



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

TRABAJO FINAL DE GRADO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERIA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA 2019-2020

Efecto de los inhibidores de las desacetilasas de histonas (iHDACs) y del estrés del retículo endoplásmico en la embriogénesis de microsporas

Autora: Lucía Viqueira Díaz-Alejo

Tutor: Jose María Seguí Simarro

Cotutor: Patricia Corral Martínez

Valencia, Julio 2020

Título: Efecto de los inhibidores de las desacetilasas de histonas (iHDACs) y del estrés del retículo endoplásmico en la embriogénesis de microsporas.

Resumen: La agricultura actual se basa en gran medida en la productividad que proporciona el uso de híbridos entre líneas homocigotas (puras) con caracteres definidos. Tradicionalmente, estas líneas puras se obtenían mediante ciclos sucesivos de autofecundación-selección, requiriendo una gran cantidad de recursos económicos y tiempo. Sin embargo, los programas actuales de mejora genética vegetal cuentan con la tecnología de los dobles haploides (DHs), basada fundamentalmente en la reprogramación de microsporas hacia la embriogénesis, lo que permite obtener líneas puras, doble haploides, mediante la regeneración *in vitro* de plantas partiendo de microsporas o polen recién dividido. Esta tecnología presenta un elevado interés agronómico al reducir el tiempo de obtención de híbridos a una sola generación, suponiendo gran un ahorro temporal y económico.

Uno de los factores que reducen la eficiencia del cultivo de microsporas para la obtención de DHs es el estrés del retículo endoplásmico (RE). Bajo condiciones de estrés, la capacidad de plegado del RE no puede cubrir la demanda, de modo que las proteínas se acumulan sin plegar, causando un estrés en el RE. Existe un mecanismo de control de calidad, la UPR o “Unfolded Protein Response” para tratar que el plegado de proteínas funcione correctamente con la demanda aparecida tras el estrés y disminuir la acumulación de proteínas mal plegadas o sin plegar en el RE. Otro de los factores que afectan a la eficiencia del cultivo de microsporas es la baja tasa de reprogramación celular hacia la embriogénesis. Esta tasa aumenta cuando las histonas del DNA se encuentran acetiladas, proporcionando una estructura descondensada a la cromatina y favoreciendo el cambio de programa de desarrollo de la microspora al embriogénico.

Consecuentemente, la aplicación de compuestos con la capacidad de inhibir el estrés en el RE y las desacetilasas de histonas (HDACs) aumenta la eficiencia del cultivo de microsporas. En el presente trabajo se estudia el efecto de la aplicación de los compuestos inhibidores del estrés del RE: TUDCA y DHA, y de los inhibidores de HDACs: Panobinostat e iHDAC Cocktail en la eficiencia del cultivo de microsporas de colza y de berenjena. Los compuestos se aplicaron en distintas concentraciones y en distintos tiempos para determinar la concentración y el tiempo de aplicación óptimos.

Palabras clave: colza, berenjena, microspora, embriogénesis, Doble Haploide, inhibidores del estrés del retículo endoplásmico, inhibidores de las desacetilasas de histonas.

Autora: Lucía Viqueira Díaz-Alejo.

Fecha: Valencia, Julio 2020.

Tutor: Prof. D. Jose María Seguí Simarro.

Cotutora: Patricia Corral Martínez.

Title: Effect of histone deacetylase inhibitors (iHDACs) and endoplasmic reticulum stress inhibitors on microspore embryogenesis.

Abstract: Today's agriculture relies heavily on the productivity provided by the use of hybrids between homozygous (pure) lines with defined traits. Traditionally, these pure lines were obtained through successive cycles of self-fertilization-selection, requiring a large amount of economic resources and time. However, current plant breeding programs rely on double haploid (DH) technology, based mainly on the reprogramming of microspores towards embryogenesis, which allows obtaining pure lines, double haploid, through the *in vitro* regeneration of plants from microspores or newly divided pollen. This technology is of high agronomic interest since it reduces the time needed to obtain hybrids to only one generation, which means a great temporal and economic saving.

One of the factors that reduce the efficiency of microspore cultivation for the obtention of DHs is the stress of the endoplasmic reticulum (ER). Under stress conditions, the folding capacity of ER cannot cover the demand, so proteins accumulate without folding, causing ER stress. There is a quality control mechanism, the UPR or Unfolded Protein Response, to try to match the protein folding capacity with the demand appeared after the stress and to reduce the accumulation of badly folded or unfolded proteins in the ER. Another factor affecting the efficiency of microspore culture is the low rate of cell reprogramming towards embryogenesis. This rate increases when DNA histones are acetylated, providing an uncondensed structure to the chromatin and favoring the change of developmental program of the microspore to embryogenic.

Consequently, the application of compounds with the ability to inhibit the stress on ER and histone deacetylases (HDACs) increases the efficiency of microspore culture. In the present work we study the effect of the application of the ER stress inhibitor compounds: TUDCA and DHA, and the HDACs inhibitors: Panobinostat and iHDAC Cocktail, on the efficiency of rapeseed and eggplant microspore cultures. The compounds were applied at different concentrations and times to determine the optimal concentration and application time.

Keywords: rapeseed, eggplant, microspore, embryogenesis, Double Haploid, endoplasmic reticulum stress inhibitor, histone deacetylase inhibitor.

Author: Lucía Viqueira Díaz-Alejo.

Date: Valencia, Julio 2020.

Director: Prof. D. Jose María Seguí Simarro.

Codirector: Patricia Corral Martínez.

AGRADECIMIENTOS

Simplemente agradecida.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Colza – <i>Brassica napus</i> L.....	1
1.1.1. Clasificación taxonómica	1
1.1.2. Origen y domesticación	2
1.1.3. Importancia económica	2
1.2. Berenjena – <i>Solanum melongena</i> L.....	3
1.2.1. Clasificación taxonómica	3
1.2.2. Origen y domesticación	3
1.2.3. Importancia económica	4
1.3. Híbridos.....	5
1.3.1. Papel de los híbridos en programas de mejora genética vegetal	5
1.3.2. Obtención de híbridos	6
1.4. Haploides y dobles haploides	6
1.4.1. Características y aplicaciones de los haploides	6
1.4.2. Características y aplicaciones de los dobles haploides	7
1.4.3. Obtención de dobles haploides.....	7
1.4.4. Ventajas y limitaciones de la androgénesis frente otros métodos	9
1.5. Embriogénesis de microsporas	9
1.5.1. Cultivo de anteras <i>in vitro</i>	10
1.5.2. Cultivo de microsporas aisladas <i>in vitro</i>	10
1.5.3. Factores que influyen en la reprogramación de la embriogénesis	11
1.6. Respuesta a estrés en microsporas	11
1.6.1. Respuesta a estrés en embriogénesis de microsporas	11
1.6.2. Respuesta a estrés térmico en embriogénesis de microsporas.....	12
1.7. Estrés del retículo endoplásmico (RE)	13
1.7.1. Estrés del retículo endoplásmico en plantas como respuesta al estrés	13
1.7.2. Inhibidores del estrés en el retículo endoplásmico	15
1.7.3. Estrés en el retículo endoplásmico en microsporas embriogénicas	15
1.8. Desacetilasas de histonas (HDAC)	16
1.8.1. Papel de la acetilación de histonas en la embriogénesis de microsporas	16
1.8.2. Inhibidores de las desacetilasas de histonas	17
1.8.3. Inhibidores de las desacetilasas de histonas en la embriogénesis de microsporas.....	17
2. OBJETIVOS.....	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1. Colza	19
3.1.1. Material vegetal y condiciones de cultivo	19
3.1.2. Selección yemas florales para el cultivo de microsporas	19
3.1.3. Cultivo de microsporas de colza	19
3.2. Berenjena	21
3.2.1. Material vegetal y condiciones de cultivo	21
3.2.2. Selección de anteras para el cultivo de microsporas	22
3.2.3. Cultivo de microsporas de berenjena.....	22

3.3. Análisis estadísticos	22
4. RESULTADOS	23
4.1. Cultivo microsporas de colza	23
4.1.1. Embriogénesis de microsporas en cultivo de colza.....	23
4.1.2. Efecto de los inhibidores del estrés del retículo endoplásmico en la embriogénesis de microsporas de colza.....	23
4.1.3. Efecto de los inhibidores de las desacetilasas de histonas en la embriogénesis de microsporas de colza.....	26
4.2. Cultivo microsporas de berenjena	29
4.2.1. Embriogénesis de microsporas en cultivo de berenjena	29
4.2.2. Efecto de los inhibidores del estrés del retículo endoplásmico en la embriogénesis de microsporas de berenjena	29
4.2.3. Efecto de los inhibidores de las desacetilasas de histonas en la embriogénesis de microsporas de berenjena	30
5. DISCUSIÓN.....	32
6. CONCLUSIONES.....	36
7. REFERENCIAS	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Descripción de las relaciones genéticas entre las especies del género <i>Brassica</i>	1
Figura 2. Producción y área cultivada de colza mundial entre los años 1994 y 2018	2
Figura 3. Producción de aceite de colza mundial entre los años 1993 y 2014.....	3
Figura 4. Producción y área cultivada de berenjena mundial entre los años 1961 y 2018.....	5
Figura 5. Rutas androgénicas alternativas al desarrollo gametofítico del polen o de la microspora	8
Figura 6. Posibles vías por las que el estrés del retículo endoplásmico (RE) conduce a la supervivencia o muerte celular.....	14
Figura 7. Procedimiento para el aislamiento de microsporas in vitro	20
Figura 8. Embriogénesis de microsporas de <i>Brassica napus</i> L.	23
Figura 9. Efecto del TUDCA con aplicación continua en el número de embriones de colza obtenidos.	24
Figura 10. Efecto del DHA con aplicación continua en el número de embriones de colza obtenidos	25
Figura 11. Efecto del Panobinostat con aplicación de 24 horas en el número de embriones de colza obtenidos	27
Figura 12. Efecto del iHDAC Cocktail con aplicación de 24 horas en el número de embriones de colza obtenidos	28
Figura 13. Embriogénesis de microsporas en <i>Solanum melongena</i> L.	29
Figura 14. Efecto del TUDCA con aplicación continua en el número de callos de berenjena obtenidos	30
Figura 15. Efecto del Panobinostat con aplicación de 24 horas en el número de callos de berenjena generados	30
Figura 16. Efecto de iHDAC Cocktail con aplicación de 24 horas en el número de callos de berenjena obtenidos.....	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la colza.....	1
Tabla 2. Clasificación taxonómica de la berenjena.....	3
Tabla 3. Producción, área y rendimiento de los diez cultivos de hortalizas más producidos a nivel mundial en el 2018.....	4
Tabla 4. Composición medio de cultivo NLN13 para microsporas de colza.....	20
Tabla 5. Condiciones estudiadas según compuesto en ambos tamaños de microsporas.	21
Tabla 6. Condiciones estudiadas según compuesto aplicado al cultivo de berenjenas.....	22
Tabla 7. Composición medio de cultivo NLN2 para microsporas de berenjena.	22

LISTADO DE ABREVIATURAS

ABA: Ácido abscisico

ATP: Adenosín trifosfato

BAP: 6-Bencilaminopurina

BiP: Binding Immunoglobulin Protein

DH: Doble Haploide

DHA: Ácido docosahexaenoico

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ERAD: Endoplasmic Reticulum Associated Degradation system

ERQC: Endoplasmic Reticulum Quality Control

FDA: Food and Drug Administration

HAT: Histona acetiltransferasa

HDAC: Desacetilasa de histonas

HSP: Heat Shock Protein

H3/H3Ac: Histona 3 o Histona 3 acetilada

H4/H4Ac: Histona 4 o Histona 4 acetilada

iHDAC: Inhibidor de las desacetilasas de histonas

Lys: Lisina

MDE: Embrión Derivado de Microspora

NAA: Ácido naftalenacético

NaB: Butirato de sodio

PCNA: Antígeno nuclear de célula proliferante

RE: Retículo Endoplásmico

RIDD: IRE1-Dependent Decay

ROS: Especie reactiva de oxígeno

SAHA: Ácido suberoilánilídrico

TSA: Tricostatina A

TUDCA: Ácido tauroursodeoxicólico

UPR: Unfolded Protein Response

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Colza – *Brassica napus* L.

1.1.1. Clasificación taxonómica

La colza (*Brassica napus* L.) es una especie alógama facultativa perteneciente al género *Brassica*, cuya clasificación taxonómica (Tabla 1, USDA, 2020a) es la siguiente:

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la colza (USDA, 2020a).

Ranking taxonómico	Nombre científico – Nombre común
Reino	<i>Plantae</i> - Plantas
Subreino	<i>Tracheobionta</i> – Plantas Vasculares
Superdivisión	<i>Spermatophyta</i> – Plantas con semilla
División	<i>Magnoliophyta</i> – Plantas con flor
Clase	<i>Magnoliopsida</i> - <i>Dicotiledóneas</i>
Subclase	<i>Dilleniidae</i>
Orden	<i>Capparales</i>
Familia	<i>Brassicaceae</i> / <i>Cruciferae</i> – Familia de la mostaza
Género	<i>Brassica</i> L. - Mostaza
Especie	<i>Brassica napus</i> L. - Colza

El género *Brassica* incluye especies de plantas caracterizadas por ser herbáceas cultivadas anual o bienalmente. Además de la colza, dentro de este género se incluyen otras especies de elevada importancia agrícola, ejemplo de ello son: la coliflor (*B. oleracea botrytis botrytis*), el brócoli (*B. oleracea botrytis itálica*) o el nabo (*B. rapa rapa*).

El modelo del triángulo de U describe la relación genética entre los cultivos del género *Brassica* (Nagaharu, 1935), en el que la hibridación entre cada par de las tres especies diploides progenitoras *B. rapa* (genoma A, $n = 10$), *B. nigra* (genoma B, $n = 8$) y *B. oleracea* (genoma C, $n = 9$) dio origen a las tres especies alotetraploides, *B. juncea* (genoma AB, $n = 18$), *B. napus* (genoma AC, $n = 19$) y *B. carinata* (genoma BC, $n = 17$) (Figura 1, (Koh *et al.*, 2017)).

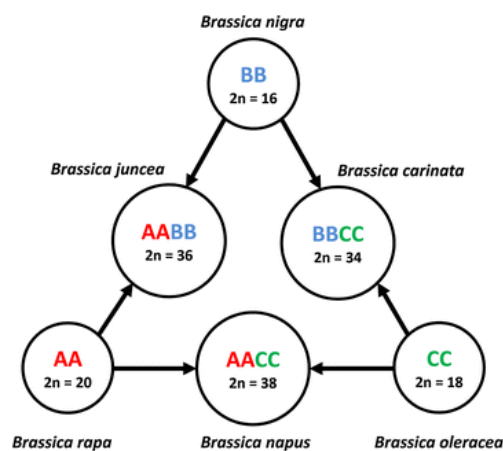


Figura 1. Descripción de las relaciones genéticas entre las especies del género *Brassica* (Koh *et al.*, 2017).

1.1.2. Origen y domesticación

Como uno de los primeros cultivos alopoliploides, *B. napus* se formó mediante la hibridación de *B. rapa* y *B. oleracea*. El tiempo estimado de aparición de *B. napus* es entre 6700-7500 años atrás o 38.000-51.000 años atrás, basado en dos estimaciones. Un estudio donde se desarrolló un gran conjunto de datos sobre la variación del genoma de accesiones de *B. napus* genéticamente diversas (Lu *et al.*, 2019), brindó la oportunidad de resolver con precisión el origen y la historia evolutiva de *B. napus*, afirmando que se originó a partir de la hibridación entre *B. rapa* y *B. oleracea* hace entre 1910-7180 años, lo que concuerda con la estimación anterior de ~6700-7500 años atrás. Además, *B. napus* originalmente era una semilla oleaginosa de invierno, y los ecotipos de primavera y de semi-invierno de *B. napus* se desarrollaron hace unos 416 años y 60 años, respectivamente. En cambio, la *B. napus* no oleaginosa se desarrolló hace 277 años (Lu *et al.*, 2019).

Actualmente, la colza se ha convertido en una de las fuentes de aceite vegetal más importantes del mundo. Sin embargo no alcanzó esta importancia económica hasta los años 60-70, cuando se eliminó por completo el contenido de ácido erúxico del aceite y se redujeron los glucosinolatos de 100 a 30 $\mu\text{mol g}^{-1}$ en la harina restante que queda tras la extracción (Rahman, 2013). El ácido erúxico puede provocar lipidosis en el músculo cardíaco, reduciendo la contractibilidad y dañando los tejidos (Sissener *et al.*, 2018), mientras que los glucosinolatos son sustancias tóxicas implicadas en la defensa de la planta (Nour-Eldin *et al.*, 2017). La semilla oleaginosa de *B. napus* fue mejorada en la composición de estos compuestos nutricionalmente indeseables y recibe el nombre de "colza doblemente baja" o "canola".

1.1.3. Importancia económica

La semilla oleaginosa *B. napus* ha alcanzado una gran importancia económica en los últimos 50 años, después de un programa de cría intensiva para aumentar rendimientos y disminuir los componentes nutricionalmente indeseables (Allender y King, 2010).

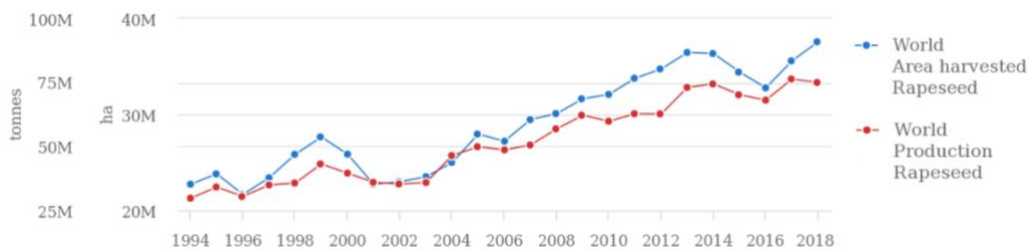


Figura 2. Producción y área cultivada de colza mundial entre los años 1994 y 2018 (FAOSTAT, 2020).

Desde el año 1994 hasta el 2018, la producción de colza a nivel mundial ha aumentado en 45 millones de toneladas, alcanzando 76,4 millones de toneladas cultivadas en 2018 (Figura 2). Este aumento viene acompañado de un aumento de 14,8 millones de hectáreas del área cultivada a nivel mundial, cuyo valor total en 2018 era de 37,5 millones de hectáreas (Figura 2), siendo Canadá el principal productor, seguido por China e India. En los últimos años también ha habido un aumento en la producción mundial de la variedad de colza "canola" destinada a la producción de aceite, alcanzando las 25,9 millones de toneladas mundiales en el año 2014 (Figura 3), siendo la tercera fuente de aceite vegetal mundial más importante ese mismo año, después del aceite de palma y de soja (FAOSTAT, 2020).

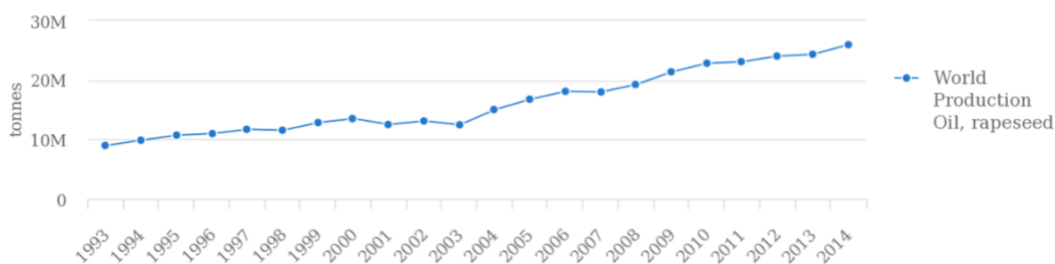


Figura 3. Producción de aceite de colza mundial entre los años 1993 y 2014 (FAOSTAT, 2020).

1.2. Berenjena – *Solanum melongena* L.

1.2.1. Clasificación taxonómica

La berenjena (*Solanum melongena* L.) es una especie autógama perteneciente al género *Solanum*, cuya clasificación taxonómica (Tabla 2, USDA, 2020b) es la siguiente:

Tabla 2. Clasificación taxonómica de la berenjena (USDA, 2020b).

Ranking taxonómico	Nombre científico – Nombre común
Reino	<i>Plantae</i> - Plantas
Subreino	<i>Tracheobionta</i> – Plantas Vasculares
Superdivisión	<i>Spermatophyta</i> – Plantas con semilla
División	<i>Magnoliophyta</i> – Plantas con flor
Clase	<i>Magnoliopsida - Dicotiledóneas</i>
Subclase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Solanales</i>
Familia	Solanaceae – Familia de la patata
Género	<i>Solanum</i> L.
Especie	<i>Solanum melongena</i> L. - Berenjena

Dentro de la familia de las solanáceas, *Solanum* es el género más rico en especies con unas 1300 aproximadamente (Daunay y Lester, 1988). En él se encuentran plantas herbáceas, arbustivas o trepadoras, generalmente espinosas. Dentro de este género también se incluyen tres cultivos alimenticios de gran importancia económica; la patata (*Solanum tuberosum*), el tomate (*Solanum lycopersicum*) y la berenjena (*Solanum melongena*). Este último se trata de un cultivo diploide ($2n=24$) cultivado como anual, aunque puede comportarse como perenne.

1.2.2. Origen y domesticación

La mayoría de las especies domesticadas del género *Solanum* son originarias del continente Americano. Sin embargo la berenjena y sus relativos son una excepción al ser originarias del viejo mundo (Daunay *et al.*, 2001). La berenjena proviene probablemente de la domesticación de la especie silvestre *Solanum incanum*, forma ancestral que se encuentra en África ecuatorial y en el Oriente Medio (Daunay, 2008). Ambas especies presentan un parecido morfológico elevado y es posible la obtención de individuos híbridos fértiles a partir de ellas (Lester y Hasan, 1991). Además, una gran diversidad de estudios basados en enzimas (Kaur *et al.*, 2004),

alozimas (Karihaloo y Gottlieb, 1995), proteínas de semillas (Karihaloo *et al.*, 2002), DNA plastidial (Sakata y Lester, 1997), y DNA nuclear (Weese y Bohs, 2010) confirman la estrecha relación existente entre ambas especies.

El progenitor *S. incanum* se introdujo en Asia desde Oriente Medio, bien espontánea o deliberadamente durante las migraciones humanas en la época del Paleolítico o Neolítico, y concretamente la región indo-birmana ha sido identificada como el centro de domesticación de *S. melongena*. Diversos textos escritos en sánscrito documentan su amplio uso en la India hace por lo menos 2000 años a modo de alimento y medicina (Daunay, 2008). También se ha identificado China como otro centro de domesticación, y la propia literatura china confirma el cultivo de berenjenas ya en el año 59 a.C. (Page *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2008).

Desde su centro de origen y domesticación indochino, la berenjena se trasladó aún más hacia el este, a Japón, y hacia el oeste, siendo introducida en el norte de África antes de la Edad Media, probablemente a través de la Ruta de la Seda. Las conquistas musulmanas también contribuyeron a su expansión por el Mediterráneo, donde el cultivo de berenjenas comenzó en Italia durante los siglos XV-XVI, y se expandió a otras partes de Europa, hasta hoy en día que se cultiva alrededor de todo el mundo (Daunay *et al.*, 2001; Frary *et al.*, 2007; Daunay, 2008).

1.2.3. Importancia económica

Actualmente la berenjena es una de las hortalizas más importantes a nivel mundial, siendo el sexto cultivo de hortalizas con mayor producción mundial (Tabla 3) y la tercera verdura solanácea más producida después de la patata y el tomate (Chapman, 2019).

Tabla 3. Producción, área y rendimiento de los diez cultivos de hortalizas más producidos a nivel mundial en el 2018 (FAOSTAT, 2020).

Cultivo	Producción (t)	Área (ha)	Rendimiento (kg/ha)
Tomates	182.256.458	4,762,457	382.694
Cebollas (secas)	96.773.819	5.039.908	192.015
Pepinos y pepinillos	75.219.440	1.984.518	379.031
Coles y otras Brassicas	69.381.555	2.412.167	287.632
Berenjena	54.077.210	1.864.556	290.027
Zanahorias y nabos	39.996.287	1.131.049	353.621
Pimientos y chiles	36.771.482	1.990.423	184.742
Ajo	28.494.130	1.546.741	184.220
Calabazas	27.643.932	2.042.955	135.313
Lechuga y achicoria	27.256.487	1.270.138	214.595

Desde el año 1961 hasta 2018, el área dedicada al cultivo de berenjena a nivel mundial ha aumentado significativamente, hasta alcanzar el valor de 1,8 millones de hectáreas (Figura 4). Este incremento se debe a que desde 1961 la producción de berenjena mundial ha aumentado en 47 millones de toneladas (Figura 4). Concretamente, este aumento tan pronunciado ha tenido lugar en los últimos 25 años, durante los cuales la cantidad de producción se ha visto triplicada. En 2018 se alcanzó valor de 54 millones de toneladas producidas, de las cuales 34 millones fueron cultivadas en China, siendo el mayor productor de berenjena. El segundo país más productor es India, seguido de Egipto. España se encuentra en el puesto número 10 de los países productores de berenjena, con 238.325 toneladas en 2018 (FAOSTAT, 2020).

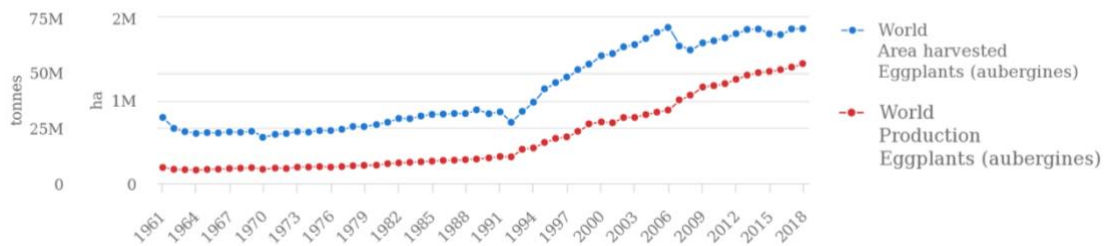


Figura 4. Producción y área cultivada de berenjena mundial entre los años 1961 y 2018 (FAOSTAT, 2020).

1.3. Híbridos

1.3.1. Papel de los híbridos en programas de mejora genética vegetal

La mejora genética vegetal permite manipular genéticamente plantas en beneficio de la humanidad, conjugando desde los métodos más convencionales de selección hasta las más novedosas herramientas biotecnológicas. Una de las estrategias de mejora genética vegetal más eficaces para la industria agrícola es la producción de líneas híbridas. Los híbridos son individuos que presentan heterocigosis en todos sus *loci*. Estos individuos presentan superioridad fenotípica frente a aquellos con algún grado de homocigosis en su genoma. Esta superioridad reside en lo que se conoce como heterosis o vigor híbrido, definido como un fenómeno natural por el cual los descendientes híbridos de individuos genéticamente diversos muestran características físicas y funcionales mejoradas en relación con sus progenitores (Fu *et al.*, 2014).

El término de heterosis fue introducido por primera vez en 1914 por George Shull, quien observó que "el vigor fisiológico de un organismo, tal como se manifiesta en su rapidez de crecimiento, su altura y su robustez general, se correlaciona positivamente con el grado de disimilitud de los gametos por cuya unión se formó el organismo". Sin embargo, la heterosis fue constatada con anterioridad, en 1764, por Joseph Koelreuter quien observó que algunos híbridos de tabaco excedían a sus progenitores en el vigor de crecimiento. Un siglo más tarde, en 1876, Charles Darwin observó el mismo fenómeno en más de 60 especies de plantas en las que la pauta de crecimiento era superior en los híbridos intraespecíficos, frente a sus líneas parentales obtenidas tras sucesivos ciclos de autofecundación (Chen, 2013).

Desde entonces el fenómeno de la heterosis ha sido explotado para aumentar la productividad de numerosos cultivos y plantas hortícolas. La primera utilización de la heterosis fue en el maíz, seguido de la remolacha, cebolla, berenjena, tomate, pimientos, arroz, algodón, girasol y colza. Pese a su empleo, la base genética subyacente a la heterocigosis no se ha conseguido explicar de manera satisfactoria (Stuber, 1994; Fu *et al.*, 2014). Dos modelos genéticos han sido debatidos durante más de un siglo. El modelo de 'dominancia' propone que los progenitores endogámicos están limitados por alelos ligeramente deletéreos en varios *loci* que difieren entre las partes, mientras que en el híbrido, el alelo superior del respectivo progenitor completará el alelo inferior del otro. Mientras que el modelo de 'sobredominancia' propone que diversos alelos interactúan para crear una función superior a la que podría ocurrir con los alelos homocigotos. Sin embargo, ninguno de estos modelos por sí solo es capaz de explicar adecuadamente las pruebas relativas a la heterosis (Birchler *et al.*, 2006; Chen, 2013).

Las líneas híbridas se usan frecuentemente en la industria agrícola debido a las diversas ventajas que supone para los agricultores. En primer lugar, todas las plantas del híbrido son genéticamente idénticas, por lo que presentan una extraordinaria homogeneidad en todas las fases del cultivo, incluyendo floración, maduración y recolección, facilitando y simplificando la tarea del agricultor. Este también se ve beneficiado por un aumento en el rendimiento del cultivo debido a su vigor híbrido. Los productores de semillas también se ven favorecidos por esta situación, ya que la generación posterior al híbrido es heterogénea y heterocigótica, favoreciendo la compra de semillas híbridas. El agricultor se ve obligado a comprar la semilla híbrida anualmente, pero esta inversión se ve recompensada con el incremento del rendimiento que le ofrece, consiguiendo una producción mayor (Corral-Martínez, 2013).

1.3.2. Obtención de híbridos

Los híbridos se obtienen a partir del cruzamiento de líneas puras, que se tratan de variedades homocigóticas para todos los *loci* del genoma. Tradicionalmente, estas líneas se obtenían mediante ciclos sucesivos de autofecundación y selección durante diversas generaciones (de 7 a 9), hasta obtener un alto grado de homogeneidad en todos sus caracteres. Una vez generadas las líneas puras, deben estudiarse sus características y realizarse pruebas de aptitud combinatoria general y/o específica. Esto se debe a que los distintos genotipos difieren en su capacidad para combinarse entre sí y con otros genotipos para la obtención de híbridos, haciendo esencial la identificación de las combinaciones de parentales más prometedoras a la hora de explotar la heterosis en los cultivos agrícolas (Geleta *et al.*, 2004).

La obtención de líneas puras útiles se trata de un proceso costoso tanto económicamente como temporalmente pudiendo durar entre once y trece años, dependiendo de la especie (Yan *et al.*, 2017). Además de no asegurar la obtención de un individuo homocigoto para todos sus *loci*, ya que algunos genes se encuentran estrechamente ligados, siendo imposible/muy poco frecuente la recombinación y, por tanto, lograr una homocigosis completa (Martín, 2002). No obstante, el desarrollo de la tecnología de dobles haploides (DHs) ofrece la oportunidad de obtener líneas puras totalmente homocigóticas en una única generación, lo que supone un gran ahorro temporal y económico.

1.4. Haploides y dobles haploides

1.4.1. Características y aplicaciones de los haploides

Los haploides son plantas esporofíticas con un número gamético de cromosomas (Germanà, 2006), es decir, contienen el mismo número de cromosomas en sus células somáticas que en los gametos normales de su especie. Estos organismos haploides pueden producirse espontáneamente (aunque muy poco frecuente), o pueden ser inducidos artificialmente por métodos de polinización modificada *in vivo*, o por el cultivo *in vitro* de gametofitos masculinos o gametos femeninos (Dunwell, 2010).

Los haploides son de gran utilidad para la detección de mutaciones recesivas, ya que los efectos de la dominancia se ven eliminados al no haber distintos alelos. También se emplean para la elaboración de mapas de ligamientos en cartografía génica. No obstante, presentan una gran desventaja evolutiva: son estériles. Al poseer la mitad de los cromosomas de la especie, la meiosis no se puede desarrollar con normalidad, impidiendo la formación de

gametos, por lo que no es posible obtener descendencia por la vía sexual (Seguí-Simarro, 2010b). No obstante, es posible que estos organismos haploides sufran una duplicación cromosómica espontánea o inducida, siendo denominada la planta resultante DH (Germanà, 2011). El genoma del DH estará, por tanto, formado por dos copias exactas del genoma haploide, siendo así homocigoto para todos los *loci*. En términos de mejora genética, a estos individuos genéticamente homogéneos se les denomina líneas puras. De modo que un DH es una línea pura, y esta es precisamente su gran ventaja (Seguí-Simarro, 2010b).

1.4.2. Características y aplicaciones de los dobles haploides

La principal aplicación de la tecnología de los DHs se enmarca en el contexto de la mejora genética, para la obtención de líneas puras necesarias para la producción de semillas híbridas. Como se ha mencionado con anterioridad, esta alternativa a los métodos convencionales de autofecundación supone una reducción de costes y tiempo considerable, permitiendo fijar un genotipo híbrido a una sola generación *in vitro* (Germanà, 2011; Seguí-Simarro, 2010b).

Dentro de este contexto de mejora vegetal, los DH también se emplean en cartografía genética de caracteres y son una excelente herramienta en transgénesis, ya que al introducirse el transgen de interés en un organismo haploide y duplicarse su genoma, se evita la obtención de individuos hemicigotos a la vez que se ahorra tiempo y recursos en la producción de plantas con el transgen en ambos cromosomas homólogos (Seguí-Simarro, 2010a).

Por otro lado, los DH también presentan diversas aplicaciones en lo que investigación básica respecta. Ejemplo de ello es su uso para la selección y detección de mutaciones recesivas, que podrían estar enmascaradas en individuos heterocigóticos. También se emplean en estudios de ligamiento y estimas de fracciones de recombinación. A pesar de que es posible realizar estos estudios mediante retrocruzamientos convencionales, se prefiere el uso de DH debido a que son autoperpetuables, al poseer la misma identidad genética la descendencia derivada de su autofecundación. Por último, también sirven como sistema modelo para el estudio *in vitro* del desarrollo embrionario sin la interferencia del tejido materno (Seguí-Simarro, 2010b).

1.4.3. Obtención de dobles haploides

La mayoría de estrategias para la obtención de DH aprovechan la capacidad que presentan las células vegetales de prácticamente expresar cualquier parte de su genoma. Esta cualidad se conoce como totipotencia, y permite a una célula ya diferenciada desdiferenciarse y adoptar una ruta de desarrollo alternativa a la original. Esta célula reprogramada puede desviarse hacia la regeneración de un nuevo individuo, bien a través de la regeneración de sus órganos vegetativos (organogénesis) o bien entrando en la ruta embriogénica (embriogénesis). Es posible inducir ambas rutas a partir de diversos tejidos vegetales, sin embargo, para la regeneración de individuos haploides o DHs se realiza a partir del gameto femenino o gametofito masculino (Seguí-Simarro, 2010a).

Ginogénesis es el nombre que recibe la vía por la cual se obtienen haploides y DHs a partir del gameto femenino no polinizado. Esta técnica consiste en el cultivo *in vitro* de óvulos, ovarios o flores inmaduras, hasta la maduración del saco embrionario, donde se desarrolla un embrión. Generalmente, los embriones ginogénicos se originan de la célula huevo y son haploides, por lo que se requiere el uso de tratamientos de duplicación cromosómica, siendo el tratamiento con el antimitótico colchicina el más empleado (Seguí-Simarro, 2010a, b). El principal factor limitante de la ginogénesis es el genotipo, siendo muy pocas las especies que responden a esta

técnica. Se emplea en especies como la cebolla y la remolacha azucarera, donde otras técnicas para generar DHs han resultado inefectivas (Forster *et al.*, 2007). Además, en algunas especies es necesaria la aplicación de *polen mentor* para la inducción de la ginogénesis. Este polen mentor puede bien provenir de una especie sexualmente incompatible o haber sido irradiado previamente para su inactivación, asegurando la inducción del desarrollo ginogénico del gameto femenino en ausencia de fecundación (Seguí-Simarro, 2010b).

Por otro lado, también es posible la obtención de organismos haploides o DHs a partir del gametofito masculino o de sus precursores a través de una vía conocida como *androgénesis*. Esta engloba un conjunto de rutas, ilustradas en la Figura 5, donde el gametofito masculino inmaduro inicia el desarrollo embriogénico desviándose de su ruta gametofítica original. Estas tres rutas androgénicas existentes difieren en la etapa de inducción, pero todas ellas resultan en el mismo producto haploide o DH final (Seguí-Simarro, 2010b).

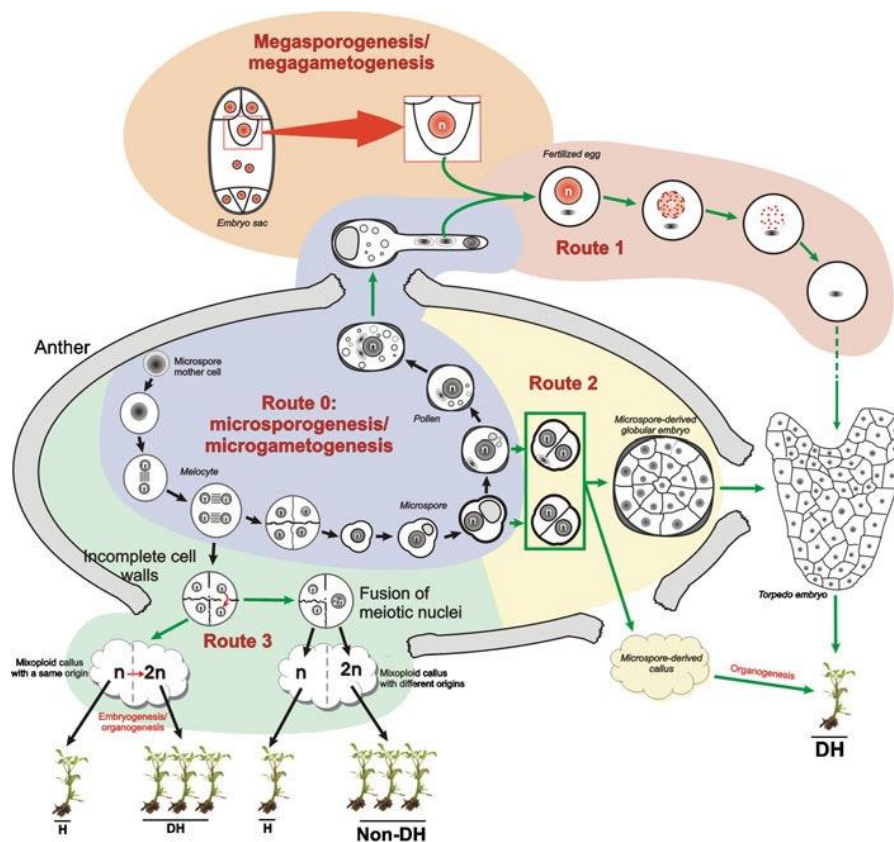


Figura 5. Rutas androgénicas alternativas al desarrollo gametofítico del polen o de la microspora (Ruta 0, microgametogénesis/ microsporogénesis). Ruta 1: consiste en la fecundación y la posterior inactivación del núcleo femenino en la célula huevo. Ruta 2: desviación de la microspora vacuolada o del polen bicelular joven hacia la embriogénesis, y en ocasiones hacia la calogénesis. Ruta 3: formación de organismos haploides y dobles haploides (DH), al igual que organismos diploides heterocigóticos, a partir de la calogénesis derivada de meiocitos (Seguí-Simarro, 2010a).

La Ruta 1 fue la ruta capaz de dar lugar a individuos androgénicos en conocerse primero, y la definición original de androgénesis se hizo considerando únicamente a esta. Consiste en la inactivación del núcleo femenino en la célula huevo ya fecundada, antes de la cariogamia, de modo que solo prevalece el núcleo haploide masculino (Figura 5, ruta roja). Este fenómeno de androgénesis espontánea ocurre en muy baja frecuencia en la naturaleza, por lo que presenta un potencial comercial prácticamente nulo (Seguí-Simarro, 2010b).

La Ruta 2 se conoce como la embriogénesis de microsporas, ya que en esta se produce el desvío de la ruta gametofítica normal de la microspora vacuolada o del polen bicelular joven, y se induce *in vitro* la embriogénesis, o en ocasiones la callogénesis (Figura 5, ruta amarilla). Es la ruta más estudiada al tratarse de la herramienta más poderosa y prometedora entre las existentes para la obtención de DHs de forma rápida y económica (Seguí-Simarro, 2010b).

Por último, la Ruta 3 consiste en la inducción de la callogénesis en meiocitos *in vitro*, y la posterior inducción de la embriogénesis u organogénesis del callo generado (Figura 5, fondo verde). Esta ruta posee una gran limitación, y es que los organismos haploides o DHs no son el único producto final, también pueden aparecer diploides heterocigóticos, siendo necesario el análisis individual de cada organismo obtenido. Esto, junto con la baja eficiencia en la obtención de DHs, hace que la mayoría de datos disponibles de esta vía provengan de la investigación del especies extremadamente recalcitrantes, como el tomate, donde no ha sido posible la obtención de DHs por embriogénesis de microsporas (Seguí-Simarro, 2010b).

1.4.4. Ventajas y limitaciones de la androgénesis frente otros métodos

La androgénesis cuenta con diversas ventajas que la convierten en la técnica de elección para la obtención de DHs. En primer lugar, esta técnica es mucho más eficiente que el resto, debido a la elevada cantidad de microsporas/polen que se obtienen de una única yema. Además, el hecho de que su protocolo experimental esté puesto a punto en una gran cantidad de especies la convierte en la técnica preferida. Por otro lado, el número de individuos haploides que duplican de manera espontánea su genoma es muy superior, por lo que en algunos casos no son necesarios tratamientos adicionales para la duplicación cromosómica (Parra-Vega, 2015).

En contraposición, esta técnica también presenta una serie de limitaciones. El principal inconveniente es la existencia de cultivos extremadamente recalcitrantes, como es el caso del tomate, del cual no se ha conseguido desarrollar con éxito protocolos para la inducción de la embriogénesis de microsporas/polen. Por esta razón, se emplea la vía androgénica que consiste en la inducción de callogénesis en meiocitos, cuya eficiencia en la obtención de individuos DHs es considerablemente inferior (Seguí-Simarro *et al.*, 2011). Otras problemáticas de la androgénesis incluyen la generación de embriones con malformaciones o aberrantes (Kim *et al.*, 2008), dificultades para la regeneración de DHs a través de la organogénesis de callos androgénicos (Rivas-Sendra *et al.*, 2015) o la formación de regenerantes desprovistos de clorofila, llamadas "plantas albinas" o albinismo, en cultivos de cereales (Islam y Tuteja, 2012).

1.5. Embriogénesis de microsporas

Como ya se ha mencionado con anterioridad, la embriogénesis de microsporas es la vía androgénica más poderosa para la obtención de haploides y DHs. Esta ruta experimental fue descubierta en la solanácea *Datura innoxia* (Guha y Maheshwari, 1964), y desde este estudio pionero se ha inducido en más de 350 especies. No obstante, no todos los cultivos de interés responden a la inducción de la embriogénesis de manera eficaz, siendo únicamente cuatro los considerados sistemas modelo: la colza (*Brassica napus*), el tabaco (*Nicotiana tabacum*), el trigo (*Triticum aestivum*) y la cebada (*Hordeum vulgare*) (Seguí-Simarro y Nuez, 2008). Esta ruta consiste en la reprogramación inducible del polen o de sus precursores (las microsporas), desviándolos de su ruta original hacia la embriogénesis. Existen dos técnicas para ello: el cultivo de anteras y el cultivo de microsporas aisladas.

1.5.1. Cultivo de anteras *in vitro*

El cultivo de anteras fue la primera técnica en llevarse a cabo por Guha y Maheshwari (1964). Esta comienza con la recolección de yemas florales que contengan en su interior anteras con microsporas en el estadio adecuado. Posteriormente se extraen las anteras y se cultivan en las condiciones requeridas por la especie. Durante el cultivo, las microsporas crecen en el interior de la antera, mientras que esta se degenera y necrosa. Finalmente, las microsporas emergen hacia el exterior en forma de embriones, debido a la falta de espacio en el saco polínico donde llega un momento en que no caben (Seguí-Simarro, 2010b). Existe una modificación de esta técnica, denominada 'shed microspore', donde se estimula a las anteras a deshacerse y liberar sus microsporas generalmente en un medio líquido de alta osmolaridad (Forster *et al.*, 2007).

El cultivo de anteras se ha utilizado con éxito en un gran número de especies, ya que presenta numerosos beneficios. La principal ventaja es su simplicidad (Forster *et al.*, 2007). Además, la presencia de los tejidos de la antera en el cultivo proporciona un ambiente más natural y confortable para las microsporas, secretando al medio sustancias que pueden favorecer el crecimiento y viabilidad de estas. Otra ventaja derivada de la presencia de la antera es que no es necesario refinar al máximo la composición del medio de cultivo empleado, ya que cuenta con el aporte y efecto modulador de la propia antera (Seguí-Simarro y Nuez, 2008; Seguí-Simarro, 2010b).

En contraposición también existen una serie de limitaciones derivadas de la presencia de la antera en el cultivo. A menudo se obtienen regenerantes diploides heterocigóticos provenientes de los tejidos somáticos de la antera (Touraev *et al.*, 2001), hecho que ralentiza el proceso al ser necesaria la evaluación génica de cada regenerante obtenido. El efecto secretor incontrolable de la antera también imposibilita un control completo de las condiciones del cultivo. Finalmente, otra gran limitación es la eficacia, siendo el número de embriones obtenidos por antera cultivada muy bajo (Seguí-Simarro, 2010b).

1.5.2. Cultivo de microsporas aisladas *in vitro*

Como consecuencia de las diversas limitaciones que presenta el cultivo de anteras surge la técnica de cultivo de microsporas aisladas, donde las microsporas son aisladas y cultivadas en medio líquido. Este método es más exigente desde un punto de vista técnico, ya que requiere un equipo mejor y un mayor grado de conocimientos para la eliminación del tejido de antera somática, lo cual limita su aplicación a un rango de especies más estrecho (Germanà, 2011; Seguí-Simarro, 2010b). No obstante, este método es el preferido en aquellas especies donde se ha optimizado debido a que presenta importantes ventajas, entre ellas un mayor rendimiento en cuanto a la producción de embriones y regeneración de plantas (Seguí-Simarro y Nuez, 2008).

Al eliminar la pared de las anteras se evitan los efectos confusos derivados de sus tejidos, a la vez que se permite un acceso directo y más rápido del medio y los tratamientos de cultivo a las microsporas (Forster *et al.*, 2007). Además, esta metodología ofrece la posibilidad de establecer cultivos de alta densidad de microsporas sincrónicas, siendo un excelente sistema para el estudio de la embriogénesis. Esto ha proporcionado una gran cantidad de información sobre los mecanismos celulares, fisiológicos, bioquímicos y moleculares que subyacen a la embriogénesis de microsporas (Touraev *et al.*, 2001; Germanà, 2011).

1.5.3. Factores que influyen en la reprogramación de la embriogénesis

A la hora de inducir la embriogénesis en microsporas, existen una serie de factores que afectan tanto en los cultivos de anteras como en los de microsporas aisladas:

- Las condiciones de la planta donante, siendo el genotipo la característica más influyente. Evidencia de ello es la existencia de diferentes respuestas entre cultivares, habiendo especies consideradas sistema modelo frente a otras extremadamente recalcitrantes, en las que es especialmente difícil la obtención de DHs. Incluso dentro de una misma especie modelo se observan diferencias según el genotipo, habiendo uno de alta respuesta y otros de nula. Otros factores influyentes de la planta donante son la edad, presentando un mayor potencial androgénico las plantas jóvenes, y las condiciones de crecimiento, donde se incluyen la temperatura, el fotoperíodo y el tipo de cultivo (campo, invernadero o cámara) entre otros (Seguí-Simarro, 2010a).
- Las condiciones de aislamiento e inducción. Dentro de estas es especialmente importante el estadio de desarrollo en el que se encuentran las microsporas en el momento que se ponen en cultivo, considerándose óptimo entorno a la primera mitosis del polen, es decir, los estadios de microspora vacuolada y polen bicelular joven previamente comentados, probablemente debido a su estado transcripcional proliferativo aún no diferenciado totalmente. También afecta el tipo de tratamiento inductor empleado (choque térmico, frío, privación de carbono y/o nitrógeno, estrés osmótico...), el cual debe ser el idóneo y en la cantidad precisa según la especie (Seguí-Simarro, 2010a).
- Las condiciones de cultivo. Estas deben favorecer el crecimiento y desarrollo de la microspora, además de su posterior transformación a embrión. Existen una gran cantidad de aspectos a considerar: el tipo de fuente de carbono, el medio base de vitaminas micro y macronutrientes empleado, la temperatura, las condiciones lumínicas, la densidad del cultivo y las fitohormonas, entre otros (Seguí-Simarro, 2010a).

1.6. Respuesta a estrés en microsporas

1.6.1. Respuesta a estrés en embriogénesis de microsporas

Generalmente, la embriogénesis de microsporas es inducida tras aplicar un factor desencadenante en forma de estrés. Existe una amplia variedad de agentes estresantes, siendo los más empleados calor, frío, privación de glucosa y colchicina (Shariatpanahi *et al.*, 2006). Tras la exposición al tratamiento inductivo, una fracción de la población de microsporas en cultivo, las microsporas receptivas, abandonarán su programa de desarrollo gametofítico y se reprogramarán, adquiriendo totipotencia y competencia embriogénica. Mientras que otras microsporas simplemente detendrán su crecimiento y/o morirán (Testillano, 2018).

Entre aquellas cometidas con la embriogénesis, únicamente una pequeña fracción conseguirá completar el proceso y originar un embrión derivado de microspora (MDE) morfológica y fisiológicamente normal. Para ello, la microspora inducida mediante estrés experimentará una gran cantidad de cambios a diferentes niveles, desde morfológicos hasta de expresión génica. Pero esta inducción no implica únicamente la expresión del programa embriogénico como estrategia de supervivencia, sino también una respuesta celular relacionada con el estrés y una represión del programa gametofítico, para revertir la microspora a un estado totipotente (Seguí-Simarro y Nuez, 2008).

Independientemente del tipo de estrés aplicado, la microspora experimenta una serie de alteraciones morfológicas que incluyen un aumento considerable del tamaño y el reposicionamiento del núcleo en el centro de la célula. Además la gran vacuola se fragmenta dando lugar a porciones más pequeñas (Touraev *et al.*, 2001). También tienen lugar profundos cambios bioquímicos, el pH del citoplasma cambia hacia la alcalinización, hecho que coincide con el aumento de la regulación de los genes que codifican para ATPasa. Otros cambios incluyen variaciones en el plano de la división, que pasa de ser el asimétrico típico de la primera división del polen, a uno simétrico y ecuatorial (Seguí-Simarro y Nuez, 2008). Asimismo, los microtúbulos del fragmoplasto pasan a tener una orientación más paralela y aparece una banda preprofásica ausente en la primera división del polen (Gervais *et al.*, 2000). Todos estos movimientos citoesqueléticos coinciden con la regulación positiva de varios genes relacionados con el citoesqueleto y el tráfico vesicular (Pauls *et al.*, 2006; Hosp *et al.*, 2007).

Además de desencadenar la embriogénesis, el estrés también genera otras respuestas celulares. Una de las más estudiadas es la síntesis y acumulación de proteínas de choque térmico (HSP), en respuesta al calor, la inanición o la colchicina. Otra respuesta a distintos estreses consiste en la producción de ácido abscísico (ABA), responsable de la activación de distintos genes mediante las cascadas de señales de ABA. También se ha observado la regulación de los genes que codifican para la catalasa y la glutatión-S-transferasa en cebada y colza, que cumplen una función protectora contra el estrés oxidativo de las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas en el cultivo (Seguí-Simarro y Nuez, 2008).

Por último, también se observa la supresión del programa gametofítico tras el estrés. Para que esto ocurra es necesaria la inhibición de la síntesis del almidón, lo cual bloquea el desarrollo del polen (Datta *et al.*, 2002). Tras esta supresión, tiene lugar una limpieza citoplasmática de la maquinaria implicada en la gametogénesis, por lo que el citoplasma se aclara y pasa a ser menos denso (Seguí-Simarro y Nuez, 2008).

1.6.2. Respuesta a estrés térmico en embriogénesis de microsporas

Las células a las que se les aplica un estrés en forma de calor leve y subletal inducen una respuesta de choque térmico altamente conservada (Piper, 1993). Este estrés térmico induce un amplio espectro de cambios en células eucarióticas: la represión a gran escala de la síntesis proteica, daños en las proteínas o perturbaciones en las membranas, la inducción de la síntesis de proteínas de choque térmico (HSP), entre otros (Zorinians *et al.*, 2005).

Tras la aplicación del estrés térmico, las microsporas experimentan los cambios morfológicos y la reprogramación génica previamente mencionados. Además, su espectro de proteínas varía notablemente y se sintetizan HSP. El contenido total de proteínas se ve reducido, debido a la degradación de proteínas y a la inhibición de la síntesis proteica después del estrés inductivo, desencadenando el cambio a una nueva ruta de desarrollo (Najafabadi *et al.*, 2015).

La mayoría de las HSP sintetizadas son chaperonas moleculares, que cumplen funciones importantes de plegamiento de proteínas y degradación de moléculas inestables. También participan en la reprogramación de las microsporas, ya que su síntesis interfiere con la de aquellas proteínas implicadas en la diferenciación del polen, bloqueando así el programa gametofítico (Telmer *et al.*, 1993). Asimismo, en *Brassica napus* se ha observado una mayor proporción de HSP70 en aquellas microsporas inducidas frente a las gametofíticas (no inducidas) expuestas al mismo tratamiento estresante, desvelando su implicación en la

embriogénesis de microsporas (Seguí-Simarro *et al.*, 2003). Es posible que las HSP también tengan un papel en la inhibición de la muerte celular en microsporas, ya que estas proteínas tienen una naturaleza altamente conservada y en mamíferos presentan una función antiapoptótica bien establecida. Lo más probable es que se requieran para la supervivencia de las microsporas en condiciones de estrés, mientras que el estrés reprograma las microsporas supervivientes a un desarrollo esporofítico (Zoriniants *et al.*, 2005).

Aparte de la síntesis de HSPs, también se ha sugerido que el estrés térmico tenga influencia sobre el ciclo celular. En microsporas embriogénicas de tabaco, colza y pimiento, inducidas por estrés térmico, se ha observado la presencia de la quinasa Ntf6-MAP, relacionada con la entrada de células inactivas en la división celular y la citoquinesis (Testillano *et al.*, 2000). También se ha observado en estas la presencia de PCNA (antígeno nuclear de célula en proliferación). La aparición de estos componentes relacionados con la señalización del ciclo celular (MAP quinasa) y maquinaria de progresión del ciclo celular (PCNA) sugiere que el estrés térmico puede afectar a las microsporas en uno o ambos niveles del ciclo celular (Zoriniants *et al.*, 2005).

El protocolo ampliamente utilizado para la inducción de microsporas de *Brassica napus* L. en cultivo es un estrés térmico de 32 °C durante 72 h, tras el cual se han observado muchos de los cambios previamente comentados, como el reposicionamiento del núcleo, la reorganización del los microtúbulos y del citoesqueleto y la aparición de la banda preprofásica (Simmonds y Keller, 1999). Otros cambios estructurales detectados son depósitos electrodensos en la interfaz membrana plasmática/pared celular y estructuras similares a las vesículas en las paredes celulares (Telmer *et al.*, 1993). Por último, también se ha visto que tiene lugar la síntesis de diversas HSP, entre las cuales se ha sugerido que HSP70 tiene un papel en la inhibición de la muerte celular (Shariatpanahi *et al.*, 2006), y un aumento en los niveles intracelulares de calcio, debido al aumento de la fluidez de la membrana (Ahmadi *et al.*, 2018).

1.7. Estrés del retículo endoplásmico (RE)

1.7.1. Estrés del retículo endoplásmico en plantas como respuesta al estrés

El estrés del retículo endoplásmico (RE) tiene lugar en plantas sometidas a condiciones ambientales adversas. El RE es el encargado del plegamiento de las proteínas de la ruta secretora, es decir, de todas las proteínas que se encuentran en la pared celular, muchas de las que se encuentran en la membrana plasmática y las que se encuentran en las vacuolas o lisosomas (Liu y Howell, 2010). Estas se pliegan en el interior del RE con ayuda de diversos factores. En caso de no plegarse correctamente, el RE cuenta con un control de calidad "ERQC" (ER Quality Control) para la detección de proteínas mal plegadas, y con un sistema de degradación "ERAD" (ER Associated Degradation system). En condiciones ambientales adversas o de alta demanda proteica, las demandas de plegado de proteínas pueden exceder la capacidad de estos sistemas de plegado y degradación, lo que resulta en un aumento de la carga de proteínas mal plegadas o sin plegar en el RE, generando estrés en este (Howell, 2013).

El estrés del RE puede inducirse por una gran variedad de causas, desde estreses bióticos a abióticos, como son el estrés térmico, la privación de glucosa, aminoácidos u otros nutrientes, la hipoxia o incluso la presencia de auxinas (Fanata *et al.*, 2013; Ruberti y Brandizzi, 2014). En estas condiciones de estrés en las que la demanda de proteínas plegadas excede la capacidad

del sistema, el RE desencadena la UPR (Unfolded Protein Response). La UPR es una respuesta homeostática que trata de aligerar la carga de proteínas mal plegadas afuncionales, así como que la capacidad de plegado y degradación del RE funcione correctamente con la demanda proteica aparecida tras el estrés (Howell, 2013).

En la actualidad, se han descrito dos vías de señalización de la UPR en plantas. La primera de ellas involucra a un factor de transcripción asociado a la membrana del RE (bZIP28), el cual tras sufrir proteólisis es transportado al núcleo. La segunda vía involucra a una proteína de doble función quinasa/ribonucleasa (ARN-splicing factor IRE1) y su ARN objetivo (bZIP60), el cual tras sufrir *splicing* codifica para un factor de transcripción que también viaja al núcleo. Una vez en el núcleo, ambos factores regularán la expresión de genes implicados en la UPR (Howell, 2013).

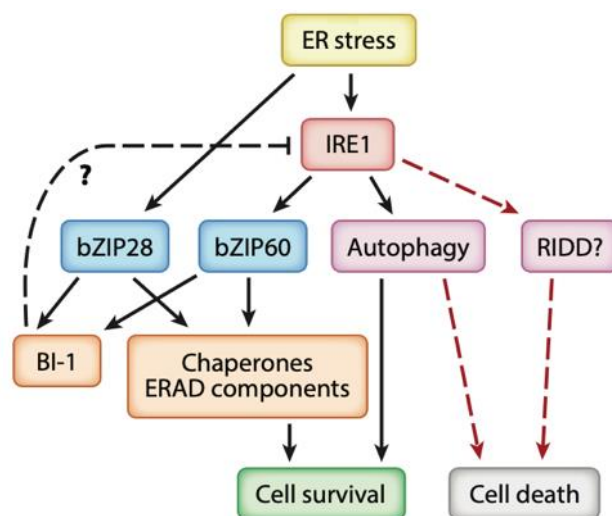


Figura 6. Posibles vías por las que el estrés del retículo endoplásmico (RE) conduce a la supervivencia o muerte celular. El estrés del RE activa a IRE1 y a bZIP28. IRE1 es responsable del *splicing* del ARNm de bZIP60, tras el cual codifica para un factor de transcripción activo. bZIP28 y bZIP60 regulan los genes implicados en la respuesta al estrés del RE, codificando para chaperonas, componentes del sistema de degradación asociado al RE (ERAD), así como otros factores implicados en el plegamiento proteico. Todos estos, junto con la autofagia (también activada por IRE1), restablecen la homeostasis, contribuyendo a la supervivencia celular. Asimismo, bZIP28 y bZIP60 también son responsables de la síntesis de BI-1, que regula negativamente a IRE1 en modelos animales. En condiciones severas de estrés del RE, tiene lugar la muerte celular por mecanismos menos definidos, como una autofagia masiva. En condiciones severas de estrés en animales, se cree que IRE1 es responsable de la degradación de los ARNm de los ribosomas unidos a la membrana del RE, proceso conocido como RIDD (IRE1-dependent decay). Las líneas discontinuas indican los pasos más especulativos; las líneas discontinuas rojas aquellas actividades que ocurren bajo un estrés severo del RE (Howell, 2013).

En un primer lugar, la UPR consistirá en reducir la traducción de proteínas, excepto de chaperonas implicadas en el plegamiento proteico en el RE, cuya síntesis aumentará. Asimismo, la degradación de proteínas asociadas al ER también aumentará (Yang *et al.*, 2016). La proteína BiP (Binding Immunoglobulin Protein) es una de las chaperonas más abundantes en el lumen del RE y cuyas síntesis aumenta con el estrés. Se trata de una proteína de choque térmico HSP70, encargada de evitar la agregación de las proteínas nacientes en el RE, que al tener superficies hidrofóbicas expuestas son vulnerables a la agregación (Howell, 2013; Yang *et al.*, 2016).

Si esto no resulta suficiente para reducir el estrés en el RE, la siguiente estrategia para reducir la carga de proteínas mal plegadas empleada por la UPR será la autofagia. Ésta es una vía

universal de degradación en todos los eucariotas, incluidas las plantas. Consiste en el secuestro de componentes citoplasmáticos en una estructura de doble membrana denominada autofagosoma, que se fusiona con la vacuola para su degradación (Liu y Bassham, 2012). Bajo condiciones de estrés en el RE, la autofagia es activada por IRE1 y procede a la eliminación de cisternas enteras del RE, incluyendo las proteínas mal plegadas de su interior (Liu *et al.*, 2012).

Por último, aparte del papel de pro-supervivencia de la autofagia durante el estrés en el RE, esta también ha sido reportada como iniciador y/o ejecutor de la muerte celular (Figura 6). La autofagia se trata de un intento por salvar la célula, pero en caso de estrés severo y/o prolongado puede llegar a inducir la muerte celular. Esta muerte celular programada recibe el nombre de muerte celular vacuolar, en la cual los componentes internos de la célula son autofagocitados en la vacuola, lo que lleva a la ruptura del tonoplasto y a la liberación de las enzimas hidrolíticas vacuolares (Howell, 2013).

1.7.2. Inhibidores del estrés en el retículo endoplásmico

En la actualidad existe una gran diversidad de compuestos con la capacidad de modular el estrés en el RE, favoreciendo la supervivencia celular bajo estas condiciones de estrés. Uno de estos compuestos es el TUDCA o ácido tauroursodeoxicólico, una chaperona química capaz de inhibir el estrés del RE, al estabilizar las proteínas sin plegar y prevenir su agregación. Consecuentemente, disminuye la acumulación de proteínas mal plegadas, previniendo así la inducción de la autofagia. En modelos de ratón con aneurisma aórtico abdominal, se ha notificado que la aplicación de TUDCA reduce la expresión de marcadores asociados al estrés del RE, además de reducir significativamente la expresión de moléculas de apoptosis, como la caspasa-3 y la caspasa-12 (Qin *et al.*, 2017). En *Arabidopsis thaliana* también se ha observado que su aplicación disminuye la cantidad de autofagosomas generados, al reducir la cantidad de proteínas mal plegadas (Yang *et al.*, 2016).

Otro compuesto con capacidad de inhibir el estrés del RE es el DHA o ácido docosahexaenoico, un ácido graso omega-3 (22:6 ω 3) presente en abundancia en el cerebro y la retina. Es un componente esencial de los fosfolípidos de membrana, implicado en el mantenimiento del orden y fluidez de la membrana, y en la regulación de las oscilaciones de calcio mediante la liberación o captación de este. Se cree que el RE actúa como almacén dinámico de calcio intracelular, manteniendo así su homeostasis. Las chaperonas implicadas en el plegamiento proteico requieren un nivel óptimo de calcio para funcionar, por lo que la alteración de la homeostasis de este provoca un aumento potencial de proteínas sin plegar o mal plegadas, generando estrés en el RE. El DHA, al tener la capacidad de regular el calcio celular, es capaz de inhibir el estrés del RE derivado de la alteración de la homeostasis de este (Begum *et al.*, 2013). En modelos de ratón con lesión cerebral traumática, donde la homeostasis del calcio se ve alterada al disminuirse los niveles, se ha observado que la aplicación de DHA reduce el estrés del RE y la formación de agregados de proteínas mal plegadas (Begum *et al.*, 2014).

1.7.3. Estrés en el retículo endoplásmico en microsporas embriogénicas

Las causas responsables del estrés en el RE que desencadenan la UPR coinciden enormemente con aquellas de la inducción de embriogénesis en microsporas, que son estreses bióticos o abióticos como el estrés térmico, la hipoxia, la privación de glucosa, aminoácidos u otros nutrientes, o distintas hormonas (Shariatpanahi *et al.*, 2006). Asimismo, muchas de las consecuencias derivadas de la activación de la UPR también se dan durante la embriogénesis

de microsporas: reducción de la síntesis de proteínas en general, aumento de la síntesis de proteínas implicadas en el estrés y chaperonas moleculares, entre ellas HSPs, así como la activación de la autofagia e incluso la inducción de la muerte celular programada.

Esta sincronía, junto con la observación en muestras de microsporas embriogénicas de cisternas del retículo endoplásmico rugoso densas y engrosadas, con lo que podrían ser agregados de proteínas mal plegadas en su interior, plantea la posibilidad de que el estrés en el RE afecte a la eficiencia en los cultivos de microsporas y que la aplicación de compuestos inhibidores del estrés del RE como son TUDCA o DHA aumente la cantidad de microsporas embriogénicas inducidas en cultivo *in vitro*.

1.8. Desacetilasas de histonas (HDAC)

1.8.1. Papel de la acetilación de histonas en la embriogénesis de microsporas

El nucleosoma es la unidad estructural y funcional básica de la cromatina, está compuesto por un octámero de histonas envuelto por DNA. Esta estructura puede suponer una barrera física, restringiendo el acceso de proteínas no histónicas al DNA, a causa de la fuerte interacción entre las histonas cargadas positivamente y el DNA cargado negativamente. Para que la transcripción ocurra es necesaria la unión física de los factores de transcripción que abren la doble hebra de DNA. Consecuentemente, a través de la regulación de la compactación y accesibilidad del DNA de los nucleosomas, es posible el control de la expresión génica. Aquellas regiones cuyos genes no se están expresando se encuentran bien compactadas, siendo necesaria la descompactación para activar su transcripción. Estos cambios dinámicos en la estructura de la cromatina están mediados de dos maneras: (1) mediante la remodelación de la cromatina por parte de proteínas que emplean ATP para eliminar/reposicionar los nucleosomas, (2) mediante la modificación de las histonas, en sus lisinas (Lys) o en otros aminoácidos de las colas N-terminales que quedan expuestas, cambiando su carga y su interacción con el DNA (Li *et al.*, 2014).

Una de las modificaciones de las histonas consiste en la acetilación de las lisinas, lo que resulta en la transcripción activa de genes al descompactarse la cromatina. Los residuos de lisina N-terminal de las histonas H3 y H4 son acetilados por diferentes histona acetiltransferasas (HAT). Estas enzimas contribuyen en muchos procesos de desarrollo y adaptación de las plantas, en acción combinada con las desacetilasas de histonas (HDAC), que realizan la acción contraria, compactando la cromatina e inhibiendo la expresión génica (Testillano, 2018).

La acetilación de las histonas se ha notificado como modulador del estado totipotente de las células y de la reprogramación celular durante la embriogénesis de microsporas inducida por estrés (Testillano, 2018). Esta acetilación es responsable de una configuración descondensada de la cromatina, considerada como una característica fundamental de las células totipotentes vegetales pudiendo conferirles la capacidad de cambiar rápidamente a un nuevo programa de transcripción tras su inducción. En *Brassica napus* se han notificado altos niveles de H3Ac y H4Ac en la microspora vacuolada, una célula totipotente con capacidad de reprogramación y reentrada en el ciclo celular tras la inducción. Esta evidencia apoya el efecto modulador de la acetilación de histonas durante la embriogénesis (Rodríguez-Sanz *et al.*, 2014).

1.8.2. Inhibidores de las desacetilasas de histonas

La aplicación de inhibidores de las desacetilasas de histonas o iHDAC, resulta en una hiperacetilación de las histonas que conforman la cromatina, al inhibir la eliminación de los grupos acetilo de los residuos de lisina (Garnock-Jones, 2015). Esta acetilación debilita la interacción entre las histonas y el DNA, relajando la cromatina y permitiendo la transcripción de genes que se encontraban inactivos anteriormente. Uno de estos compuestos inhibidores es el Panobinostat, un análogo del ácido hidroxámico cinámico. La FDA ha aprobado su uso en mieloma múltiple como tratamiento combinado con otros fármacos. Su acción antitumoral se basa en activar genes supresores de tumores que se encontraban epigenéticamente silenciados (Laubach *et al.*, 2015).

Otro compuesto es el iHDAC Cocktail, una combinación sinérgica de productos químicos diseñada para preservar el estado de acetilación. Este cóctel cuenta con los inhibidores de desacetilasas: Tricostatina A (40 μ M), EX-527 (1 mM), Nicotinamida (400 mM), y Butirato de Sodio (200 mM), solubilizados en un 70% de DMSO. Cada uno de estos presenta propiedades inhibitorias específicas. La Tricostatina A inhibe HDAC de clase I/II. El EX-527 inhibe a SIRT1, una proteína de la clase de las sirtuinas con actividad desacetilasa. La nicotinamida inhibe a HDAC de clase III, y el butirato de sodio a las HDAC de clase I/II. No hay estudios respecto a su aplicación en ningún sistema, no obstante, es posible que este tenga un efecto positivo en la embriogénesis de microsporas.

1.8.3. Inhibidores de las desacetilasas de histonas en la embriogénesis de microsporas

Recientemente se ha observado que el bloqueo de la actividad de las HDACs mediante un inhibidor en el cultivo de gametofitos masculinos inmaduros lleva a un aumento considerable de la proporción de células que pasan de un desarrollo gametofítico a uno embriogénico. Las HDAC juegan por tanto un papel importante en el control de la progresión del ciclo celular durante el desarrollo de los gametofitos masculinos, y su inhibición provoca un cambio a un nuevo programa de desarrollo (Li *et al.*, 2014).

En cultivo de microsporas de *Brassica napus* inducidas por estrés térmico, se ha demostrado que la aplicación del inhibidor de HDACs Tricostatina A o TSA es capaz de aumentar el rendimiento del cultivo, obteniendo una mayor cantidad de embriones. Mientras que en *Arabidopsis thaliana*, especie recalcitrante a la embriogénesis de microsporas, se ha observado que este compuesto es capaz de inducir totipotencia en las microsporas pero no es suficiente como para la diferenciación de embriones (Li *et al.*, 2014). El TSA también ha sido empleado con éxito en *Brassica rapa*, donde ha aumentando la eficiencia del cultivo (Zhang *et al.*, 2016).

Precisamente, la Tricostatina A es uno de los inhibidores presentes en el compuesto iHDAC Cocktail previamente mencionado. Sin embargo, tanto el papel de este último, así como el del Panobinostat, no han sido estudiados en la embriogénesis de microsporas. Es posible que estos inhibidores de HDACs sean capaces de aumentar el número de microsporas embriogénicas, tal como ocurre con el compuesto más ampliamente estudiado TSA. Por consiguiente, es necesario el estudio de estos compuestos, pudiendo proporcionar un resultado prometedor para la obtención de DHs mediante la embriogénesis de microsporas.

2. OBJETIVOS

El presente trabajo tiene por objeto estudiar el efecto de los inhibidores de estrés del retículo endoplásmico (RE) y los inhibidores de las desacetilasas de histonas (iHDAC) en la embriogénesis de microsporas de una especie modelo como es la colza, y en berenjena. Para ello, se plantean los siguientes objetivos:

- Estudiar los efectos de los inhibidores del estrés del RE: TUDCA y DHA en la eficiencia de obtención de embriones (colza) y callos (berenjena) derivados del cultivo de microsporas *in vitro*. Determinar la concentración óptima y el periodo de aplicación de cada uno de los compuestos.
- Estudiar los efectos de los iHDACs: Panobinostat y iHDAC Cocktail en la eficiencia de obtención de embriones (colza) y callos (berenjena) derivados del cultivo de microsporas *in vitro*. Determinar la concentración óptima y el periodo de aplicación de ambos compuestos.

El objetivo final de este estudio es aumentar la eficiencia de obtención de DHs derivados de la embriogénesis de microsporas *in vitro* mediante la aplicación de estos compuestos inhibidores.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Colza

3.1.1. Material vegetal y condiciones de cultivo

Para realizar el presente estudio se emplearon plantas de *Brassica napus L.* con el genotipo DH12075. Se trata de una línea DH de baja respuesta embriogénica, empleada con frecuencia en estudios genómicos y de mejora genética vegetal (Corral-Martínez *et al.*, 2020).

Las plantas de colza fueron cultivadas en una cámara de crecimiento a 20 °C, cuya humedad relativa era del 60-65%, la intensidad lumínica de 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ y con un fotoperiodo de 16 h. Cuando empezó la floración de las plantas, fueron trasladadas a otra cámara con las mismas condiciones, excepto la temperatura que pasó a ser de 15 °C, para favorecer la respuesta embriogénica de la planta. Tras una semana a 15 °C y la primera floración, ya es posible su empleo. Se mantuvieron en floración continua eliminando las flores abiertas y los frutos.

3.1.2. Selección yemas florales para el cultivo de microsporas

Las microsporas atraviesan diversos estadios de desarrollo hasta convertirse en polen. Sin embargo, no todos presentan la misma respuesta androgénica, siendo los estadios de microspora vacuolada y de polen bicelular joven los más idóneos para la inducción de embriogénesis. En el interior de las anteras de las yemas se encuentran las microsporas, de modo que la selección del tamaño de yema es importante para el posterior cultivo de microsporas, existiendo una relación entre la longitud de la yema y el estadio de desarrollo en el que se encuentran sus microsporas. Las yemas jóvenes presentan estadios iniciales del desarrollo, mientras que yemas maduras presentan estadios más avanzados. No obstante, esta relación entre la longitud de yema y el estadio de las microsporas depende a su vez del genotipo, del estadio de desarrollo de la planta y de las condiciones ambientales en las que se encuentra. Con el fin de conseguir la máxima homogeneidad del estadio de desarrollo de las microsporas en cultivo, y conseguir una máxima eficiencia de la inducción de embriogénesis, se seleccionaron yemas en base a dos intervalos no solapantes: de 2,4 a 2,7 mm y de 2,7 a 3,0 mm (cada intervalo incluye el valor inferior y excluye el valor superior), y se llevó a cabo el cultivo en paralelo de las microsporas aisladas de ambos tamaños.

3.1.3. Cultivo de microsporas de colza

El cultivo de microsporas se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Corral-Martínez *et al.* (2020) con ligeras modificaciones. Las yemas se obtuvieron de las plantas de colza localizadas en los invernaderos y se introdujeron en una bolsa de plástico en hielo. Una vez en el laboratorio, estas se clasificaron en los dos rangos establecidos (Apartado 3.1.3) con la ayuda de una lupa binocular con micrómetro. Durante el proceso de selección se mantuvieron las yemas en hielo sobre dos placas de Petri, en función de su tamaño. Una vez realizada la división, cada uno de los tamaños se introdujo en un filtro de té (Figura 7.A). El resto del protocolo se desarrolló en la cabina de flujo laminar en condiciones de esterilidad.

Una vez en la cabina previamente desinfectada, y con el material a emplear a 4 °C, se procedió a la desinfección de las yemas. Se sumergieron los filtros de té con las yemas contenidas en su interior en una solución de etanol al 70% durante 30 s, después en una solución de 4 g/l de hipoclorito sódico durante 10 min, y finalmente en agua destilada estéril durante 5 min en cada uno de los tres recipientes con agua destilada estéril para dicho efecto (Figura 7.B).

Tras la desinfección, se dejaron secar los filtros de té sobre papel Whatman estéril (Figura 7.C). Mientras tanto se prepararon dos vasos de precipitados de 50 ml, a los cuales se les introdujeron 10 ml de medio de aislamiento y lavado (solución de sacarosa al 13% en agua destilada, pH=5.8). Una vez secos los filtros, se introdujeron las yemas en cada uno de los dos vasos de precipitado. Con un émbolo de jeringuilla se machacaron las yemas, permitiendo la extracción de sus microsporas (Figura 7.D). La suspensiones de microsporas resultantes se pasaron a través de un filtro de nylon de 41 µm y se recogieron en tubos de plástico estériles de 15 ml (Figura 7.D). Se centrifugaron a 870 rpm durante 4 min a 4 °C, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet de microsporas con 15 ml de medio de aislamiento y lavado (Figura 7.E). Se realizaron tres repeticiones de este proceso de centrifugación-lavado.

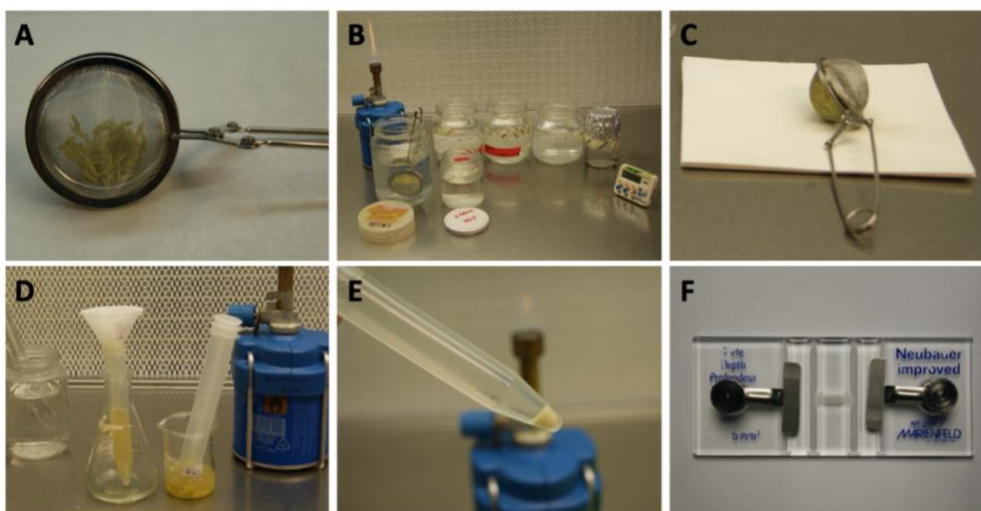


Figura 7. Procedimiento para el aislamiento de microsporas *in vitro*. A) Yemas florales/anteras introducidas en el filtro de té. B) Material para la desinfección: hipoclorito 4 g/l y etanol 70% (al frente), tres botes de agua destilada estéril (al fondo). C) Filtro de té secándose sobre papel Whatman. D) Yemas florales/anteras machacadas con un émbolo de jeringuilla (derecha) y filtro nylon de 41 µm sobre un tubo de plástico de 15 ml para la recolección de las microsporas (izquierda). E) Pellet obtenido tras la centrifugación. F) Cámara Neubauer para el recuento celular.

Tras realizar la tercera y última centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las microsporas purificadas en 1 ml de medio de cultivo (Tabla 4). De este volumen, se tomó una alícuota de 40 µl para calcular la concentración de microsporas con la cámara Neubauer (Figura 7.F). La densidad de microsporas óptima para el cultivo es de 40.000 microsporas/ml (Huang et al., 1990), de modo que tras conocer la concentración de la solución de microsporas purificadas, se ajustó el volumen de esta añadiendo medio de cultivo hasta alcanzar dicha concentración. La ecuación para conocer el volumen final necesario es la siguiente:

$$\text{Volumen de medio} = \frac{n^{\circ} \text{ de microsporas} \times 5 \text{ cuadrículas} \times \text{volumen en el que se encuentran (1 ml)}}{40.000 \text{ microsporas/ml} \times \text{volumen de la cámara (0,0001 ml)}}$$

Tabla 4. Composición medio de cultivo NLN13 para microsporas de colza.

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

Una vez obtenida la concentración deseada en ambos tamaños, se prepararon para cada uno de ellos tubos de plástico estériles de 15 ml con 6 ml de la solución de microsporas purificadas. Posteriormente, en estos tubos se reprodujeron las distintas condiciones a estudiar según el compuesto a aplicar (Tabla 5). Dichos compuestos fueron adquiridos en MedChemExpress®.

Tabla 5. Condiciones estudiadas según compuesto en ambos tamaños de microsporas.

Compuesto	Condiciones						
TUDCA	Control	0,05 nM	0,5 nM	5 nM	50 nM	100 nM	500 nM
DHA	Control	0,1 uM	1 uM	10 uM	100 uM	500 uM	-
Panobinostat	Control	0,5 nM	5 nM	50nM	500nM	5000 nM	-
iHDAC Cocktail	Control	0,0001x	0,001x	0,01x	-	-	-

En aquellos compuestos cuyo modo de aplicación fue continuo, tras añadir a los tubos el tratamiento correspondiente a cada condición, se procedió a plaquear los 6 ml de cada uno de ellos en seis placas de Petri de 1 ml. Estas fueron selladas con parafilm y depositadas durante 3 días seguidos en la incubadora a 32,5 °C y completa oscuridad. Trascorridos estos, se trasladaron a la cámara a 25 °C en oscuridad, donde permanecieron durante un mes.

En aquellos compuestos cuyo modo de aplicación fue de 24 horas o de 72 horas, tras añadir el tratamiento en la cantidad requerida para cada condición, los tubos se sellaron y se depositaron horizontalmente en la incubadora a 32,5 °C y completa oscuridad. Trascorridas las 24/72 horas correspondientes, los tubos se centrifugaron a 870 rpm durante 4 min a 25 °C y se eliminó el sobrenadante, eliminando así el medio con tratamiento. El pellet resultante se resuspendió con el mismo volumen (6 ml) de medio de cultivo fresco (Tabla 4) sin adicionarse tratamiento. Posteriormente se distribuyeron los 6 ml pertenecientes a cada una de las condiciones estudiadas en seis placas Petri de 1 ml y se cerraron con parafilm. En el caso de 72 horas de aplicación, las placas se depositaron directamente en la cámara de 25 °C, mientras que en el caso de 24 horas se mantuvieron durante 48 horas más en la incubadora a 32,5 °C y posteriormente se pasaron también a la cámara de 25 °C donde permanecieron un mes.

3.2. Berenjena

3.2.1. Material vegetal y condiciones de cultivo

En el presente estudio se emplearon plantas de con el genotipo DH36, una línea doble haploide con una alta respuesta androgénica. Esta línea fue originada a partir de plantas donantes de berenjena de cv. Bandera, un híbrido comercial F1 de Seminis Vegetable Seeds Ibérica S.A., que ha demostrado una buena respuesta androgénica. La línea generada DH36 es notablemente similar al híbrido donante Bandera en términos de morfología y capacidad reproductiva, pero es capaz de producir cuatro veces más callos (Rivas-Sendra *et al.*, 2017).

Las plantas de berenjena fueron cultivadas en una cámara idéntica a la inicial de colza, pero cuando alcanzaron los 10-15 cm de altura se trasladaron al invernadero a 20-25 °C bajo luz natural. Las plantas fueron regularmente podadas, al igual que se descartaron con frecuencia las flores abiertas y los frutos con el fin de mantener la floración de la planta, necesaria para la obtención de yemas florales para el cultivo.

3.2.2. Selección de anteras para el cultivo de microsporas

El cultivo de microsporas de berenjena se realiza directamente a partir de las anteras localizadas en el interior de las yemas, evitándose así problemas de contaminación, por lo que resulta necesario la selección de aquellos tamaños de antera que presentan los estadios de microspora vacuolada y polen bicelular joven. En el caso de la berenjena DH36, estos estadios se encuentran mayoritariamente en anteras cuya longitud se encuentra entre 5,2 a 5,9 mm, por lo que se seleccionaron anteras de dicho intervalo para conseguir la máxima eficiencia. La extracción de la antera se realizó con ayuda de un bisturí y una vez extraídas se midió su tamaño con un calibre digital, escogiéndose aquellas que presentaban el tamaño adecuado.

3.2.3. Cultivo de microsporas de berenjena

El cultivo de microsporas se realizó siguiendo el protocolo descrito por Corral-Martínez y Seguí-Simarro (2012). Este presenta una gran similitud con el de colza previamente explicado, por lo que se indican únicamente sus diferencias a continuación:

- Las microsporas fueron aisladas en agua destilada estéril, por lo que las tres repeticiones de centrifugación-lavado se llevaron a cabo con esta, así como la resuspensión en 1 ml.
- La densidad de microsporas óptima para el cultivo en el caso de la berenjena es de 200.000 microsporas/ml. Se empleó la ecuación anterior modificando dicho valor para calcular el volumen final de agua necesario.
- Se estudiaron tres de los compuestos en las concentraciones indicadas en la Tabla 6.
- Trascurridas las 72 h en la estufa, se centrifugó y reemplazó el agua por medio de cultivo de berenjena (Tabla 7).

Tabla 6. Condiciones estudiadas según compuesto aplicado al cultivo de berenjenas.

Compuesto	Condiciones			
TUDCA	Control	5 nM	50 nM	-
Panobinostat	Control	50 nM	500 nM	5000 nM
iHDAC Cocktail	Control	0,00001X	0,0001X	0,001X

Tabla 7. Composición medio de cultivo NLN2 para microsporas de berenjena.

Componente	Concentración (g/l)
NLN Base Salt Mixture	0,39
NLN Base Vitamin Mixture	1,04
Sacarosa	20
NAA	0,0005
BAP	0,0005

3.3. **Análisis estadísticos**

En todos los análisis realizados se emplearon los resultados de al menos cuatro placas de cultivo para calcular la media y la desviación estándar. Los análisis estadísticos realizados fueron el test paramétrico ANOVA simple y el test post-hoc de Tukey. Se usó el programa informático *GraphPad Prism 8*. El valor de significación estadística empleado para todos los análisis fue de 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. Cultivo microsporas de colza

4.1.1. Embriogénesis de microsporas en cultivo de colza

Las microsporas de colza en cultivo experimentaron una gran cantidad de cambios desde su aislamiento (Figura 8.A) a lo largo de su desarrollo. Transcurridos 3 días desde la inducción del cultivo, se observaron microsporas ya comprometidas con la ruta esporofítica, que habían sufrido las primeras divisiones simétricas (Figura 8.B, flecha), mientras que otras microsporas simplemente detuvieron su desarrollo y/o murieron, o continuaron con el desarrollo gametofítico. Tras la primera semana, ya se visualizaron embriones globulares (Figura 8.C), los cuales se transformaron en embriones con forma de corazón (Figura 8.D), y posteriormente en embriones torpedo (Figura 8.E). Después de dos semanas, estas estructuras dieron lugar a embriones cotiledonares (Figura 8.F).

Con el propósito de estudiar los efectos de los distintos compuestos inhibidores del estrés del RE (TUDCA y DHA) o de las HDACs (Panobinostat e iHDAC Cocktail) en la eficiencia del cultivo *in vitro* de microsporas embriogénicas de colza, se llevó a cabo un total de 13 cultivos de ambos tamaños de yema floral en paralelo. En ellos se contabilizaron mediante una lupa binocular el número de MDEs obtenidos en placa (Figura 8.G) transcurrido un mes a 25 °C desde la inducción de las microsporas.

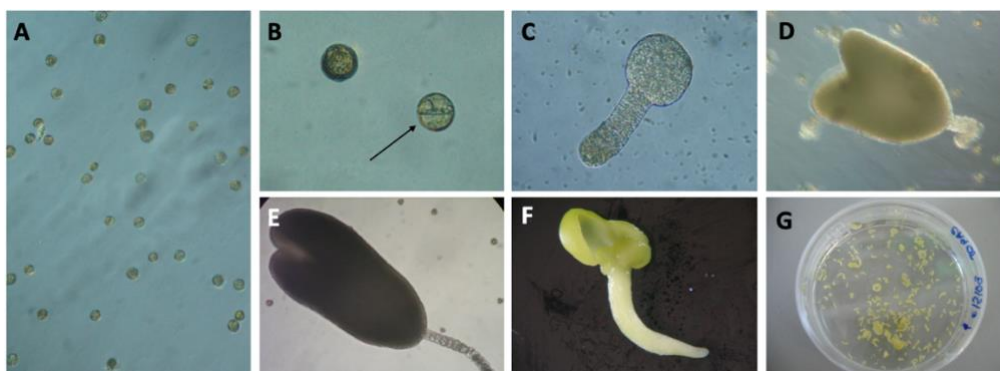


Figura 8. Embriogénesis de microsporas de *Brassica napus* L. A) Microsporas frescas recién aisladas. B) Microspora esporofítica (flecha) en la primera división embriogénica y microspora no inducida. C) Embrión globular con suspensor. D) Embrión con forma de corazón con suspensor. E) Embrión torpedo con suspensor. F) Embrión cotiledonar. G) Placa de cultivo con la mayoría de MDEs (Microspore-Derived Embryos) en el estadio torpedo o cotiledonar.

4.1.2. Efecto de los inhibidores del estrés del retículo endoplásmico en la embriogénesis de microsporas de colza

Con el propósito de estudiar el efecto del compuesto TUDCA en el cultivo de microsporas de colza se llevaron a cabo cuatro cultivos con distintas concentraciones. En cada uno de ellos se analizó el efecto de dicho compuesto en los dos tamaños de yemas florales seleccionados: 2,4-2,7 mm y 2,7-3,0 mm. El compuesto se aplicó de manera continua en tres de los cultivos y durante 72 horas en otro de ellos. Se calculó el valor medio de embriones generados por placa y el error estándar de cada condición a partir de una media de cuatro placas Petri de cultivo. Mediante el test ANOVA se estudió la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre medias, y finalmente se realizó el test de Tukey para establecer dichas diferencias.

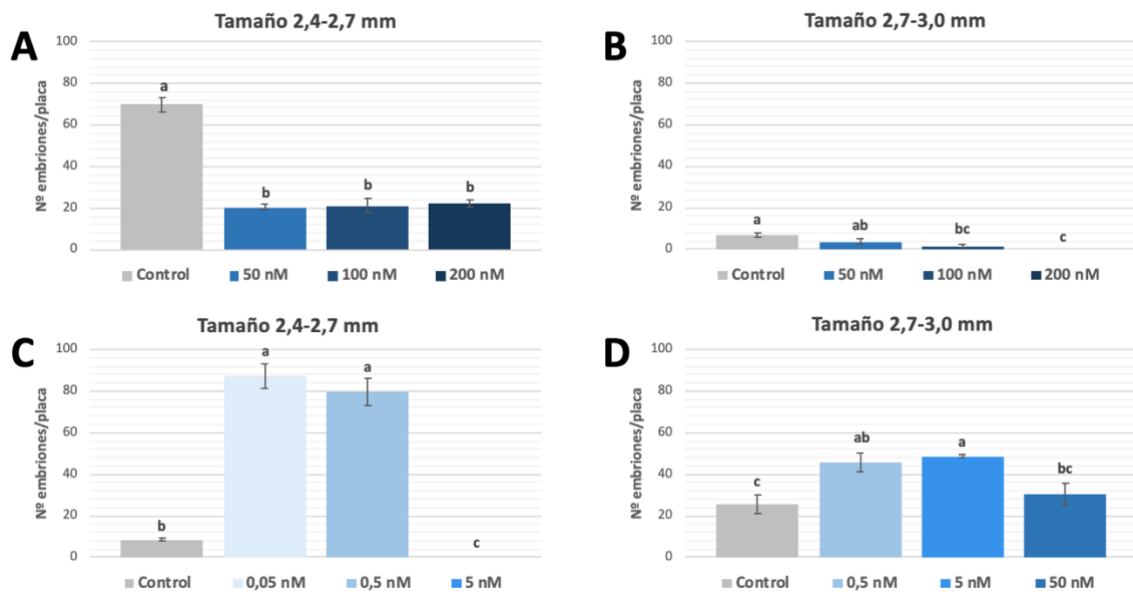


Figura 9. Efecto del TUDCA con aplicación continua en el número de embriones de colza obtenidos. A) Cultivo 1 para el tamaño 2,4-2,7 mm de yema. B) Cultivo 1 para el tamaño 2,7-3,0 mm de yema. C) Cultivo 2 para el tamaño 2,4-2,7 mm de yema. D) Cultivo 3 para el tamaño 2,7-3,0 mm de yema. Cada columna representa el valor medio de embriones obtenidos por placa y las barras indican el error estándar correspondiente. Las distintas letras indican las diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al test ANOVA y posterior test de Tukey con un $p \leq 0.05$.

Los resultados del primer cultivo se muestran en la Figura 9.A y 9.B según el tamaño de yema empleado para el cultivo. En este se estudiaron las concentraciones 50, 100 y 200 nM. En ambos tamaños de yema, se observa una disminución en el número de embriones resultantes tras la aplicación de estas tres concentraciones de TUDCA. Por lo que ninguna de las concentraciones ensayadas en este primer cultivo supuso una mejora en la respuesta del cultivo frente al control, y se procedió a analizar concentraciones más diluidas de compuesto.

En el siguiente cultivo se analizaron las concentraciones de TUDCA de 0,05, 0,5 y 5 nM, pero solo se obtuvieron resultados para el tamaño de yema más pequeño (Figura 9.C), ya que el tamaño mayor se contaminó. En este cultivo se observó un aumento muy pronunciado en el número de embriones obtenidos tras la aplicación de TUDCA 0,05 nM y 0,5 nM. La aplicación de estas dos concentraciones supone una clara mejora en la respuesta del cultivo frente al control sin tratamiento, pero no existen diferencias estadísticamente significativas entre estas dos concentraciones. En el caso de 5 nM, no se obtuvo desarrollo embriogénico alguno, por lo que se consideró que seguía siendo demasiado concentrada para este tamaño de yema.

En el tercer cultivo se estudiaron las concentraciones de 0,5, 5 y 50 nM. El cultivo del tamaño 2,4-2,7 mm se contaminó, por lo que únicamente se presentan los resultados del tamaño 2,7-3,0 mm (Figura 9.D). En este tamaño de yema, la aplicación de TUDCA 0,5 y 5 nM duplicaron el número de embriones generados frente al control, siendo la respuesta embriogénica de 5 nM ligeramente superior a la de 0,5 nM. Entre estas dos concentraciones no existen diferencias significativas, pero sí con el control, mientras que TUDCA 50 nM no presenta diferencias significativas con el control.

De entre las concentraciones analizadas en el tamaño de yema 2,4-2,7 mm, fueron las concentraciones de 0,05 y 0,5 nM con las que se obtuvo una mejora considerable en la eficiencia de la embriogénesis de microsporas. No obstante, sería aconsejable seguir disminuyendo la concentración de TUDCA hasta establecer la aplicación óptima, ya que se ha

visto una clara mejora en la respuesta del cultivo tras reducir las primeras concentraciones probadas que resultaron inefectivas. En el caso del tamaño de 2,7-3,0 mm, fueron las concentraciones de 0,5 y 5 nM las que aumentaron la eficiencia del cultivo significativamente. Sin embargo, también sería necesario evaluar el efecto de concentraciones de TUDCA cercanas a estas con el fin de determinar la concentración óptima para este tamaño de yema floral.

Finalmente, también se probó una aplicación durante 72 horas de TUDCA con las concentraciones más diluidas con la que se había obtenido una mejora en la respuesta embriogénica del cultivo en aplicación continua (0,05, 0,5 y 5 nM). Sin embargo, no se obtuvo ningún tipo de mejora con ninguna de las concentraciones frente al control. Todas ellas presentaron un desarrollo embriogénico significativamente inferior al control para ambos tamaños de yema floral, sugiriendo que es necesaria una aplicación continua TUDCA para aumentar la eficiencia del cultivo.

Para el estudio del compuesto DHA, se llevaron a cabo cuatro cultivos de ambos tamaños de yema floral en paralelo. En ellos se analizaron las concentraciones de 10, 100 y 500 μM con una aplicación continua y de 72 horas, y las concentraciones 0,1, 1 y 10 μM también con ambos tipos de aplicación. A partir de una media de cuatro placas de cultivo de cada condición, se procedió a calcular la media y el error estándar para cada una de las condiciones del cultivo, y posteriormente se realizaron los test estadísticos ANOVA y Tukey.

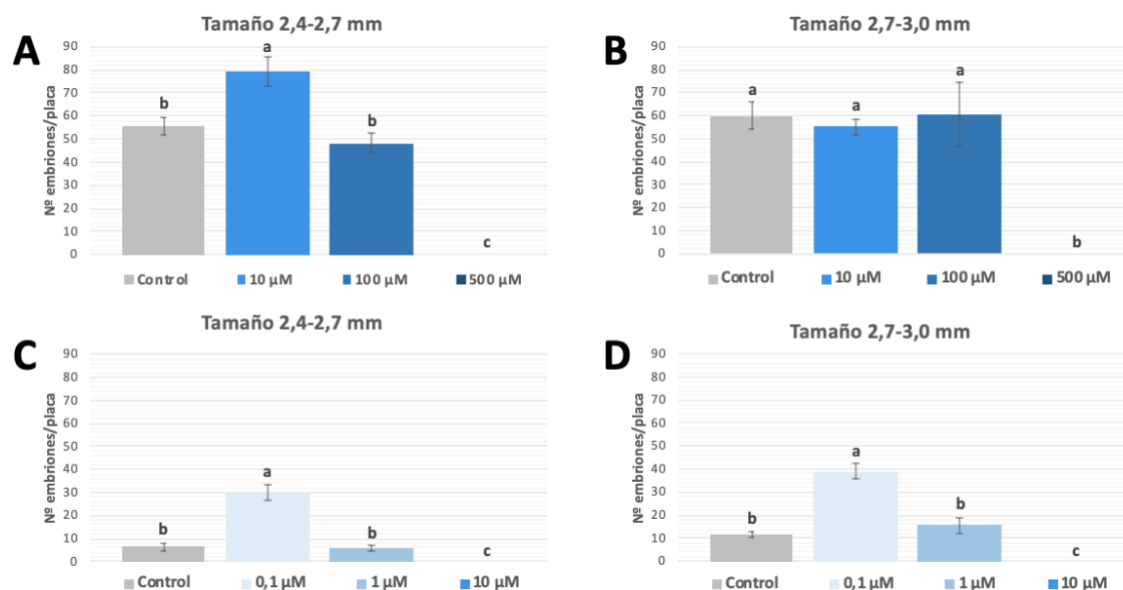


Figura 10. Efecto del DHA con aplicación continua en el número de embriones de colza obtenidos. A) Cultivo 1 para el tamaño 2,4-2,7 mm de yema. B) Cultivo 1 para el tamaño 2,7-3,0 mm de yema. C) Cultivo 2 para el tamaño 2,4-2,7 mm de yema. D) Cultivo 2 para el tamaño 2,7-3,0 mm de yema. Cada columna representa el valor medio de embriones obtenidos y las barras indican el error estándar correspondiente. Las distintas letras indican las diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al test ANOVA y posterior test de Tukey con un $p \leq 0.05$.

En el primer cultivo, para el tamaño de yema de 2,4-2,7 mm, únicamente se obtuvo una mejora en la respuesta embriogénica de las microsporas con la concentración de 10 μM de DHA, mientras que con las concentraciones superiores de 100 y 500 μM , se obtuvo una respuesta embriogénica inferior al control y nula, respectivamente (Figura 10.A). En el caso del tamaño 2,7-3,0 mm (Figura 10.B), ninguna de las concentraciones mejoró la respuesta del cultivo, llegando a presentar una respuesta embriogénica nula con la condición más concentrada. Consecuentemente, en el siguiente cultivo se procedió a disminuir la

concentración para ambos tamaños de yema. La concentración más diluida probada de 10 μM se mantuvo, y se añadieron concentraciones inferiores: 1 y 0,1 μM .

La respuesta embriogénica general del cultivo dos fue notablemente inferior a la del cultivo uno, probablemente debido a factores externos como por ejemplo la estación del año en la que se llevaron a cabo. Con las nuevas concentraciones empleadas, se observó que únicamente DHA 0,1 μM aumentó considerablemente el número de embriones obtenidos en ambos tamaños (Figura 10.C y 10.D), y que esta presentaba diferencias estadísticamente significativas con el resto de condiciones analizadas. Asimismo, también se observó en ambos tamaños, como el aumento de concentración a 1 μM supone una respuesta similar al control y sin diferencias significativas con este. Con la condición DHA 10 μM directamente no se obtuvo respuesta en ningún tamaño, a pesar de haber respondido en el cultivo anterior en ambos, y en el caso del tamaño 2,4-2,7 mm, haber supuesto una mejora significativa frente al control.

Por otro lado, también se llevaron a cabo dos cultivos idénticos a los previamente mencionados, pero cambiando la aplicación del compuesto a 72 horas. Sin embargo, se obtuvo un desarrollo embriogénico significativamente inferior al control, incluso nulo, en ambos cultivos, por lo que la aplicación continua sería la adecuada para este compuesto.

Además, los resultados obtenidos de la aplicación continua sugieren que la concentración óptima entre las estudiadas de DHA, para ambos tamaños de yema floral, es la de 0,1 μM . No obstante, sería necesario realizar más replicas del experimento, así como seguir diluyendo las concentraciones hasta delimitar la aplicación óptima de DHA, ya que se ha observado que cuanto más se ha reducido la concentración, mejor eficacia se ha obtenido en el cultivo.

4.1.3. Efecto de los inhibidores de las desacetilasas de histonas en la embriogénesis de microsporas de colza

El inhibidor de HDACs Panobinostat se estudió mediante dos cultivos realizados para ambos tamaños de yema, a los cuales se les aplicó dicho compuesto durante 24 horas. Con anterioridad se ensayaron tiempos mayores de aplicación del compuesto (72 horas y aplicación continua) pero no se observó desarrollo embriogénico alguno, no se obtuvieron embriones en ninguno de los casos por lo que se descartaron estos tiempos de aplicación de Panobinostat. En el primero de los cultivos se ensayaron concentraciones más diluidas (0,5, 5 y 50 nM), y en el segundo más concentradas (50, 500 y 5000 nM). Se calculó la media de embriones obtenidos por placa y el error estándar, y posteriormente se realizaron los test estadísticos ANOVA y Tukey, estableciendo las diferencias estadísticamente significativas entre medias.

En el caso del tamaño de yema 2,4-2,7 mm, la concentración de 0,5 nM no supuso una mejora frente al control, obteniéndose una respuesta similar a este y sin existir diferencias estadísticamente significativas entre ambos. No obstante, conforme se aumenta la concentración de Panobinostat, se observa un aumento considerable en la respuesta embriogénica del cultivo, alcanzando la máxima respuesta con la concentración de 50 nM (Figura 11.A). Por otro lado, para el tamaño de yema de 2,7-3,0 mm, las tres concentraciones probadas supusieron un incremento significativo en el número de embriones obtenidos. La mayor respuesta embriogénica se obtuvo con la concentración 5 nM, cuya respuesta es muy similar a la de 0,5 nM, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellas. Con la concentración de 50 nM, también se observó una respuesta muy superior al control, pero

inferior al resto de condiciones y con diferencias significativas frente a estas y frente al control (Figura 11.B).

En el siguiente cultivo, para el tamaño de yema de 2,4-2,7 mm, la concentración de 50 nM con la que se había obtenido previamente la mayor respuesta, respondió de manera similar al control y no presentó diferencias significativas ni con este ni con la concentración de 500 nM. La máxima respuesta embriogénica del cultivo se obtuvo precisamente con esta concentración de 500 nM, la cual si que presentó diferencias significativas frente al control y 5000 nM, cuya respuesta fue prácticamente nula (Figura 11.C). Por otro lado, en el tamaño de 2,7-3,0 mm, la máxima respuesta se obtuvo con la concentración de 50 nM, la cual era significativamente diferente al resto, además de ser la única concentración analizada que supuso un aumento en el número de embriones obtenidos frente al control sin Panobinostat (Figura 11.D).

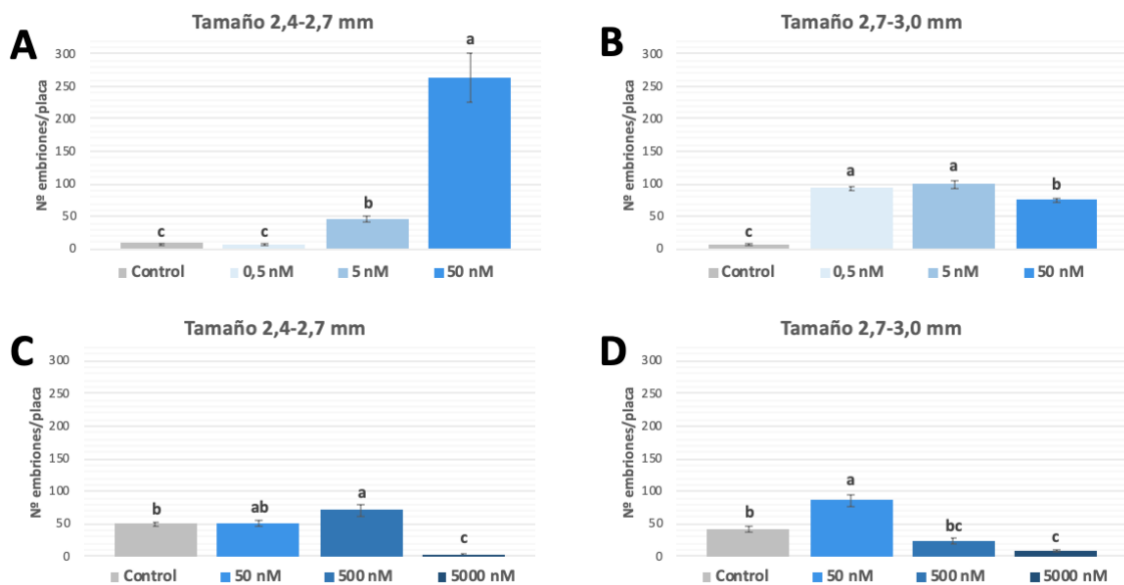


Figura 11. Efecto del Panobinostat con aplicación de 24 horas en el número de embriones de colza obtenidos. A) Cultivo 1 para el tamaño 2,4-2,7 mm de yema. B) Cultivo 1 para el tamaño 2,7-3,0 mm de yema. C) Cultivo 2 para el tamaño 2,4-2,7 mm de yema. D) Cultivo 2 para el tamaño 2,7-3,0 mm de yema. Cada columna representa el valor medio de embriones obtenidos por placa y las barras indican el error estándar correspondiente. Las distintas letras indican las diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al test ANOVA y test de Tukey con un $p \leq 0.05$.

Estos resultados sugieren que de entre las concentraciones analizadas, aquellas que mejoraron significativamente la respuesta embriogénica de las microsporas en cultivo provenientes del tamaño de yema de 2,4-2,7 mm, son las concentraciones de 50 y 500 nM. Para el tamaño de yema de 2,7-3,0 mm, serían las concentraciones de 0,5 y 5 nM de Panobinostat. En el caso del tamaño de yema pequeño, sería conveniente realizar más replicas, así como analizar concentraciones entre 50 y 500 nM y cercanas a estas, hasta encontrar la óptima. Asimismo, para el tamaño de yema mayor, también se deberían de realizar más réplicas, además de disminuir la concentración de Panobinostat, con el propósito de estudiar si mejora la eficiencia del cultivo con concentraciones todavía inferiores.

El otro inhibidor de desacetilasas de histonas iHDAC Cocktail se estudió en un total de tres cultivos. En uno de ellos se aplicó el compuesto durante 72 horas, mientras que en los dos restantes se aplicó durante 24 horas. Se analizaron las concentraciones de 0,0001x, 0,001x y 0,001x. Se calculó la media y el error estándar de estas a partir de una media de cuatro placas

Petri de cultivo por condición. Por último, con el propósito de estudiar si existían diferencias significativas entre medias, se llevo a cabo el test ANOVA, y posteriormente el test de Tukey.

En el cultivo de microsporas al cual se le aplicó durante 72 horas iHDAC Cocktail (0,0001x, 0,001x y 0,01x), únicamente respondió el control, mientras que en el resto de condiciones estudiadas la embriogénesis de microsporas fue nula. Estos resultados sugirieron que el tiempo de aplicación no era el adecuado, por lo que se procedió a aplicarlo durante 24 horas.

Durante el primer cultivo de 24 horas, se estudiaron las concentraciones 0,001x y 0,001x. En esta ocasión, si que se obtuvo respuesta embriogénica en el cultivo. Para el tamaño de yema de 2,4-2,7 mm, la máxima respuesta del cultivo se obtuvo con la concentración de 0,001x, la cual presentó un aumento considerable en el número de embriones obtenido frente al control (Figura 12.A). Además, esta presentaba diferencias estadísticamente significativas frente a las otras condiciones. Sin embargo, la concentración iHDAC Cocktail 0,01x, resultó ser demasiado concentrada, obteniéndose una respuesta embriogénica inferior al control y sin diferencias significativas con este. En el caso del tamaño de yema de 2,7-3,0 mm, se observó que ambas concentraciones, 0,001x y 0,001x, aumentaban considerablemente el número de embriones obtenidos. La respuesta embriogénica de ambas concentraciones fue muy similar, sin existir diferencias significativas entre ambas, pero si de estas frente al control (Figura 12.B).

En el siguiente cultivo, se ensayaron las mismas concentraciones, junto con la concentración más diluida de 0,0001x. En el caso del tamaño 2,4-2,7 mm, el cultivo se contaminó, por lo que no fue posible su análisis. Sin embargo, en el caso del tamaño 2,7-3,0 mm, la máxima respuesta embriogénica del cultivo, tres veces superior al control, se obtuvo con la nueva concentración más diluida de 0,0001x, la cual presentaba diferencias significativas con el resto de condiciones (Figura 12.C). Las siguiente concentración con mayor respuesta fue 0,001x, seguida de 0,01x. Entre estas dos últimas no existen diferencias significativas, pero si con el control.

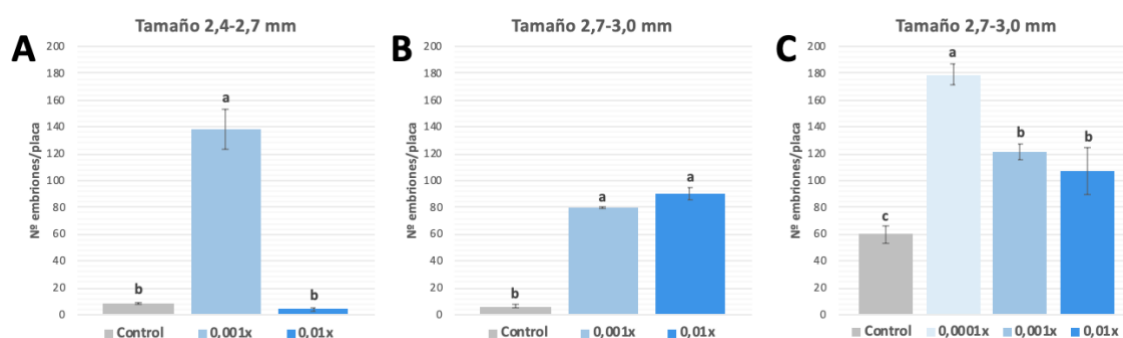


Figura 12. Efecto del iHDAC Cocktail con aplicación de 24 horas en el número de embriones de colza obtenidos. A) Cultivo 1 para el tamaño 2,4-2,7 mm de yema. B) Cultivo 1 para el tamaño 2,7-3,0 mm de yema. C) Cultivo 2 para el tamaño 2,7-3,0 mm de yema. Cada columna representa el valor medio de número de embriones obtenidos por placa y las barras indican el error estándar correspondiente. Las distintas letras de cada columna indican las diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al test ANOVA y posterior test de Tukey con un $p \leq 0.05$.

Estos resultados parecen indicar que de entre las concentraciones estudiadas, para el tamaño de yema 2,4-2,7 mm la concentración de iHDAC Cocktail 0,001x es la más idónea, pero sería necesario probar concentraciones menores con el fin de ver si aumentan todavía más la eficiencia del cultivo. En el caso del tamaño de yema 2,7-3,0 mm, la concentración de 0,0001x resultó maximizar el número de embriones generados. Asimismo, aquí también resultaría conveniente seguir bajando la concentración del compuesto, hasta establecer la óptima.

4.2. Cultivo microsporas de berenjena

4.2.1. Embriogénesis de microsporas en cultivo de berenjena

Las microsporas de berenjena aisladas en cultivo (Figura 13.A) experimentaron una serie de transformaciones durante su desarrollo hasta convertirse en callos. Trascorridos 5 días desde la inducción, se observó el inicio de la ruta esporofítica en microsporas que ya habían sufrido las primeras divisiones simétricas (Figura 13.B). Sin embargo, la mayoría no experimentaron ningún cambio morfológico, sufriendo la detención del desarrollo y/o la muerte, mientras que otras directamente continuaron con la ruta gametofítica, dando lugar a polen maduro. Durante la primera semana de cultivo, se identificaron microsporas multinucleadas (Figura 13.C) y transcurridos 15-20 días, se observaron estructuras esféricas compactas, semejantes a un embrión globular (Figura 13.D). Después de 3 semanas, se comenzaron a visualizar estructuras microscópicas similares a un callo (Figura 13.E), y una semana después, estas dieron lugar a callos macroscópicos (Figura 13.F).

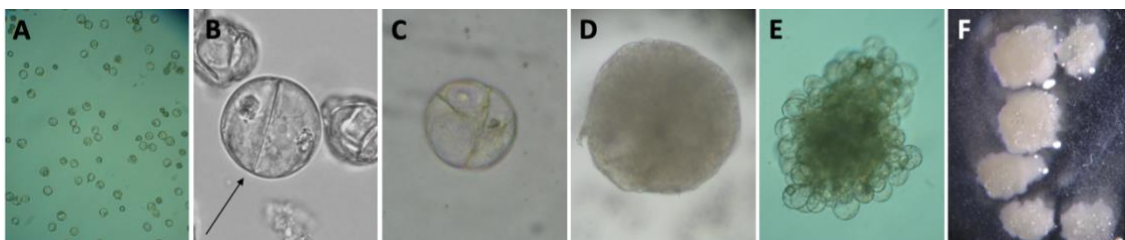


Figura 13. Embriogénesis de microsporas en *Solanum melongena* L. A) Microsporas recién aisladas. B) Microspora esporofítica (central) tras la primera división embriogénica y microsporas detenidas (arriba y derecha). C) Microspora multinucleada. D) Embrión globular. E) Estructura similar a un callo microscópica. F) Callos en medio líquido.

Con la finalidad de estudiar el efecto de los compuestos inhibidores del estrés del RE y el de los iHDACs en la eficiencia del cultivo de microsporas de berenjena se llevaron a cabo un total de 8 cultivos: 2 de TUDCA, 3 de Panobinostat y 3 de iHDAC Cocktail. En estos se aplicaron distintas concentraciones de los compuestos y se analizó el número de callos obtenidos en placa tras un mes a 25 °C desde la inducción de las microsporas, con la ayuda de una lupa binocular.

4.2.2. Efecto de los inhibidores del estrés del retículo endoplásmico en la embriogénesis de microsporas de berenjena

En microsporas de berenjena únicamente se estudió el efecto del compuesto TUDCA como inhibidor del estrés del RE. Se aplicó de manera continua, ya que en colza fue la aplicación que resultó efectiva, y se llevaron a cabo dos cultivos donde se estudiaron las concentraciones 5 y 50 nM, junto con su respectivo control. Para cada una de estas tres condiciones (5 nM, 50 nM y Control), se analizó el número de callos obtenidos en 8 placas Petri distintas. A partir de estos datos, se calculó la media y el error estándar. Finalmente, los tests ANOVA y Tukey sirvieron para estudiar y establecer diferencias estadísticamente significativas entre medias.

Los resultados obtenidos de la combinación de las distintas repeticiones del mismo experimento se muestran en la Figura 14. En esta se observa que las tres condiciones estudiadas presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellas. La aplicación de TUDCA en el cultivo de microsporas, para todas las concentraciones ensayadas, conllevó un aumento significativo del número de callos resultantes. En el caso de la concentración 5 nM, el aumento fue de hasta cuatro veces el control, mientras que este aumento en el número de

callos se vio incrementado todavía más al aplicar una concentración de 50 nM, con más de seis veces el control, obteniéndose el valor máximo de callos. Consecuentemente, atendiendo a los resultados obtenidos, sería necesario continuar con el estudio aplicando concentraciones superiores a 50 nM, hasta delimitar el valor óptimo que maximice la cantidad de callos generados en el proceso. Pero entre las concentraciones analizadas, TUDCA 50 nM es la que proporciona la mejor respuesta embriogénica en el cultivo de microsporas de berenjena.

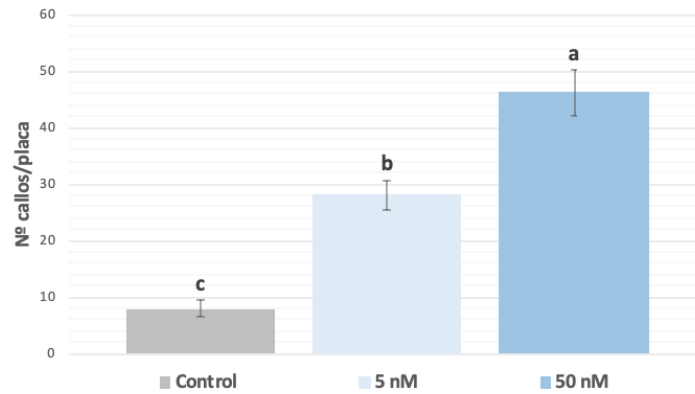


Figura 14. Efecto del TUDCA con aplicación continua en el número de callos de berenjena obtenidos. Cada columna representa el valor medio de número de callos obtenidos por placa para cada concentración, y las barras indican al error estándar correspondiente. Las distintas letras de cada columna indican las diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al test ANOVA realizado y posterior test de Tukey con un $p \leq 0.05$.

4.2.3. Efecto de los inhibidores de las desacetilasas de histonas en la embriogénesis de microsporas de berenjena

Se estudió el efecto del Panobinostat en el cultivo de microsporas de berenjena mediante un total 3 cultivos. Se analizaron las concentraciones 50, 500 y 5000 nM, con una aplicación de 24 horas, ya que con 72 horas no se obtuvo desarrollo embriogénico alguno. El valor medio de callos y el error estándar se calculó a partir de 12 placas Petri para cada condición estudiada. Con el fin de conocer si existían diferencias estadísticamente significativas entre medias se llevó a cabo el test ANOVA y posteriormente se establecieron mediante el test de Tukey.

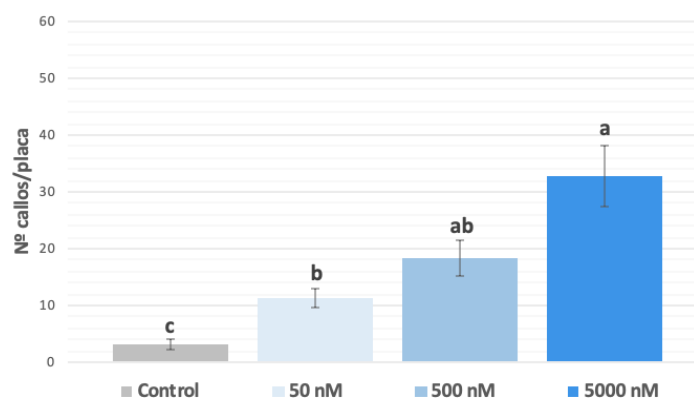


Figura 15. Efecto del Panobinostat con aplicación de 24 horas en el número de callos de berenjena generados. Cada columna representa el valor medio de número de callos obtenidos por placa para cada concentración, y las barras indican al error estándar correspondiente. Las distintas letras de cada columna indican las diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al test ANOVA realizado y posterior test de Tukey con un $p \leq 0.05$.

La Figura 15 muestra los resultados obtenidos de las tres repeticiones del mismo experimento de cultivo de microsporas de berenjena con Panobinostat. Existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de cada una de las condiciones estudiadas,

excepto en el caso de la concentración 500 nM, la cual no presenta diferencias significativas con las concentraciones de Panobinostat 50 nM y 5000 nM. Para todas las concentraciones analizadas, se observa un aumento significativo en el número de callos obtenidos respecto al control. Dicho aumento se incrementa conforme la concentración es mayor, presentando la concentración de 5000 nM la máxima respuesta embriogénica de las microsporas en cultivo. Consecuentemente, la aplicación de Panobinostat aumenta la eficiencia del cultivo de microsporas embriogénicas de berenjena. Respecto a que concentración de este genera la mayor respuesta entre las estudiadas, se trata de la más concentrada (5000 nM), siendo diez veces superior al control. No obstante, sería necesario analizar concentraciones superiores a esta, para ver hasta que concentración se ve incrementada la eficiencia del cultivo.

Para el estudio del compuesto iHDAC Cocktail también se realizaron tres cultivos, en los cuales se estudió el efecto de las siguientes concentraciones: 0,00001x, 0,0001x y 0,001x. El compuesto se aplicó durante un periodo de 24 horas, ya que con 72 horas se obtuvo un desarrollo embriogénico nulo. Para cada una de las condiciones, se calculó el valor medio de callos por placa y el error estándar, a partir de 12 placas Petri. Finalmente, se realizaron los tests ANOVA y Tukey para analizar las diferencias estadísticamente significativas entre medias.

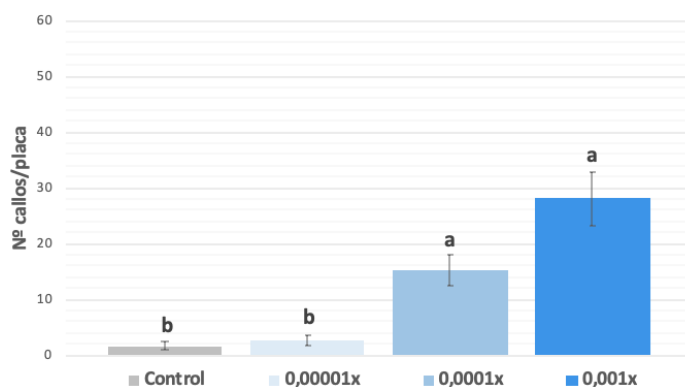


Figura 16. Efecto de iHDAC Cocktail con aplicación de 24 horas en el número de callos de berenjena obtenidos. Cada columna representa el valor medio de número de callos obtenidos por placa para cada concentración, y las barras indican al error estándar correspondiente. Las distintas letras de cada columna indican las diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al test ANOVA realizado y posterior test de Tukey con un $p \leq 0.05$.

Los resultados de las tres repeticiones del mismo experimento se muestran en la Figura 16, donde es posible observar que con la concentración más diluida (0,00001x) se obtuvo un número de callos ligeramente superior al control, con el cual no presenta diferencias estadísticamente significativas, por lo que la aplicación de esta concentración no supone una mejora significativa en la respuesta del cultivo frente al control sin tratamiento. El número máximo de callos se obtuvo con la concentración de 0,001x, la cual no presenta diferencias estadísticamente significativas con la concentración de 0,0001x, con la que se obtuvo la segunda mejor respuesta embriogénica. No obstante, estas dos concentraciones si que suponen un aumento significativo en el número de callos respecto al control.

La aplicación de iHDAC Cocktail, por lo tanto, aumenta la eficiencia de inducción de la embriogénesis de microsporas de berenjena. No obstante, con este compuesto también sería conveniente probar concentraciones más elevadas, ya que la máxima respuesta embriogénica del cultivo se observa con la condición más concentrada. Una concentración superior permitiría estudiar si, con esta, la respuesta del cultivo sería todavía superior y diferente significativamente a las ya probadas de 0,0001x y 0,001x.

5. DISCUSIÓN

La muerte celular a causa del estrés y las bajas tasas de reprogramación celular son algunos de los factores que reducen la eficiencia de la embriogénesis de microsporas. En el presente estudio se ha observado que la aplicación de los inhibidores del estrés del RE: TUDCA y DHA, así como de los inhibidores de las HDACs: Panobinostat e iHDAC Cocktail, mejora la eficiencia del cultivo de embriogénesis de microsporas en colza y berenjena. No obstante, se trata de un estudio preliminar acerca de la aplicación de estos compuestos, haciendo falta un análisis posterior más amplio y extenso. En este se continuarían probando las concentraciones que mejor respuesta embriogénica han mostrado de cada compuesto, junto con otras concentraciones que todavía no han sido probadas pero que los resultados obtenidos parecen indicar que podrían mejorar a un mayor nivel la eficiencia del cultivo. Asimismo, también se llevaría a cabo un número de replicas mayor de cada cultivo. El estudio culminaría con la obtención de la concentración idónea de cada compuesto que maximiza el número de embriones (colza) o callos (berenjena) derivados del proceso.

En este estudio preliminar se ha observado cómo una misma concentración de compuesto, como por ejemplo es el caso de la concentración de DHA 10 μM en colza, presenta en dos cultivos respuestas embriogénicas que difieren notablemente, cuando sería de esperar que una misma concentración respondiese de manera similar en todos los cultivos realizados con esta. Este hecho sugiere la presencia de factores externos que pueden haber afectado al cultivo de embriogénesis de microsporas. Uno de estos factores podría ser la edad de la planta donante empleada en el cultivo; las plantas jóvenes presentan un mayor potencial androgénico, y haber empleado plantas de distintas edades podría haber contribuido a esta variabilidad. También podría deberse a diferencias en el estado fisiológico de las microsporas aisladas, debidas a la realización de los cultivos en distintas estaciones del año. Consecuentemente, en el análisis posterior se debería de mantener la homogeneidad del material vegetal empleado en medida de lo posible, evitando así variaciones en la respuesta embriogénica de una misma concentración de compuesto.

El compuesto TUDCA analizado, ha sido previamente aplicado a plántulas de *Arabidopsis thaliana* donde se ha observado que disminuye la autofagia al reducir la cantidad de proteínas mal plegadas. Este compuesto estabiliza las proteínas sin plegar, evitando así su agregación (Yang *et al.*, 2016). En contraposición, el DHA únicamente se ha probado en sistemas animales, donde ha sido capaz de reducir el estrés y la acumulación de proteínas mejorando la función neuronal de ratas que habían sufrido lesiones cerebrales (Begum *et al.*, 2014). Actualmente no existe ningún estudio acerca del estrés del RE en embriogénesis de microsporas, y esta es una de las razones por las que se planteó el presente estudio preliminar, antes de abordar otros de mayor envergadura. Con anterioridad, se ha visto que algunas de las causas del estrés del RE coinciden con los estreses empleados para inducir la embriogénesis en cultivos de microsporas (estrés térmico, privación de glucosa...), y que algunas de las consecuencias derivadas de la activación de la UPR en plantas coinciden con las observadas tras la inducción de la embriogénesis en microsporas, como por ejemplo la presencia de acumulaciones de cisternas del RE, con lo que parecen ser proteínas mal plegadas en su interior, en microsporas embriogénicas. Todas estas observaciones parecen establecer un claro papel de la implicación del estrés del RE en la embriogénesis de microsporas, y el hecho de que se haya visto que la aplicación de inhibidores del estrés del RE (TUDCA y DHA) en microsporas de colza y berenjena aumenta la eficiencia embriogénica del cultivo, parece avalar, en principio, dicha implicación.

Tanto el compuesto TUDCA estudiado en el cultivo de microsporas de ambas especies, como el DHA estudiado únicamente en colza, demostraron eficacia aumentando la eficiencia del cultivo de embriogénesis de microsporas con una aplicación continua, mientras que una aplicación durante el estrés térmico (de 72 horas) no supuso en ningún caso una mejora en el desarrollo embriogénico del cultivo frente al control. Este hecho parece indicar que el estrés del RE generado en la microspora no perdura únicamente mientras el estrés térmico está siendo aplicado, sino que una vez este finaliza la microspora sigue experimentando una situación de estrés en el RE. Probablemente la microspora siga teniendo una demanda de proteínas funcionales superior a la que el sistema de plegado del RE es capaz de proporcionar, ya que requerirá de la síntesis de nuevas proteínas funcionales para su nuevo programa de desarrollo embriogénico. Consecuentemente, la microspora seguirá necesitando de estos inhibidores, a pesar de haber cesado el estrés térmico, hasta que sea capaz de cubrir la demanda proteica sin que se acumulen proteínas sin plegar o mal plegadas.

Los inhibidores Panobinostat e iHDAC Cocktail analizados en el presente trabajo han sido estudiados únicamente en sistemas animales o, en el caso de iHDAC Cocktail, no ha sido estudiado con anterioridad. Por este motivo, este también es un estudio pionero acerca de la aplicación de estos compuestos en embriogénesis de microsporas. Sin embargo, sí hay antecedentes acerca de la modulación de los niveles de acetilación de ciertas histonas durante la embriogénesis de microsporas. Nuestros resultados indican que el tiempo de aplicación adecuado para ambos compuestos iHDACs es de 24 horas tanto en colza como en berenjena. Rodríguez-Sanz *et al.* (2014) demostraron que los niveles de acetilación de las histonas H3 y H4 cambian durante la embriogénesis de microsporas. Las microsporas vacuoladas presentan altos niveles de acetilación, mientras que después del tratamiento de estrés y la iniciación de la embriogénesis estos se ven disminuidos, y vuelven a aumentar en etapas avanzadas del desarrollo embrionario. El hecho de que la aplicación idónea de estos compuestos sea de 24 horas podría deberse a que se requieren altos niveles de acetilación para que la microspora cambie su programa de desarrollo, pero una vez inducida la embriogénesis, estos niveles deben verse reducidos, de modo que la aplicación continua podría no haber resultado efectiva al no permitir dicha disminución en la acetilación de histonas posterior a la inducción.

La Tricostatina A (TSA), el Ácido suberoilánilídrico (SAHA) y el Butirato de sodio (NaB), son los únicos iHDACs que sí han sido estudiados en embriogénesis de microsporas en cultivo. Li *et al.* (2014) fueron los primeros en estudiar el efecto de los iHDACs en embriogénesis de microsporas mediante la aplicación de TSA en microsporas de *Brassica napus*. Estos observaron que una aplicación de TSA 0,5 μM durante 20 horas aumentaba a un 80 % el porcentaje de microsporas inducidas a embriogénesis en comparación con el 6 % del control. Posteriormente, en *Brassica rapa* se ha observado que una aplicación continua de TSA (0,025-0,075 μM), SAHA (0,025-0,075 μM) o NaB (2 μM) aumenta significativamente la eficiencia del cultivo de microsporas (Zhang *et al.*, 2016). Este aumento de la eficiencia también se ha observado en microsporas de trigo tras una aplicación de TSA 0,1-0,3 μM de 10 min (Jiang *et al.*, 2017), y en microsporas de cebada tras una aplicación de de TSA 0,5 μM durante 24 horas, ya que 48 horas resultaron ser demasiadas (Pandey *et al.*, 2017).

Entre los componentes del iHDAC Cocktail encontramos los inhibidores TSA (40 μM) y NaB (200 μM). Los resultados obtenidos acerca de su modo de aplicación en colza indicaban que el idóneo era 24 horas, tiempo similar a las 20 horas de aplicación del TSA en colza según el estudio de Li *et al.* (2014). Por otro lado, de entre las concentraciones de iHDAC Cocktail

analizadas en colza, aquellas que resultaron ser más efectivas para los tamaños de yema 2,4-2,7 mm y 2,7-3,0 mm fueron 0,001x (0,04 μ M de TSA y 0,2 mM de NaB) y 0,0001X (0,004 μ M de TSA y 0,02 mM de NaB) respectivamente, y en ambos casos los resultados sugerían que con concentraciones más diluidas se obtendrían eficiencias todavía mayores. Si se comparan estas concentraciones de TSA con la concentración de 0,5 μ M que resultó efectiva en embriogénesis de microsporas de colza según Li *et al.* (2014), observamos que las empleadas en nuestro análisis son considerablemente inferiores. Este hecho se debe probablemente a que en el presente estudio se está aplicando iHDAC Cocktail, que se trata de una combinación de diversos iHDACs, y no se está aplicando TSA en solitario.

Por otro lado, la aplicación de diferentes concentraciones de estos compuestos inhibidores del estrés del RE y de las HDACs afectan de manera distinta a los cultivos de microsporas de colza y de berenjena. De los inhibidores del estrés del RE, el único estudiado en ambas especies fue TUDCA. En el caso de la colza, las concentraciones óptimas entre las analizadas fueron 0,05 y 0,5 nM para el tamaño de yema de 2,4-2,7 mm, y 0,5 y 5 nM para el tamaño de 2,7-3,0 mm (Figura 9.C y 9.D), mientras que con la concentración de TUDCA 50 nM se observó una respuesta embriogénica significativamente inferior al control en el tamaño de 2,4-2,7 mm (Figura 9.A) y similar al control en el tamaño de 2,7-3,0 mm (Figura 9.B y 9.D). En contraposición, la concentración que presentó la máxima respuesta embriogénica en berenjena fue precisamente 50 nM (Figura 14). Esta concentración fue la más concentrada que se analizó en berenjena, y la tendencia de los resultados parecía indicar que concentraciones más elevadas presentarían una eficiencia todavía mayor. Todos estos resultados en conjunto, señalan una posible diferencia en el estrés del RE que sufren las microsporas de ambas especies, de modo que el estrés experimentado por el RE de las microsporas de berenjena podría ser considerablemente superior, al requerir mayores concentraciones de TUDCA. Esto podría deberse a que para inducir el cambio de programa de desarrollo al embriogénico, en el caso de las microsporas de colza es suficiente con la aplicación de un estrés térmico de 72 horas, mientras que en berenjena, al tratarse de una especie más recalcitrante a la embriogénesis de microsporas, este estrés térmico se combina con un ayuno total de todo tipo de nutrientes (el medio de inducción es únicamente agua destilada), por lo que el estrés del RE generado tras la inducción podría ser superior. Sin embargo, también podría ocurrir que el estrés del RE experimentado por las microsporas de ambas especies fuese similar, pero que las microsporas de berenjena fuesen menos sensibles a la aplicación de este compuesto, requiriendo concentraciones mayores para paliar los efectos del estrés, o que TUDCA presentase una mayor toxicidad en microsporas de colza, por lo se requieren concentraciones menores de este. Con el propósito de estudiar si existe una diferencia en el estrés del RE experimentado por las microsporas de colza y berenjena podría llevarse a cabo un seguimiento del RE antes y después de la inducción de la embriogénesis. Mediante la tinción fluorescente ER Cytopainter y un microscopio confocal podría compararse el aumento que sufre el RE como consecuencia del estrés en cada especie. Otra opción sería realizar un Western Blot para determinar en cada especie el aumento que experimenta de proteínas implicadas en la UPR, como por ejemplo de la proteína BiP, una chaperona presente en el lumen del RE que se encarga del plegamiento proteico y cuya síntesis aumenta tras el estrés. Asimismo, estos estudios podrían complementarse con una qPCR, para estudiar si existe una expresión diferencial entre especies de genes implicados en la respuesta al estrés del RE, como por ejemplo IRE, bZIP28, bZIP60 o BiP.

Respecto a los iHDACs analizados, los dos compuestos fueron aplicados a los cultivos de microsporas de ambas especies. En colza el inhibidor Panobinostat presentó la máxima respuesta embriogénica con la concentración de 500 nM, para el tamaño de yema 2,4-2,7 mm, seguida de 50 nM (Figura 11.C). Para el tamaño 2,7-3,0 mm, la máxima eficiencia se alcanzó con las concentraciones de 0,5 y 5 nM (Figura 11.D). Además, para ambos tamaños de yema la concentración de Panobinostat 5000 nM presentó una respuesta embriogénica prácticamente nula. Sin embargo, en berenjena, esta concentración presentó la máxima eficiencia (Figura 15), y se observó que conforme se aumentaba la concentración de Panobinostat, la respuesta embriogénica del cultivo también aumentaba, sugiriendo que concentraciones superiores a 5000 nM podrían presentar una eficiencia superior a la observada con esta. Todos estos resultados plantean la posibilidad de que exista una diferencia en los niveles de acetilación requeridos para el cambio de programa de desarrollo entre ambas especies. Las microsporas de berenjena requieren concentraciones mucho más elevadas de Panobinostat, de modo que podrían necesitar un nivel de acetilación mayor para cambiar su programa del gametofítico al embriogénico. Esta necesidad de concentraciones superiores de Panobinostat también podría deberse a que los niveles de HDACs fuesen mayores en berenjena, requiriendo una mayor cantidad para inhibirlas. Otra hipótesis posible es que los patrones de acetilación de ambas especies difieran notablemente, de modo que en colza altos niveles de iHDACs activen genes y/o grupos de genes desfavorables para el cambio de programa de desarrollo al embriogénico, como podría ser aquellos implicados en la síntesis de almidón (necesarios para el desarrollo gametofítico). Por el contrario, podría ocurrir que en berenjena altos niveles de iHDACs activasen genes y/o grupos de genes favorables para la inducción de la embriogénesis.

Para el compuesto iHDAC Cocktail en embriogénesis de microsporas de colza provenientes del tamaño de yema 2,4-2,7 mm, la máxima eficiencia se obtuvo con la concentración 0,001x (Figura 12.A), no siendo posible estudiar concentraciones inferiores por problemas de contaminación e imposibilidad de repetir los cultivos contaminados. En el caso del tamaño 2,7-3,0 mm, la concentración que maximizó la eficiencia del cultivo fue la más diluida, 0,0001x, sugiriendo que concentraciones inferiores podrían presentar una respuesta embriogénica todavía superior (Figura 12.C). En el caso de la berenjena, la máxima eficiencia se obtuvo con la concentración 0,001x, la más concentrada de las estudiadas (Figura 16). También se observó que el aumento de iHDAC Cocktail en el cultivo venía acompañado de un incremento en la eficiencia de este, sugiriendo que concentraciones superiores podrían presentar una respuesta embriogénica todavía mayor. Todas estas observaciones acerca del inhibidor iHDAC Cocktail, parecen respaldar también las hipótesis previamente planteadas acerca de la necesidad de mayores concentraciones de iHDACs en microsporas de berenjena.

Con el propósito de elucidar la razón por la cual se requieren mayores concentraciones de iHDACs en berenjena se podrían realizar diversas comprobaciones. Una de ellas consistiría en cuantificar la cantidad de HDACs en cada una de las especies mediante un Western Blot. Lo más idóneo sería realizar un seguimiento de la cantidad de HDACs en distintos tiempos del cultivo, para ver si estos también varían tras el estrés térmico. Por otro lado, para comparar los niveles de acetilación de ambas especies, se purificaría el DNA y mediante un anticuerpo que reconozca histonas acetiladas sería posible detectar el nivel de acetilación de cada especie. Finalmente, aquellos genes que se conocen que son favorables/desfavorables para la inducción de la embriogénesis, podrían aislarse antes y después del estrés en ambas especies y estudiar el nivel de acetilación mediante anticuerpos que reconozcan acetilación de histonas.

6. CONCLUSIONES

En el presente Trabajo de Final de Grado se llegó a las siguientes conclusiones:

- El empleo de inhibidores del estrés del RE y de las iHDACs mejora significativamente la eficiencia de los cultivos de embriogénesis de microsporas de colza y berenjena.
- Existen factores externos que afectan a la respuesta embriogénica del cultivo, como la edad de la planta donante o la estación del año en la que se realiza el cultivo.
- El modo de aplicación de TUDCA y DHA es continuo, y el de Panobinostat e iHDAC Cocktail es de 24 horas.
- Las concentraciones TUDCA requeridas para paliar los efectos del estrés del RE son mayores en berenjena.
- Las concentraciones de iHDACs (Panobinostat e iHDAC Cocktail) necesarias para mantener la acetilación de las histonas son superiores en berenjena.

7. REFERENCIAS

- ALLENDER, C.J. Y KING, G.J. (2010). Origins of the amphiploid species *Brassica napus* L. investigated by chloroplast and nuclear molecular markers. *BMC Plant Biology*, 10: 54.
- 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.
- BEGUM, G.; HARVEY, L.; DIXON, C.E. Y SUN, D. (2013). ER stress and effects of DHA as an ER stress inhibitor. *Translational Stroke Research*, 4: 635-642.
- BEGUM, G.; YAN, H.Q.; LI, L.; SINGH, A.; DIXON, C.E. Y SUN, D. (2014). Docosahexaenoic acid reduces ER stress and abnormal protein accumulation and improves neuronal function following traumatic brain injury. *Journal of Neuroscience*, 34: 3743-3755.
- BIRCHLER, J.A.; YAO, H. Y CHUDALAYANDI, S. (2006). Unraveling the genetic basis of hybrid vigor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 12957-12958.
- CHAPMAN, M.A. (2019). Introduction: The Importance of Eggplant, en: *The Eggplant Genome*. Ed. Springer. Cham: 1-10.
- CORRAL-MARTÍNEZ, P. (2013). 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. Universitat Politècnica de València, pp. 228.
- CORRAL-MARTÍNEZ, P.; CAMACHO-FERNÁNDEZ, C. Y SEGUÍ-SIMARRO, J.M. (2020). Isolated Microspore Culture in *Brassica napus*, en: *Methods in Molecular Biology*. Ed. Humana Press. New York: 269-282.
- 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.
- CHEN, Z.J. (2013). Genomic and epigenetic insights into the molecular bases of heterosis. *Nature Reviews Genetics*, 14: 471-482.
- DATTA, R.; CHAMUSCO, K.C. Y CHOUREY, P.S. (2002). Starch biosynthesis during pollen maturation is associated with altered patterns of gene expression in maize. *Plant Physiology*, 130: 1645-1656.
- DAUNAY, M.-C. (2008). Eggplant, en: *Vegetables II: Handbook of Plant Breeding*. Ed. Springer. New York: 163-220.
- DAUNAY, M.-C., GEBHARDT, C., HENNART, J., JAHN, M. Y LESTER, R.N. (2001). Genetic resources of eggplant (*Solanum melongena* L.) and allied species: a new challenge for molecular geneticists and eggplant breeders, en: *Solanaceae V: Advances in Taxonomy and Utilization*. Ed. Nijmegen University Press. Nijmegen: 251-274.
- DAUNAY, M. Y LESTER, R. (1988). The usefulness of taxonomy for Solanaceae breeders, with special reference to the genus *Solanum* and to *Solanum melongena* L.(eggplant). *Capsicum Newsletter*, 7: 70-79.
- DUNWELL, J.M. (2010). Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnology Journal*, 8: 377-424.
- FANATA, W.I.D.; LEE, S.Y. Y LEE, K.O. (2013). The unfolded protein response in plants: A fundamental adaptive cellular response to internal and external stresses. *Journal of Proteomics*, 93: 356-368.
- FAOSTAT. (2020). <http://www.fao.org/faostat/en/#home> [last checked June 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.
- FRARY, A.; DOGANLAR, S. Y DAUNAY, M.C. (2007). Eggplant, en: *Vegetables. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*. Springer. Heidelberg: 287-313.
- FU, D.; XIAO, M.; HAYWARD, A.; FU, Y.; LIU, G.; JIANG, G. Y ZHANG, H. (2014). Utilization of crop heterosis: a review. *Euphytica*, 197: 161-173.

- GARNOCK-JONES, K.P. (2015). Panobinostat: first global approval. *Drugs*, 75: 695-704.
- GELETA, L.F.; T., L.M. Y VILJOEN, C.D. (2004). Relationship between heterosis and genetic distance based on morphological traits and AFLP markers in pepper. *Plant Breeding*, 123: 467-473.
- GERMANÀ, M.A. (2006). Doubled haploid production in fruit crops. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86: 131-146.
- GERMANÀ, M.A. (2011). Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104: 283-300.
- GERVAIS, C.; NEWCOMB, W. Y SIMMONDS, D.H. (2000). Rearrangement of the actin filament and microtubule cytoskeleton during induction of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. *Protoplasma*, 213: 194-202.
- GUHA, S. Y MAHESHWARI, S.C. (1964). In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, 204: 497.
- HOSP, J.; TASHPULATOV, A.; ROESSNER, U.; BARSOVA, E.; KATHOLNIGG, H.; STEINBORN, R.; MELIKANT, B.; LUKYANOV, S.; HEBERLE-BORS, E. Y TOURAEV, A. (2007). Transcriptional and metabolic profiles of stress-induced, embryogenic tobacco microspores. *Plant Molecular Biology*, 63: 137-149.
- HOWELL, S.H. (2013). Endoplasmic reticulum stress responses in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64: 477-499.
- HUANG, B.; BIRD, S.; KEMBLE, R.; SIMMONDS, D.; KELLER, W. Y MIKI, B. (1990). Effects of culture density, conditioned medium and feeder cultures on microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. *Plant Cell Reports*, 8: 594-597.
- ISLAM, S.M.S. Y TUTEJA, N. (2012). Enhancement of androgenesis by abiotic stress and other pretreatments in major crop species. *Plant Science*, 182: 134-144.
- JIANG, F.; RYABOVA, D.; DIEDHIOU, J.; HUCL, P.; RANDHAWA, H.; MARILLIA, E.F.; FOROUD, N.A.; EUDES, F. Y KATHIRIA, P. (2017). Trichostatin A increases embryo and green plant regeneration in wheat. *Plant Cell Reports*, 36: 1701-1706.
- KARIHALOO, J.L. Y GOTTLIEB, L.D. (1995). Allozyme variation in the eggplant, *Solanum melongena* L. (Solanaceae). *Theoretical and Applied Genetics*, 90: 767-770.
- KARIHALOO, J.L.; KAUR, M. Y SINGH, S. (2002). Seed protein diversity in *Solanum melongena* L. and its wild and weedy relatives. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 49: 533-539.
- KAUR, M.; SINGH, S. Y KARIHALOO, J.L. (2004). Diversity of Enzyme Electrophoretic Patterns in the Eggplant Complex. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 13: 69-72.
- KIM, M.; JANG, I.-C.; KIM, J.-A.; PARK, E.-J.; YOON, M. Y LEE, Y. (2008). Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Reports*, 27: 425-434.
- KOH, J.C.O.; BARBULESCU, D.M.; NORTON, S.; REDDEN, B.; SALISBURY, P.A.; KAUR, S.; COGAN, N. Y SLATER, A.T. (2017). A multiplex PCR for rapid identification of *Brassica* species in the triangle of U. *Plant Methods*, 13: 49-57.
- LAUBACH, J.P.; MOREAU, P.; SAN-MIGUEL, J.F. Y RICHARDSON, P.G. (2015). Panobinostat for the Treatment of Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research*, 21: 4767-4773.
- 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. London: 369-387.
- LI, H.; SORIANO, M.; CORDEWENER, J.; MUJINO, J.M.; RIKSEN, T.; FUKUOKA, H.; ANGENENT, G.C. Y BOUTILIER, K. (2014). The histone deacetylase inhibitor trichostatin A promotes totipotency in the male gametophyte. *Plant Cell*, 26: 195-209.
- LIU, J.X. Y HOWELL, S.H. (2010). Endoplasmic reticulum protein quality control and its relationship to environmental stress responses in plants. *Plant Cell*, 22: 2930-2942.
- LIU, Y. Y BASSHAM, D.C. (2012). Autophagy: Pathways for Self-Eating in Plant Cells. *Annual Review of Plant Biology*, 63: 215-237.

- LIU, Y.; BURGOS, J.S.; DENG, Y.; SRIVASTAVA, R.; HOWELL, S.H. Y BASSHAM, D.C. (2012). Degradation of the Endoplasmic Reticulum by Autophagy during Endoplasmic Reticulum Stress in Arabidopsis. *Plant Cell*, 24: 4635-4651.
- 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.
- MARTÍN, A. (2002). Los marcadores genéticos en la mejora vegetal, en: *Genómica y Mejora Vegetal*. Ed. Mundi-Prensa. Sevilla: 37-63.
- NAGAHARU, U. (1935). Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japanese Journal of Botany*, 7: 389-452.
- NOUR-ELDIN, H.H.; MADSEN, S.R.; ENGELEN, S.; JORGENSEN, M.E.; OLSEN, C.E.; ANDERSEN, J.S.; SEYNNAEVE, D.; VERHOYE, T.; FULAWKA, R.; DENOLF, P. Y HALKIER, B.A. (2017). Reduction of antinutritional glucosinolates in Brassica oilseeds by mutation of genes encoding transporters. *Nature Biotechnology*, 35: 377-382.
- PAGE, A.M.; DAUNAY, M.-C.; AUBRIOT, X. Y CHAPMAN, M.A. (2019). Domestication of eggplants: a phenotypic and genomic insight, en: *The Eggplant Genome*. Springer. Cham: 193-212.
- PANDEY, P.; DAGHMA, D.S.; HOUBEN, A.; KUMLEHN, J.; MELZER, M. Y RUTTEN, T. (2017). Dynamics of post-translationally modified histones during barley pollen embryogenesis in the presence or absence of the epi-drug trichostatin A. *Plant Reproduction*, 30: 95-105.
- PARRA-VEGA, V. (2015). Aspectos básicos y aplicados de la inducción de embriogénesis en microsporas de pimiento y colza. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de València, pp. 258.
- PAULS, K.P.; CHAN, J.; WORONUK, G.; SCHULZE, D. Y BRAZOLOT, J. (2006). When microspores decide to become embryos - cellular and molecular changes. *Canadian Journal of Botany*, 84: 668-678.
- NAJAFABADI, F.P.; SHARIATPANAH, M.E.; AHMADI, B.; SIMA, N.K.; ALIZADEH, B. Y OROOJLOO, M. (2015). Effects of Heat Shock and 2,4-D Treatment on Morphological and Physiological Characteristics of Microspores and Microspore-Derived Doubled Haploid Plants in Brassica napus L. *Iran Journal of Biotechnology*, 13: 31-38.
- QIN, Y.; WANG, Y.; LIU, O.; JIA, L.; FANG, W.; DU, J. Y WEI, Y. (2017). Tauroursodeoxycholic Acid Attenuates Angiotensin II Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation in Apolipoprotein E-deficient Mice by Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 53: 337-345.
- RAHMAN, H. (2013). Breeding spring canola (*Brassica napus* L.) by the use of exotic germplasm. *Canadian Journal of Plant Science*, 93: 363-373.
- RIVAS-SENDRA, A.; CAMPOS-VEGA, M.; CALABUIG-SERNA, A. Y SEGUÍ-SIMARRO, J.M. (2017). Development and characterization of an eggplant (*Solanum melongena*) doubled haploid population and a doubled haploid line with high androgenic response. *Euphytica*, 213: 89.
- RIVAS-SENDRA, A.; CORRAL-MARTÍNEZ, P.; CAMACHO-FERNÁNDEZ, C. Y SEGUÍ-SIMARRO, J.M. (2015). Improved regeneration of eggplant doubled haploids from microspore-derived calli through organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 122: 759-765.
- RODRIGUEZ-SANZ, H.; MORENO-ROMERO, J.; SOLIS, M.T.; KOHLER, C.; RISUENO, M.C. Y TESTILLANO, P.S. (2014). Changes in histone methylation and acetylation during microspore reprogramming to embryogenesis occur concomitantly with Bn HKMT and Bn HAT expression and are associated with cell totipotency, proliferation, and differentiation in Brassica napus. *Cytogenetic and Genome Research*, 143: 209-218.
- RUBERTI, C. Y BRANDIZZI, F. (2014). Conserved and Plant-Unique Strategies for Overcoming Endoplasmic Reticulum Stress. *Frontiers in Plant Science*, 5: 69.
- SAKATA, Y. Y LESTER, R.N. (1997). Chloroplast DNA diversity in brinjal eggplant (*Solanum melongena* L.) and related species. *Euphytica*, 97: 295-301.
- 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, pp 448.

- SEGUÍ-SIMARRO, J.M.; CORRAL-MARTÍNEZ, P.; PARRA-VEGA, V. Y GONZÁLEZ-GARCÍA, B. (2011). Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. *Plant Cell Reports*, 30: 765-778.
- SEGUÍ-SIMARRO, J.M. Y NUEZ, F. (2008). How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 134: 1-12.
- 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. cv Topas. *Journal of Structural Biology*, 142: 379-391.
- SHARIATPANAH, 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.
- SIMMONDS, D.H. Y KELLER, W.A. (1999). Significance of preprophase bands of microtubules in the induction of microspore embryogenesis of *Brassica napus*. *Planta*, 208: 383-391.
- SISSENER, N.H.; ORNSRUD, R.; SANDEN, M.; FROYLAND, L.; REMO, S. Y LUNDEBYE, A.K. (2018). Erucic Acid (22:1n-9) in Fish Feed, Farmed, and Wild Fish and Seafood Products. *Nutrients*, 10: 1443.
- STUBER, C.W. (1994). Heterosis in plant breeding. *Plant Breeding Reviews*, 12: 227-251.
- 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. (2018). Stress-Induced Microspore Embryogenesis in Crop Plants: Cell Totipotency Acquisition and Embryo Development, en: *Progress in Botany*. Springer. Cham: 227-241.
- TESTILLANO, P.S.; CORONADO, M.J.; SEGUÍ-SIMARRO, J.M.; DOMENECH, J.; GONZALEZ-MELENDI, P.; RASKA, I. Y RISUEÑO, M.C. (2000). Defined nuclear changes accompany the reprogramming of the microspore to embryogenesis. *Journal of Structural Biology*, 129: 223-232.
- TOURAEV, A.; PFOSSER, M. Y HEBERLE-BORS, E. (2001). The microspore: A haploid multipurpose cell. *Advances in Botanical Research*, 35: 53-109.
- USDA, NRCS National Plant Data Team. (2020a). [last checked June 2020] <https://plants.sc.egov.usda.gov/core/profile?symbol=BRNA>
- USDA, NRCS National Plant Data Team. (2020b). [last checked June 2020] <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=SOME>
- 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.
- YAN, G.; LIU, H.; WANG, H.; LU, Z.; WANG, Y.; MULLAN, D.; HAMBLIN, J. Y LIU, C. (2017). Accelerated generation of selfed pure line plants for gene identification and crop breeding. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1786.
- YANG, X.; SRIVASTAVA, R.; HOWELL, S.H. Y BASSHAM, D.C. (2016). Activation of autophagy by unfolded proteins during endoplasmic reticulum stress. *The Plant Journal*, 85: 83-95.
- ZHANG, L.; ZHANG, Y.; GAO, Y.; JIANG, X.; ZHANG, M.; WU, H.; LIU, Z. Y FENG, H. (2016). Effects of histone deacetylase inhibitors on microspore embryogenesis and plant regeneration in Pakchoi (*Brassica rapa* ssp. *chinensis* L.). *Scientia Horticulturae*, 209: 61-66.
- 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. Berlin: 35-52.