento del cultivo, especialmente en las concentraciones de 500 y 5000  $\mu$ M. Podemos deducir que el tratamiento con Obatoclax funciona mejor en el tamaño de yema mayor lo que nos hace suponer que el compuesto inhibe la autofagia con una mayor eficacia en las microsporas vacuoladas con estadios del desarrollo gametofítico más tardíos ensayados. También conviene mencionar que en el segundo cultivo del tamaño más pequeño analizado (Figura 13C), muchas de las placas estaban contaminadas por lo que no podemos confirmar que los resultados obtenidos sean representativos del efecto real del compuesto a esas concentraciones.

## OBATOCCLAX



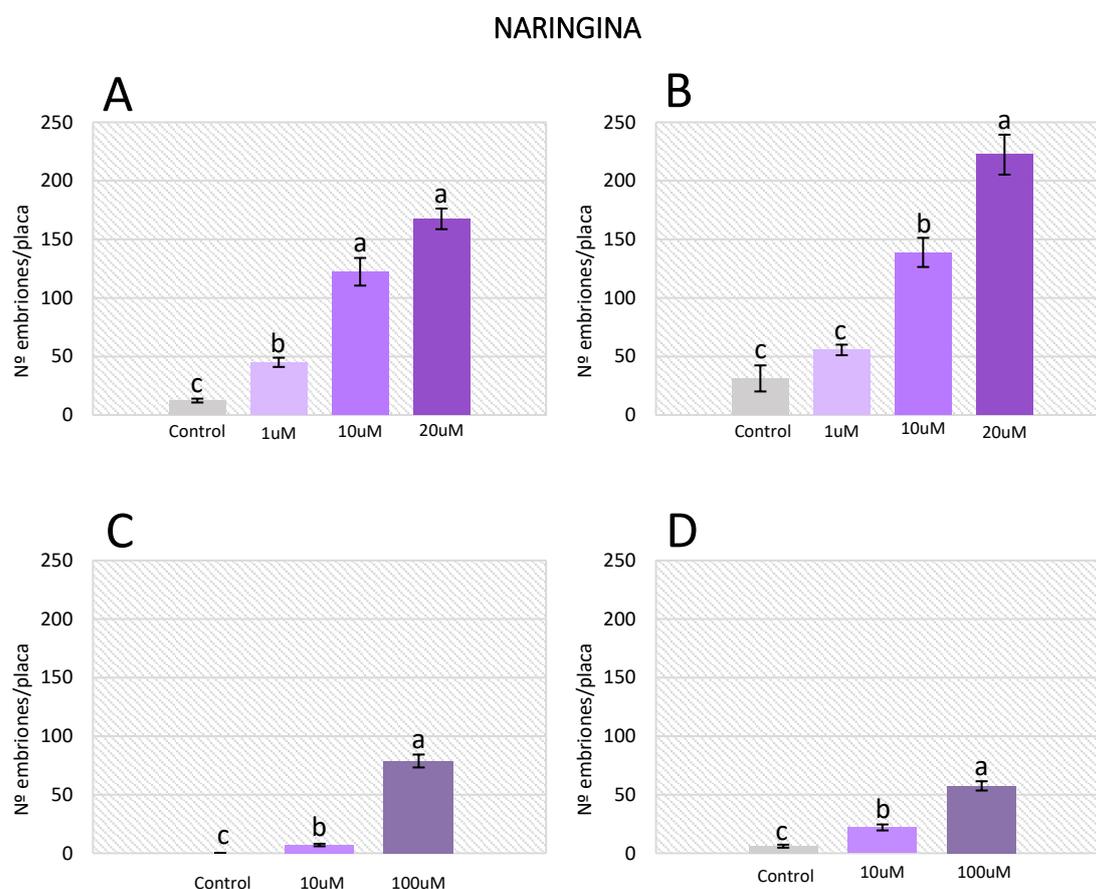
**Figura 13** – Efecto del tratamiento continuo con Obatocclax en cultivos de microsporas de colza mediante análisis cuantitativo del número de embriones por placa. (A, C) Número de embriones por placa sin tratamiento (Control) y con tratamiento a diferentes concentraciones (50, 100, 500, 1000 y 5000 µM) para el tamaño de yema 1 (2,40 a 2,70 mm). (B, D) Número de embriones por placa sin tratamiento (Control) y con tratamiento a diferentes concentraciones (50, 100, 500, 1000 y 5000 µM) para el tamaño de yema 2 (2,71 a 3,00 mm). Las barras de error se calcularon con el error estándar para cada condición. Las diferentes letras sobre cada columna indican una diferencia significativa entre las condiciones en base al test ANOVA y el de Tukey con un P valor < 0,05.

En los cultivos de yemas de tamaño mayor (Figura 13B y 13D), percibimos una mejoría estadísticamente significativa en los cultivos tratados con Obatocclax a 500 y 5000 µM aunque la más notoria es la primera dado que, de media, el número de embriones se ha multiplicado por tres conforme al control (Figura 13D). En la concentración mayor (5000 µM), se discierne un número de embriones por placa más bajo que en la de 500 µM, lo que nos hace suponer que ese tratamiento es demasiado concentrado y puede convertirse en tóxico y producir el efecto adverso a dichos niveles (Figura 13D). Como consecuencia de lo expuesto, podemos concluir que el tratamiento a 500 µM sería el más eficaz de los probados en el tamaño de yema más grande analizado en colza ya que el resto de concentraciones ensayadas resultan en un rendimiento del cultivo más reducido.

### 4.2.3. EFECTO DE LA NARINGINA EN EL CULTIVO DE MICROSPORAS DE COLZA

En este caso, el tratamiento con el compuesto se realizó en tres cultivos empleando las mismas concentraciones en los dos primeros (1, 10 y 20 µM; Figura 14A y 14B) y una mayor en el tercero (100 µM; Figura 14C y 14D).

En primer lugar, observamos que el número de embriones obtenidos en los cultivos tratados con Naringina aumenta de manera estadísticamente significativa y de forma similar en ambos tamaños de yema estudiados.



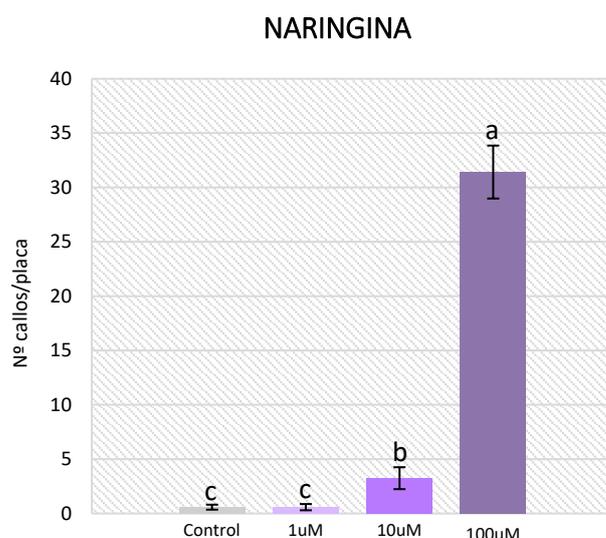
**Figura 14** – Efecto del tratamiento continuo con Naringina en cultivos de microsporas de colza mediante análisis cuantitativo del número de embriones por placa. **(A, C)** Número de embriones por placa sin tratamiento (Control) y con tratamiento a diferentes concentraciones (1, 10, 20 y 100  $\mu$ M) para el tamaño de yema 1 (2,40 a 2,70 mm). **(B, D)** Número de embriones por placa sin tratamiento (Control) y con tratamiento a diferentes concentraciones (1, 10, 20 y 100  $\mu$ M) para el tamaño de yema 2 (2,71 a 3,00 mm). Las barras de error se calcularon con el error estándar para cada condición. Las diferentes letras sobre cada columna indican una diferencia significativa entre las condiciones en base al test ANOVA y el de Tukey con un P valor < 0,05.

Por otra parte, en los primeros dos cultivos (Figura 14A y 14B), el número de embriones aumenta al aplicar una concentración mayor de tratamiento, hasta alcanzar el máximo en ambos tamaños en la condición de 20  $\mu$ M. Si comparamos con el control, en el primer tamaño (Figura 14A) se llega a multiplicar por 13,6 el número de embriones y en el segundo (Figura 14B) por 7,1. Lo mismo sucede en el tercer cultivo (Figura 14C y 14D), donde la concentración superior (100  $\mu$ M) produce los mejores resultados en ambos tamaños multiplicando por 9,6 el número de embriones por placa en el segundo tamaño de yema (Figura 14D). Sin embargo, en el tamaño de yema menor (Figura 14C), las placas del cultivo sin tratamiento no presentaron embrión alguno, lo cual impide determinar si la concentración de 100  $\mu$ M es más eficaz que la de 20  $\mu$ M en este caso ya que no podemos comparar ambos controles. Como última observación, destacamos una diferencia notable ente la media de embriones por placa obtenidos en los controles de los dos primeros cultivos (Figura 14A y 14B) y el tercero (Figura 14C y 14D).

Podemos concluir entonces que el tratamiento con Naringina favorece notablemente la respuesta embriogénica del cultivo y que la concentración de 100  $\mu\text{M}$  sería la más eficiente, al menos para el tamaño de yema más pequeño ya que no podemos determinar con exactitud la concentración óptima a la que se debe aplicar el compuesto en el segundo tamaño puesto que en las placas de control se verificó muy poca respuesta. La diferencia de respuesta entre ambos controles puede deberse a la época estacional en la que se realizaron los cultivos ya que éstos presentan una mayor respuesta en primavera, estación del año en la cual se realizaron los dos primeros.

#### 4.3. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA AUTOFAGIA Y LA PCD EN EL CULTIVO DE MICROSPORAS DE BERENJENA

Para estudiar el efecto de la inhibición de la autofagia y la PCD en el cultivo de microsporas de *Solanum melongena* se contabilizó el número de callos por placa de cultivo en condiciones de ausencia (Control) y presencia de tratamiento con el inhibidor Naringina a diferentes concentraciones (1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ) para comprobar si éste confería un efecto de mejora en la respuesta embriogénica del cultivo y, en ese caso, determinar cuál de ellas es la idónea para el tamaño de antera seleccionado (5,20 a 5,90 mm; Figura 15). En total se realizaron tres cultivos y se analizaron los resultados estadísticamente como explicado anteriormente para el cultivo de microsporas de colza.



**Figura 15** – Efecto del tratamiento continuo con Naringina a diferentes concentraciones (1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ) en cultivos de microsporas de berenjena obtenidas a partir de anteras de 5,20 a 5,90 mm mediante análisis cuantitativo del número de callos por placa. El Control hace referencia al cultivo sin tratamiento. Las barras de error se calcularon con el error estándar para cada condición. Las diferentes letras sobre cada columna indican una diferencia significativa entre las condiciones en base al test ANOVA y el de Tukey con un P valor < 0,05.

Como mencionamos en el caso del cultivo de *Brassica napus*, ningún tratamiento aplicado durante 72 horas presentó datos de mejora del rendimiento de éste por lo que no han sido representados en los resultados finales. De igual forma, a causa del estado de alarma, no se pudieron realizar todas las réplicas y tratamientos planteados en un inicio por lo que los resultados presentados deben ser considerados orientativos.

Primeramente, observamos una mejoría exponencial en la cantidad de callos obtenidos por placa en el cultivo al aplicar un tratamiento de 100  $\mu\text{M}$  de la flavonona dado que éste se multiplica por 54,2 al comparar con el cultivo sin tratamiento (Control). De igual manera, la condición de 10  $\mu\text{M}$  del compuesto también presenta un rendimiento estadísticamente significativo mayor que el cultivo control pero no tan remarcable. Y en tercer lugar, el tratamiento menos concentrado (1  $\mu\text{M}$ ) no exhibe una diferencia estadísticamente significativa con el rendimiento del cultivo sin tratar.

A raíz de todas estas afirmaciones, podemos deducir que el tratamiento con el inhibidor de la PCD Naringina aumenta significativamente el número de callos embriogénicos obtenidos en el cultivo de microsporas de *Solanum melongena* y que la cantidad de compuesto idónea en este estudio es la más concentrada, es decir, 100  $\mu\text{M}$ , ya que es la que mejores resultados presenta en cuanto al número de callos por placa. No obstante, se deberían realizar más cultivos tratados con concentraciones mayores del fitofármaco para poder determinar si cantidades superiores de éste son más beneficiosas para el cultivo.

Como consecuencia de este análisis, podemos concluir que el compuesto que mejora en mayor medida la respuesta embriogénica de los cultivos de ambas especies es la Naringina (Figuras 14 y 15). La flavonona es empleada en células animales por sus propiedades anti-cancerígenas, anti-inflamatorias y anti-oxidantes, entre otras (Bharti *et al.*, 2014). En nuestro contexto, al ser un capturador de ROS y, por tanto, un agente anti-oxidante, posee propiedades anti-apoptóticas como se ha podido comprobar en el tejido renal y hepático dañado de ratas (Caglayan *et al.*, 2018) y también con otros compuestos con funciones similares en la embriogénesis de microsporas como el cloruro de manganeso (II) en colza (Bárány *et al.*, 2018; Pérez-Pérez *et al.*, 2018) o el ascorbato en cebada (Rodríguez-Serrano *et al.*, 2012). Por todo ello, se ha considerado que la Naringina sería un tratamiento novel y acertado para aumentar la eficiencia del cultivo de microsporas en *Brassica napus* y *Solanum melongena*, hecho que se ha verificado con este estudio dado que el número de embriones de colza y el de callos en berenjena ha aumentado exponencialmente (sobre todo en el segundo caso) en la concentración de 100  $\mu\text{M}$ . La diferencia de respuesta de una especie a otra nos indica que *Solanum melongena* podría producir más ROS como respuesta al estrés aplicado en el cultivo de microsporas, por lo que respondería mejor a un tratamiento basado en un secuestrador de dichas moléculas como la Naringina. Esta hipótesis abre una nueva línea de investigación en relación a la producción particular de ROS por cada especie como respuesta celular al estrés empleado en el cultivo de embriogénesis de microsporas.

En segundo lugar, los compuestos que presentan mejores resultados, particularmente en el tamaño más pequeño de yema estudiado en colza, son los inhibidores de proteasas de tipo caspasa 3 Ac-DEVD-CHO y pan caspasa Z-VAD-FMK (Figura 12). Esta diferencia de respuesta ante el tratamiento de un tamaño de yema a otro puede deberse al grado de desarrollo de las microsporas seleccionadas puesto que las yemas de menor tamaño poseen microsporas menos maduras y, por tanto, menos comprometidas con el desarrollo gametofítico. El inhibidor Ac-DEVD-CHO ya había sido ensayado en la embriogénesis de microsporas de esta misma especie (Pérez-Pérez *et al.*, 2018; Berenguer *et al.*, 2019) así como en trigo (Sinha *et al.*, 2016) y cebada (Rodríguez-Serrano *et al.*, 2012) donde se pudo comprobar los efectos beneficiosos que presentaba al reducir en gran medida la muerte celular de las microsporas y la actividad de las

proteasas de tipo caspasa 3, proteínas involucradas en la autofagia y PCD. En dichos estudios obtuvieron resultados más satisfactorios al emplear tratamientos más concentrados puesto que llegaron hasta los 20  $\mu\text{M}$  mientras que en el nuestro el máximo fue de 10  $\mu\text{M}$ . Como perspectiva de futuro, se podría considerar probar tratamientos del inhibidor mayores y ver si ese cambio de parámetro hace aumentar el número de embriones por placa de cultivo. Asimismo, el emplear como tratamiento un inhibidor de proteasas de tipo pan caspasa como Z-VAD-FMK ha reducido los niveles de mortalidad de los cultivos de colza de manera considerable como se pudo comprobar también en estudios anteriores en los que emplearon compuestos con dianas parecidas como el E-64 (inhibidor de cisteín proteasas) o la leupeptina (inhibidor de cisteín y serín proteasas; Pérez-Pérez *et al.*, 2018; Berenguer *et al.*, 2019). Asimismo, los efectos sobre los niveles de PCD de este mismo compuesto han sido ensayados y comprobados en otras técnicas y especies como el tomate (Qu *et al.*, 2009) o el cultivo de células en suspensión de tabaco en el cual también se aplicó el inhibidor Ac-DEVD-CHO (Mlejnek y Prochazka, 2002). Ambos presentaron una reducción de la muerte celular, hecho que nos indica que los mecanismos de PCD se conservan de una especie a otra y que este tipo de inhibidores puede ser aplicado con el mismo fin en técnicas de cultivo diversas a la embriogénesis de microsporas. Por último, que dos inhibidores de proteasas de tipo caspasa reduzcan los mecanismos de autofagia y PCD en el cultivo de ambas especies nos confirma que este tipo de proteínas están involucradas en dichos procesos en las células vegetales. Su aplicación podría servir para futuros estudios de caracterización de los sustratos de éstas, ya que, a diferencia de las células animales donde los mecanismos de acción de las caspasas están muy bien definidos, en las vegetales, se siguen manteniendo muchas incógnitas acerca de las interacciones moleculares de las proteasas de tipo caspasa involucradas en procesos de PCD (Kabbage *et al.*, 2017).

En tercer lugar, el compuesto que ha reducido en menor medida los niveles de mortalidad del cultivo de microsporas de colza ha sido el mimético BH3 denominado Obatoclax (Figura 13). El compuesto tiene como proteína diana las proteínas de la familia anti-apoptótica Bcl-2 que favorece la tumorigénesis en células animales (Joudeh y Claxton, 2012). Al unirse en el dominio BH3 de este tipo de proteínas, bloquea su actividad e induce la apoptosis de la célula dañada. Recientemente se ha descubierto que, al tratar células cancerosas del esófago con el compuesto, éste propicia la apoptosis de las células mediante bloqueo del flujo autofágico (Yu *et al.*, 2016). Este es el aspecto que hemos querido estudiar en nuestros cultivos ya que, al igual que la Naringina, el compuesto no había sido administrado antes en células vegetales. Asimismo, por las propiedades terapéuticas que posee al aplicarse en células animales, por la homología de proteínas de la familia Bcl-2 animal que encontramos en las células vegetales (Dion *et al.*, 1997) y al ser un modulador de la autofagia y PCD, y no un inhibidor de dichos procesos como el resto de compuestos, hemos considerado que podría aportar una información interesante para nuestro estudio. Tal y como hemos visto en los resultados, el mimético BH3 sólo aporta un efecto beneficioso para el cultivo de microsporas de *Brassica napus* en el tamaño mayor de yema estudiado a una concentración de 500  $\mu\text{M}$ . El que no afecte al cultivo de microsporas menos maduras puede deberse a que su diana, la familia proteica Bcl-2, no esté tan desarrollada y, por tanto, no pueda inhibirla y favorecer la PCD de las células no viables en el cultivo. Esta posibilidad plantea nuevas perspectivas de investigación sobre esta familia proteica en las células vegetales y sus posibles vías y mecanismos de desarrollo y regulación.

Ninguna condición de tratamiento mantenida solamente durante 72 horas reflejó efectos positivos en la respuesta embriogénica de los cultivos de las dos especies investigadas. A causa de esta observación, podemos deducir que, para que el tratamiento farmacológico surta efecto, las microsporas deben exponerse a éste durante todo su ciclo de crecimiento y desarrollo puesto que los cambios en la microspora como respuesta al estrés no acontecen solamente durante el periodo de estrés, es decir, los tres primeros días, sino que se mantienen a lo largo del desarrollo de éstas. Además, al darse el caso en ambas especies, podemos concluir que es una característica común que no depende de la fisiología particular de cada tipo de microspora.

Como demuestra el estudio, emplear tratamientos prolongados que inhiben o modulan la autofagia y la PCD en la embriogénesis de microsporas mejora considerablemente el desarrollo embrionario del cultivo. De los que hemos analizado, el compuesto que presenta unos resultados superiores es la Naringina a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  en ambas especies seguida del Ac-DEVD-CHO, Z-VAD-FMK y, a continuación, el Obatoclax en *Brassica napus*. El hecho de que la berenjena responda de manera extraordinaria frente al tratamiento con la flavonona nos indica que este tipo de inhibidores podrían ser la solución para mejorar el rendimiento del cultivo de microsporas de otras especies recalcitrantes que son las que mayores problemas de desarrollo poseen. Asimismo, en los cultivos de colza, los niveles de muerte celular se han visto reducidos también, por ende, estos compuestos no son específicos de un solo tipo de especie, sino que podrían usarse de manera universal en la técnica de cultivo con especies muy diversas. Estos resultados pueden servir de preámbulo para futuros estudios en la embriogénesis de microsporas de las especies examinadas y otras diferentes. De esta manera, se conseguirían analizar más condiciones de cada tratamiento y, por consiguiente, dilucidar las idóneas para cada caso con el fin de incluirlas en los protocolos de la técnica de cultivo.

## 5. CONCLUSIONES

A raíz de los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir que:

- Emplear tratamientos continuados con compuestos que inhiban o modulen la autofagia y muerte celular programada en la embriogénesis de microsporas de *Brassica napus* y *Solanum melongena* mejora considerablemente los niveles de respuesta embriogénica y eficiencia de la técnica de cultivo. Por ello, se puede considerar incluirlos como elemento de mejora en los protocolos de dicho método.
- El tratamiento con Naringina 100  $\mu\text{M}$  ha sido el que mejores resultados ha aportado tanto en colza como berenjena, especie en la que sus efectos han sido más notorios. La flavonona podría ser considerada como un compuesto muy interesante que añadir a los protocolos de cultivo de microsporas de especies recalcitrantes.
- El inhibidor de proteasas de tipo caspasa 3 Ac-DEVD-CHO y el de proteasas de tipo pan caspasas Z-VAD-FMK han presentado una notable mejora en la respuesta embriogénica del cultivo de colza, sobre todo en las microsporas con un estadio de desarrollo menos maduro, a concentraciones de 10  $\mu\text{M}$ .
- El mimético BH3 Obatoclax sólo ha reducido los niveles de mortalidad del cultivo de microsporas de colza en el tamaño de yema más grande a una concentración de 500  $\mu\text{M}$ . Esto nos indica que el mecanismo de acción de este compuesto, basado en promover la PCD de las células defectuosas, puede no ser tan efectivo en esta especie como el que ejercieron el resto de tratamientos inhibitorios estudiados.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

**AHMADI, B.; AHMADI, M. y TEIXEIRA DA SILVA, J.A.** (2018). Microspore embryogenesis in *Brassica*: calcium signaling, epigenetic modification, and programmed cell death. *Planta*, 248: 1339-1350.

**AUBERT, S.; GOUT, E.; BLIGNY, R.; MARTY-MAZARS, D.; BARRIEU, F., ALABOUVETTE, J., MARTY, F. y DOUCE, R.** (1996). Ultrastructural and biochemical characterization of autophagy in higher plant cells subjected to carbon deprivation: control by the supply of mitochondria with respiratory substrates. *The Journal of Cell Biology*, 133: 1251-1263.

**BANUELOS, G.; DHILLON, K. y BANGA, S.** (2013). Oilseed Brassicas, en: *Biofuel Crops: Production, Physiology and Genetics*. Ed. CABI Publishing. Oxfordshire: 339-368.

**BÁRÁNY, I.; BERENQUER, 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: 1387-1402.

**BARNABÁS, B.; OBERT, B. y KOVACS, G.** (1999). Colchicine, an efficient genome-doubling agent for maize (*Zea mays* L.) microspores cultured in anthero. *Plant Cell Reports*, 18: 858-862.

**BASSHAM, D.C.** (2007). Plant autophagy—more than a starvation response. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 587-593.

**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: 2-11.

**BERENQUER, E.; SOLIS, M.T.; PEREZ-PEREZ, 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.

**BHARTI, S.; RANI, N.; KRISHNAMURTHY, B. y ARYA, D.S.** (2014). Preclinical evidence for the pharmacological actions of naringin: a review. *Planta Medica*, 80: 437-451.

**BLAKESLEE, A.F.; BELLING, J.; FARNHAM, M.E. y BERGNER, A.D.** (1922). A haploid mutant in the Jimson weed *Datura stramonium*. *Science*, 55: 646-647.

**CAGLAYAN, C.; TEMEL, Y.; KANDEMIR, F.M.; YILDIRIM, S. y KUCUKLER, S.** (2018). Naringin protects against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity through modulation of oxidative stress, inflammation, apoptosis, autophagy, and DNA damage. *Environmental Science and Pollution Research International*, 25: 20968-20984.

**CHINESE RESEARCH GROUP OF HAPLOID BREEDING** (1978). Induction of haploid plants of *Solanum melongena*, en: *Proceedings of the Symposium on Plant Tissue Culture*. Ed. Science Press. Pekín: 227-232.

**CLAUSEN, R.E. y LAMMERTS, W.E.** (1929). Interspecific hybridisation in *Nicotiana*. X. Haploid and diploid merogony. *The American Naturalist*, 63: 279-282.

**CLAUSEN, R.E. y MANN, M.C.** (1924). Inheritance in *Nicotiana tabacum*: V. The occurrence of haploid plants in interspecific progenies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 10: 121-124.

**CORRAL-MARTÍNEZ, P.** (2010). Obtención de doble haploides en especies de interés agronómico: análisis de agentes y mecanismos celulares implicados en la inducción androgénica en berenjena, colza y tomate. Tesis Doctoral en Biotecnología. Universitat Politècnica de València. 228 pp.

**CORRAL-MARTÍNEZ, P.; CAMACHO-FERNÁNDEZ, C. y SEGUÍ-SIMARRO, J.M.** (2020). Isolated Microspore Culture in *Brassica napus* en: *Plant Embryogenesis: Methods and Protocols*. Ed. Humana Press. Nueva York: 269-282.

**CORRAL-MARTÍNEZ, P.; PARRA-VEGA, V. y SEGUÍ-SIMARRO, J.M.** (2013). Novel features of *Brassica napus* embryogenic microspores revealed by high pressure freezing and freeze substitution: evidence for massive autophagy and excretion-based cytoplasmic cleaning. *Journal of Experimental Botany*, 64: 3061-3075.

**CORRAL-MARTÍNEZ, P. y SEGUÍ-SIMARRO, J.M.** (2012). Efficient production of callus-derived doubled haploids through isolated microspore culture in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Euphytica*, 187: 47-61.

**CORRAL-MARTÍNEZ, P. y SEGUÍ-SIMARRO, J.M.** (2014). Refining the method for eggplant microspore culture: effect of abscisic acid, epibrassinolide, polyethylene glycol, naphthaleneacetic acid, 6-benzylaminopurine and arabinogalactan proteins. *Euphytica*, 195: 369-382.

**CUBERO, J.I.** (2003). *Introducción a la mejora genética vegetal* (2ª edición). Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 565 pp.

**CHEN, M.H.; LIU, L.F.; CHEN, Y.R.; WU, H.K. y YU, S.M.** (1994). Expression of alpha-amylases, carbohydrate metabolism, and autophagy in cultured rice cells is coordinately regulated by sugar nutrient. *The Plant Journal*, 6: 625-636.

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

**DEVAUX, P.** (2003). The *Hordeum bulbosum* (L.) method, en: *Doubled haploid production in crop plants. A manual*. Ed. Springer Netherlands. Ámsterdam: 15-19.

**DION, M.; CHAMBERLAND, H.; ST-MICHEL, C.; PLANTE, M.; DARVEAU, A.; LAFONTAINE, J.G. y BRISSON, L.F.** (1997). Detection of a homologue of bcl-2 in plant cells. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, 75: 457-461.

**DUMAS DE VAULX, R. y CHAMBONNET, D.** (1982). Culture *in vitro* d'anthères d'aubergine (*Solanum melongena* L.): stimulation de la production de plantes au moyen de traitements à 35°C associés à de faibles teneurs en substances de croissance. *Agronomie EDP Sciences*, 2: 983-988.

**DUNWELL, J.M.** (2010). Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnology Journal*, 8: 377-424.

**ESKIN, N.A.M. y PRZYBYLSKI, R.** (2003). Rape seed oil/canola, en: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (2ª edición). Ed. Academic Press. Cambridge: 4911-4916.

**FAOSTAT** (2018). <http://www.fao.org/faostat/en/#data> [last checked July 2020]

**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: 368-375.

- FORSTER, B.P. y THOMAS, W.T.** (2005). Doubled haploids in genetics and plant breeding, en: *Plant Breeding Reviews, Volume 25*. Ed: John Wiley & Sons, Inc. Nueva Jersey: 57-88.
- FURINI, A. y WUNDER, J.** (2004). Analysis of eggplant (*Solanum melongena*)-related germplasm: morphological and AFLP data contribute to phylogenetic interpretations and germplasm utilization. *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 197-208.
- GAINES, E.F. y AASE, H.C.** (1926). A haploid wheat plant. *American Journal of Botany*, 13: 373-385.
- GERMANÀ, M.A.** (2006). Doubled haploid production in fruit crops. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86: 131-146.
- GERMANÀ, M.A.** (2011). Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Reports*, 30: 839-857.
- GÓMEZ-CAMPO, C. y PRAKASH, S.** (1999). Origin and domestication, en: *Developments in Plant Genetics and Breeding*. Ed. Elsevier. Ámsterdam: 33-58.
- GUHA, S. y MAHESHWARI, S.C.** (1964). In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, 204: 497.
- GUIBOILEAU, A.; YOSHIMOTO, K.; SOULAY, F.; BATAILLE, M.P.; AVICE, J.C. y MASCLAUX-DAUBRESSE, C.** (2012). Autophagy machinery controls nitrogen remobilization at the whole-plant level under both limiting and ample nitrate conditions in *Arabidopsis*. *The New Phytologist*, 194: 732-740.
- HANSEN, N.J.P. y ANDERSEN, S.B.** (1998). Efficient production of doubled haploid wheat plants by *in vitro* treatment of microspores with trifluralin or APM. *Plant Breeding*, 117: 401-405.
- ISOUARD, G.; RAQUIN, C. y DEMARLY, Y.** (1979). Obtention de plantes haploides et diploides par culture *in vitro* d'anthères d'aubergine (*Solanum melongena* L.). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, 288: 987-989.
- JOUDEH, J. y CLAXTON, D.** (2012). Obatoclox mesylate : pharmacology and potential for therapy of hematological neoplasms. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 21: 363-373.
- KABBAGE, M.; KESSENS, R.; BARTHOLOMAY, L.C. y WILLIAMS, B.** (2017). The Life and Death of a Plant Cell. *Annual Review of Plant Biology*, 68: 375-404.
- KOSTOFF, D.** (1929). An androgenic *Nicotiana* haploid. *Zeitschrift fur Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 9: 640-642.
- LESTER, R.N. y HASAN, S.M.Z.** (1991). Origin and domestication of the brinjal-eggplant, *Solanum melongena*, from *S. incanum* in Africa and Asia, en: *Solanaceae III: taxonomy, chemistry, evolution*. Ed. The Royal Botanic Gardens Kew. Richmond: 369-387.
- LICHTER, R.** (1982). Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, 105: 427-434.
- LOCATO, V. y DE GARA, L.** (2018). Programmed Cell Death in Plants: An Overview, en: *Methods in Molecular Biology*. Ed. Humana Press. Nueva York: 1-8.

LU, K.; WEI, L.; LI, X.; WANG, Y.; WU, J.; LIU, M.; ZHANG, C.; CHEN, Z.; XIAO, Z.; JIAN, H.; CHENG, F.; ZHANG, K.; DU, H.; CHENG, X.; QU, C.; QIAN, W.; LIU, L.; WANG, R.; ZOU, Q.; YING, J.; XU, X.; MEI, J.; LIANG, Y.; CHAI, Y.R.; TANG, Z.; WAN, H.; NI, Y.; HE, Y.; LIN, N.; FAN, Y.; SUN, W.; LI, N.N.; ZHOU, G.; ZHENG, H.; WANG, X.; PATERSON, A.H. y LI, J. (2019). Whole-genome resequencing reveals *Brassica napus* origin and genetic loci involved in its improvement. *Nature Communications*, 10: 1154.

MACE, E.S.; LESTER, R.N. y GEBHARDT, C.G. (1999). AFLP analysis of genetic relationships among the cultivated eggplant, *Solanum melongena* L.; and wild relatives (Solanaceae). *Theoretical and Applied Genetics*, 99: 626-633.

MALUSZYNSKI, M.; KASHA, K.J. y SZAREJKO, I. (2003). Published doubled haploid protocols in plant species, en: *Doubled haploid production in crop plants. A manual*. Ed. Springer Netherlands. Ámsterdam: 309-335.

MCCABE, P.F. y LEAVER, C.J. (2000). Programmed cell death in cell cultures. *Plant Molecular Biology*, 44: 359-368.

MEYER, R.S.; KAROL, K.G.; LITTLE, D.P.; NEE, M.H. y LITT, A. (2012). Phylogeographic relationships among Asian eggplants and new perspectives on eggplant domestication. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 63: 685-701.

MIYOSHI, K. (1996). Callus induction and plantlet formation through culture of isolated microspores of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plant Cell Reports*, 15: 391-395.

MLEJNEK, P. y PROCHAZKA, S. (2002). Activation of caspase-like proteases and induction of apoptosis by isopentenyladenosine in tobacco BY-2 cells. *Planta*, 215: 158-166.

MONTOLIO, M.; TÉLLEZ, N.; BIARNÉS, M.; SOLER, J. y MONTANYA, E. (2005) Short-term culture with the caspase inhibitor z-VAD.fmk reduces beta cell apoptosis in transplanted islets and improves the metabolic outcome of the graft. *Cell Transplantation*, 14: 59-65.

PARRA-VEGA, V.; CORRAL-MARTÍNEZ, P.; RIVAS-SENDRA, A. y SEGUÍ-SIMARRO, J.M. (2015). Formation and excretion of autophagic plastids (plastolysomes) in *Brassica napus* embryogenic microspores. *Frontiers in Plant Science*, 6: 94.

PÉREZ-PÉREZ, Y.; BÁRÁNY, I.; BERENQUER, E.; CARNEROS, E.; RISUEÑO, M.C. y TESTILLANO, P.S. (2018). 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: 1559577.

QU, G.Q.; LIU, X.; ZHANG, Y.L.; YAO, D.; MA, Q.M.; YANG, M.Y.; ZHU, W.H.; YU, S. y LUO, Y.B. (2009). Evidence for programmed cell death and activation of specific caspase-like enzymes in the tomato fruit heat stress response. *Planta*, 229: 1269-1279.

REAPE, T.J. y MCCABE, P.F. (2008). Apoptotic-like programmed cell death in plants. *The New phytologist*, 180: 13-26.

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: 435-444.

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: 2007-2024.

- RUDOLF, K.; BOHANEK, B. y HANSEN, M.** (1999). Microspore culture of white cabbage, *Brassica oleracea* var. capitata L.: Genetic improvement of non-responsive cultivars and effect of genome doubling agents. *Plant Breeding*, 118: 237-241.
- SAKATA, Y. y LESTER, R.N.** (1997). Chloroplast DNA diversity in brinjal eggplant (*Solanum melongena* L.) and related species. *Euphytica*, 97: 295-301.
- SALAS, P.; RIVAS-SENDRA, A.; PROHENS, J. y SEGUÍ-SIMARRO, J.M.** (2012). Influence of the stage for anther excision and heterostyly in embryogenesis induction from eggplant anther cultures. *Euphytica*, 184: 235-250.
- SEGUÍ-SIMARRO, J.M.** (2010a). Androgenesis revisited. *The Botanical Review*, 76: 377-404.
- SEGUÍ-SIMARRO, J.M.** (2010b). *Biología y biotecnología reproductiva de las plantas*. Ed. Universitat Politècnica de València. Valencia. 448 pp.
- SEGUÍ-SIMARRO, J.M.** (2016). Androgenesis in solanaceae, en: *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants*. Ed. Humana Press. Nueva York: 209-244.
- SEGUÍ-SIMARRO, J.M. y NUEZ, F.** (2008a). How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 134: 1-12.
- SEGUÍ-SIMARRO, J.M. Y NUEZ, F.** (2008b). Pathways to doubled haploidy: chromosome doubling during androgenesis. *Cytogenetic and Genome Research*, 120: 358-369.
- SEGUÍ-SIMARRO, J.M.; TESTILLANO, P.S. y RISUEÑO, M.C.** (2003). Hsp70 and Hsp90 change their expression and subcellular localization after microspore embryogenesis induction in *Brassica napus* L. *Journal of Structural Biology*, 142: 379-391.
- SHARIATPANAHI, M.E.; BAL, U.; HEBERLE-BORS, E. y TOURAEV, A.** (2006). Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 127: 519-534.
- SHULL, G.H.** (1914). Duplicate genes for capsule form in *Bursa bursa-pastoris*. *Zeitschrift für induktive Abstammungs- und Vererbungslehre*, 12: 97-149.
- SIGNORELLI, S.; TARKOWSKI, Ł.P.; VAN DEN ENDE, W. y BASSHAM, D.C.** (2019). Linking Autophagy to Abiotic and Biotic Stress Responses. *Trends in Plant Science*. 24: 413-430.
- SIMMONDS D.H.** (1994) Mechanism of Induction of Microspore Embryogenesis in *Brassica napus*: Significance of the Preprophase Band of Microtubules in the First Sporophytic Division, en: *Biomechanics of Active Movement and Division of Cells*. Ed. Springer. Berlín-Heidelberg: 569-574.
- SINHA, R.K.; POSPÍŠIL, P.; MAHESHWARI, P. y EUDES, F.** (2016). Bcl-2 $\Delta$ 21 and Ac-DEVD-CHO Inhibit Death of Wheat Microspores. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1931.
- SMYKAL, P.** (2000). Pollen embryogenesis - the stress mediated switch from gametophytic to sporophytic development. Current status and future prospects. *Biologia Plantarum*, 43: 481-489.
- SU, T.; LI, X.; YANG, M.; SHAO, Q.; ZHAO, Y.; MA, C. y WANG, P.** (2020). Autophagy: An Intracellular Degradation Pathway Regulating Plant Survival and Stress Response. *Frontiers in Plant Science*, 11: 164.

- TANG, J. y BASSHAM, D.C.** (2018). Autophagy in crop plants: what's new beyond Arabidopsis? *Open biology*, 8: 180162.
- TELMER, C.A.; NEWCOMB, W. y SIMMONDS, D.H.** (1993). Microspore development in *Brassica napus* and the effect of high temperature on division in vivo and in vitro. *Protoplasma*, 172: 154-165.
- TESTILLANO, P.S.** (2019). Microspore embryogenesis: targeting the determinant factors of stress-induced cell reprogramming for crop improvement. *Journal of Experimental Botany*, 70: 2965-2978.
- TOURAEV, A.; PFOSSER, M. y HEBERLE-BORS, E.** (2001). The microspore: A haploid multipurpose cell, en: *Advances in Botanical Research*. Ed. Elsevier. Ámsterdam: 53-109.
- USDA, NRCS PLANTS DATABASE** (2020). <https://plants.sc.egov.usda.gov/java/> [last checked July 2020]
- VAN DOORN, W.G.** (2011) Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. *Journal of Experimental Botany*, 62: 4749–4761.
- VAN DOORN, W.G. y WOLTERING, E.J.** (2005). Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends in Plant Science*, 10: 117-122.
- WANG, J.X.; GAO, T.G. y KNAPP, S.** (2008). Ancient Chinese literature reveals pathways of eggplant domestication. *Annals of Botany*, 102: 891-897.
- WEESE, T.L. y BOHS, L.** (2010). Eggplant origins: out of Africa, into the Orient. *Taxon*, 59: 49-56.
- YOSHIMOTO, K.; HANAOKA, H.; SATO, S.; KATO, T.; TABATA, S.; NODA, T. y OHSUMI, Y.** (2004). Processing of ATG8s, Ubiquitin-Like Proteins, and Their Deconjugation by ATG4s Are Essential for Plant Autophagy. *The Plant Cell*, 16: 2967-2983.
- YU, Y.; JIAO, L.; FU, S.F.; YIN, L.; ZHANG, Y.L. y LU, J.** (2016). Callose Synthase Family Genes Involved in the Grapevine Defense Response to Downy Mildew Disease. *Phytopathology*, 106: 56-64.
- ZAKI, M.A. y DICKINSON, H.G.** (1990). Structural changes during the first divisions of embryos resulting from anther and free microspore culture in *Brassica napus*. *Protoplasma*, 156: 149-162.
- ZHAO, J.P.; SIMMONDS, D.H. y NEWCOMB, W.** (1996). Induction of embryogenesis with colchicine instead of heat in microspores of *Brassica napus* L cv Topas. *Planta*, 198: 433-439.
- ZHOU, W.J.; HAGBERG, P. y TANG, G.X.** (2002). Increasing embryogenesis and doubling efficiency by immediate colchicine treatment of isolated microspores in spring *Brassica napus*. *Euphytica*, 128: 27-34.
- ZORINIANTS, S.; TASHPULATOV, A.; HEBERLE-BORS, E. y TOURAEV, A.** (2005). The role of stress in the induction of haploid microspore embryogenesis, en: *Haploids in crop improvement II*. Ed. Springer. Berlín-Heidelberg: 35-52.