



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la  
Agrodiversidad Valenciana

Efecto de la modulación hormonal en el cultivo de  
microsporas de Brassica napus

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Mejora Genética Vegetal

AUTOR/A: Sancho Oviedo, Daniel

Tutor/a: Seguí Simarro, José María

Director/a Experimental: CALABUIG SERNA, ANTONIO

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

**Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la  
Agrodiversidad Valenciana**



**Efecto de la modulación hormonal en el cultivo de  
microsporas de *Brassica napus***

Trabajo Fin de Máster

Máster Oficial en Mejora Genética Vegetal

**Autor/a: Sancho Oviedo, Daniel**

**Tutor/a: Seguí Simarro, José María**

**Director/a Experimental: Calabuig Serna, Antonio**

**Curso Académico: 2023/2024**

## Resumen

La obtención de individuos dobles haploides (DHs) es una útil alternativa a las técnicas convencionales de mejora genética vegetal para la obtención de líneas puras, necesarias para producir semilla híbrida comercial a gran escala. De los distintos abordajes biotecnológicos disponibles para generar líneas DH, el cultivo de microsporas aisladas para inducir su desarrollo como embriones haploides y DH es la técnica más utilizada y eficiente. Siempre y cuando, eso sí, estén optimizados los protocolos para ello. La regulación de los niveles de las distintas hormonas vegetales es clave para un correcto desarrollo del embrión cigótico dentro de la semilla. Es lógico suponer que, en el caso de la embriogénesis *in vitro*, la situación será parecida. De hecho, en casi todas las especies en las que la embriogénesis de microsporas es posible, resulta necesario añadir distintos niveles de hormonas al medio de cultivo. Resultados previos de nuestro grupo demostraron que genotipos con distinta eficiencia en la respuesta a la embriogénesis de microsporas, muestran también perfiles hormonales muy distintos durante la inducción y el desarrollo embriogénico. De esto se deduce que tratar de imitar los perfiles hormonales de los genotipos de alta respuesta en los medios de cultivo de microsporas de genotipos de baja respuesta, podría incrementar la respuesta de estos últimos. En este trabajo se realizaron ensayos de modulación de los niveles hormonales durante el cultivo de microsporas de dos líneas de colza (*Brassica napus*) con diferente respuesta a la inducción de embriogénesis. En diferentes etapas del cultivo de microsporas, se modularon los niveles de las principales hormonas implicadas en la embriogénesis, el ácido indolacético (IAA) y el ácido abscísico (ABA), añadiéndolas directamente al cultivo para incrementar sus niveles, o añadiendo inhibidores específicos para reducir dichos niveles. El efecto de la modulación se midió sobre la producción de embriones derivados de microsporas en las dos líneas.

**Palabras clave:** Androgénesis; Biotecnología; *Brassica napus*; colza; cultivo *in vitro*; dobles haploides; embriogénesis; haploide; hormonas; microsporas.

## Abstract

The generation of doubled haploid (DH) individuals is a useful alternative to conventional plant breeding techniques for production of pure lines, necessary to produce commercial hybrid seed at a large scale. Among the different biotechnological approaches available to generate DH lines, *in vitro* microspore culture to induce their development as haploid and DH embryos is the most widely used and efficient technique. Provided, however, that the protocols are optimized for this purpose. The regulation of the levels of the different plant hormones is key for the correct development of the zygotic embryo inside the seed. Reasonably, in the case of *in vitro* embryogenesis, the situation would be similar. In fact, in almost all species where microspore embryogenesis is possible, different levels of hormones must be added to the culture medium. Previous results from our group showed that genotypes with different efficiency in their microspore embryogenesis response also show very different hormone profiles during embryogenic induction and development. Thus, trying to mimic the hormonal profiles of high-response genotypes in the microspore culture media of low-response genotypes could increase the response of the latter. In this work, we modulated the levels of hormones during microspore culture in two *Brassica napus* lines with different responses to embryogenesis induction. At different stages of the culture, the levels of the main hormones involved in embryogenesis, indole acetic acid (IAA) and abscisic acid (ABA), were modulated by adding them directly to the culture to increase their levels, or by adding specific inhibitors in order to reduce their levels. The effect of modulation was measured on the basis of the production of microspore-derived embryos in the two lines.

**Keywords:** Androgenesis; Biotechnology; *Brassica napus*; doubled haploids; embryogenesis; haploid; hormones; *in vitro* culture; microspores.

## **Agradecimientos**

En primer lugar, querría agradecer al Dr. Seguí por toda su ayuda y por la oportunidad que me dio de formar parte de este proyecto, así como por la confianza depositada en mí desde el comienzo.

Del mismo modo, agradecer a mis compañeros de laboratorio, Tono y Ricardo, por su continua ayuda y apoyo y, sobretodo, por su paciencia conmigo. No sabéis cuánto he aprendido gracias a haber podido trabajar día a día junto a dos científicos como vosotros.

A toda mi familia y amigos por su cariño y por hacerme sentir respaldado en las decisiones más difíciles y los momentos más duros. Especialmente, gracias mamá.

Y finalmente, aunque no sabe leer, a mi perrita Fonta. Te quiero mucho mi chiquitina.

# Índice

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
Líneas puras, híbridos y su papel en la agricultura .....	1
Haploides y DHs: Obtención y aplicaciones .....	2
Androgénesis y embriogénesis de microsporas .....	6
La colza .....	9
Importancia de la colza en la embriogénesis de microsporas .....	10
Las hormonas y su papel en la embriogénesis de microsporas.....	11
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
Material vegetal .....	14
Extracción de microsporas .....	14
Recuento celular .....	16
Cultivo de microsporas.....	17
Tratamientos hormonales.....	18
Análisis estadístico .....	20
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>22</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>34</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>40</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>41</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>46</b>

## Índice de figuras

Figura 1. Diferentes rutas para la producción de embriones haploides vía androgénesis.....	5
Figura 2. Microsporas de colza en estadio idóneo para el cultivo.....	8
Figura 3. Relaciones filogenéticas entre especies del género <i>Brassica</i> .....	9
Figura 4. Distintas fases del proceso de extracción de microsporas .....	16
Figura 5. Fases del cultivo de microsporas de la línea DH4079 .....	22
Figura 6. Recuento de embriones del cultivo DH12075 con presencia de IAA durante todo el cultivo.....	24
Figura 7. Recuento de embriones del cultivo DH12075 con presencia de IAA hasta el quinto día de cultivo .....	25
Figura 8. Recuento de embriones del cultivo DH12075 con presencia de Auxinole desde el tercer día de cultivo y con lavado a día 4.....	26
Figura 9. Recuento de embriones del cultivo DH12075 con presencia de la concentración 2 $\mu$ M de Auxinole desde el tercer día de cultivo, lavado a día 4 y aplicación a día 4 hasta día 6 de IAA.....	27
Figura 10. Recuento de embriones del cultivo DH12075 con presencia de Bepridil desde el tercer día de cultivo y con lavado a día 4.....	28
Figura 11. Recuento de embriones del cultivo DH12075 con presencia de BBo desde el tercer día de cultivo y con lavado a día 4 .....	29
Figura 12. Recuento de embriones del cultivo DH4079 con presencia de ABA desde el tercer día de cultivo y con lavado a día 4 .....	30
Figura 13. Recuento de embriones del cultivo DH4079 con presencia continuada de Abamine SG desde el segundo día de cultivo.....	31
Figura 14. Recuento de embriones del cultivo de DH12075 con presencia continua de AA1 desde el inicio del cultivo .....	32
Figura 15. Recuento de embriones del cultivo DH12075 con presencia de AA1 desde el inicio del cultivo y lavado a día 4.....	33
Figura A.1. Concentraciones de IAA en ambos genotipos a lo largo del tiempo y fases del desarrollo embrionario .....	46
Figura A.2. Perfil hormonal de IAA a lo largo del desarrollo cultivo para los diferentes ensayos .....	46
Figura A.3. Concentraciones de ABA en ambos genotipos a lo largo del tiempo y fases del desarrollo embrionario .....	47
Figura A.4. Perfil hormonal de ABA a lo largo del cultivo para los diferentes ensayos .....	47

## Índice de tablas

Tabla 1. Composición del medio NLN-13 .....	15
Tabla 2. Tratamientos aplicados al cultivo de microsporas durante el ensayo de IAA.....	18
Tabla 3. Tratamientos aplicados al cultivo de microsporas durante el ensayo de Auxinole .	19
Tabla 4. Tratamientos aplicados al cultivo de microsporas durante el ensayo de Bepridil...	19
Tabla 5. Tratamientos aplicados al cultivo de microsporas durante el ensayo de BBo.....	19
Tabla 6. Tratamientos aplicados al cultivo de microsporas durante el ensayo de ABA .....	20
Tabla 7. Tratamientos aplicados al cultivo de microsporas durante el ensayo de Abamine SG .....	20
Tabla 8. Tratamientos aplicados al cultivo de microsporas durante el ensayo de AA1 .....	20



# **INTRODUCCIÓN**

## **Líneas puras, híbridos y su papel en la agricultura**

La mejora genética vegetal ha acompañado a la civilización humana desde sus albores. Los primeros agricultores ya la practicaban de un modo inconsciente al seleccionar ejemplares, variedades o especies por las que sintieran predilección (Koh *et al.*, 2015). Aunque estas técnicas eran rudimentarias en comparación con las actuales, permitieron la obtención de las primeras variedades vegetales. Estas, debido a la selección “a ciegas” realizada por los agricultores y a la gran diversidad genética que existía, presentaban gran plasticidad y diversidad genéticas, permitiéndoles hacer frente a múltiples condiciones agronómicas y climáticas a la vez que conservaban aquellos caracteres de interés por los que fueron seleccionadas.

Si bien la diversidad genética de nuestros cultivos sigue siendo un factor clave para el avance de la actividad agrícola, los productores también demandan homogeneidad en sus cultivos, lo cual implica la necesidad de equilibrar ambos aspectos. Los agricultores buscan variedades que posean ciertas características de interés y buen rendimiento en campo, pero que al mismo tiempo generen cosechas homogéneas que faciliten el mantenimiento, recolección y venta de sus productos. De este modo surgió desde finales del siglo XIX el interés por las denominadas líneas puras.

Una línea pura es un conjunto de individuos homocigotos para todos sus *loci*. Estas líneas han resultado de gran interés para la mejora genética vegetal debido a su capacidad de reducir la variación en la respuesta que darán los cultivos en los que son utilizadas, así como por su papel en la producción de híbridos comerciales. Cruzando dos líneas puras distintas con características de interés, es posible crear híbridos homogéneos entre sí que, además de características agronómicas de interés, posean un alto grado de heterosis. La heterosis es un fenómeno en el cual las progenies híbridas presentan mejores aptitudes que sus parentales (Saeki *et al.*, 2016). Es por ello una característica muy estimada en la producción vegetal.

Este interés de los productores por la obtención de híbridos comerciales ha sido en gran medida el factor que principalmente ha fomentado el estudio y producción de líneas puras. Tradicionalmente se ha recurrido a programas de producción de líneas puras basados en cruces recurrentes, generación tras generación, entre individuos

seleccionados de la población. De este modo, la producción de la línea pura resulta costosa tanto en recursos como en tiempo y en muchas ocasiones no se consigue una homocigosis total debido a fenómenos de ligación y baja tasa de recombinación en algunos loci (Martín, 2002). Alternativamente, se han descrito e implementado múltiples metodologías para la producción de líneas puras que generan resultados mejores y, sobre todo, más rápidos. Entre ellas destaca la producción de individuos dobles haploides (DHs).

## Haploides y DHs: Obtención y aplicaciones

Un individuo haploide es aquel que posee una dotación genética equivalente a la mitad de la descrita en su especie. Es decir, posee el número de cromosomas que encontraríamos en los gametos de su especie. A diferencia de la gran mayoría de animales, las plantas haploides son capaces de continuar su desarrollo, aunque presentan un porte y vigor menores, así como esterilidad, lo que las hace inviables para producir semilla. Su interés se limita a la investigación. No obstante, es posible que se llegue a dar una duplicación del genoma espontáneamente recuperando la dotación cromosómica característica de su especie. Del mismo modo, es también posible inducir la duplicación del genoma haploide mediante tratamientos específicos con antimitóticos, como la colchicina y la orizalina entre otros. En ambos casos se obtienen individuos DHs que, por provenir de la duplicación de un genoma inicialmente haploide, presentan exactamente los mismos alelos en todos y cada uno de sus loci. Son, por tanto, líneas puras 100% homocigotas.

En la actualidad encontramos múltiples técnicas para la producción de embriones haploides y DHs:

- **Cruces interespecíficos:** Consiste en la obtención de individuos haploides a través de la interacción entre el polen de uno de los parentales con el gineceo del otro parental siendo ambos de especies distintas. La incompatibilidad de la fecundación es capaz de inducir el desarrollo de embriones haploides a partir de uno de los gametos involucrados. Una de las primeras descripciones de este fenómeno la encontramos ya en la década de los 70 con el conocido como *método bulbosum* (Kasha y Kao, 1970). En él, a través del cruce entre la cebada (*Hordeum vulgare*) y un pariente silvestre incompatible, *Hordeum bulbosum*, se conseguían plantas

haploides de cebada tras la progresiva eliminación de los cromosomas de *Hordeum bulbosum*.

De este modo, los cruces interespecíficos se han utilizado también en otros cultivos de gran importancia como el trigo para generar haploides a través de la polinización con polen de especies como cebada y maíz (Ishii *et al.*, 2016). De gran interés es también el hallazgo de una alta tasa de producción de DHs (98%) en *Brassica napus* a través de la polinización con una *Brassica* alooctaploide creada artificialmente (Fu *et al.*, 2018).

- **Uso de líneas inductoras de haploidía:** si bien es una metodología limitada a un número reducido de especies, se han descrito experiencias con resultados positivos en la producción de embriones haploides. Se basa en el uso de líneas que presentan en determinados *loci* mutaciones que impiden o bien el adecuado desarrollo del gameto o la doble fecundación, generándose embriones haploides que pueden ser tanto de origen materno como paterno. Un ejemplo de esta metodología lo encontramos en maíz, donde en sus inicios fueron de gran importancia las líneas “Stock6-derived” (Coe, 1959). Gracias a estas se continuaron obteniendo nuevas líneas inductoras de haploides en maíz. Sin embargo, en otras especies la técnica ha presentado limitaciones.

En la actualidad se ha incrementado el interés en esta técnica gracias a los avances conseguidos con ingeniería genética centrada en *CENH3*, una histona centromérica cuya mutación ha permitido la obtención de líneas haploides tanto en maíz como en otras especies como *Arabidopsis thaliana* o *Brassica juncea* (Gilles *et al.*, 2017; Ren *et al.*, 2017). Con todo ello, su presencia en programas de mejora de cultivos sigue siendo muy limitada debido a las restricciones que el marco legal sobre organismos modificados genéticamente implica para los productores.

- **Inducción de ginogénesis:** técnica basada en la inducción del desarrollo del gameto femenino como embrión haploide sin fecundación. En ella se recurre al cultivo *in vitro* de flores no fecundadas, ovarios e incluso directamente óvulos, con el fin de inducir el desarrollo embriogénico de la célula huevo. Un ejemplo de la técnica consiste la polinización con polen tratado (incapaz de fecundar) para disparar una respuesta de inducción del desarrollo de los óvulos, pudiendo ser estos cultivados *in vitro*. En la actualidad sigue muy limitada a determinados cultivos, donde el resto de técnicas no han sido exitosas, especialmente en bulbosas. Un ejemplo lo

encontramos en la producción de DHs en cebolla (*Allium cepa* L.) través del cultivo de botones florales y una posterior duplicación cromosómica de los haploides surgidos (Alan, 2021). Ante otras técnicas como la inducción de androgénesis presenta un rendimiento menor debido a la gran diferencia entre el reducido número de óvulos que produce una flor frente a la gran cantidad de microsporas que puede producir cada antera de cada flor.

- **Inducción de androgénesis:** técnica basada en el uso de los precursores del gametofito masculino con el fin de inducir su desarrollo como embriones haploides. Aunque no exclusivamente, el precursor más ampliamente utilizado y que mejores resultados proporciona son las microsporas, bien cultivadas *in vitro* dentro de la antera o bien aisladas y cultivadas en medio líquido. A este proceso se le conoce como *embriogénesis de microsporas*. Descrito por primera vez en 1964 a través del cultivo de anteras en *Datura innoxia* (Guha y Maheshwari, 1964), se trata de un proceso experimental, *in vitro*, estudiado en multitud de especies, si bien algunas siguen siendo un desafío debido a su recalcitrancia. En las especies en las que existen protocolos optimizados y eficientes de cultivo *in vitro* de anteras o microsporas aisladas, este es el abordaje más utilizado para la producción de embriones DHs debido a su relativa simplicidad técnica y elevado rendimiento. Paralelamente, existen otras metodologías dentro de la androgénesis como la eliminación del genoma materno tras la fecundación y la desviación del desarrollo del meiocito hacia un desarrollo *in vitro* (Seguí-Simarro, 2010), pero su uso no es tan frecuente como la embriogénesis de microsporas, por ser su eficiencia mucho menor.

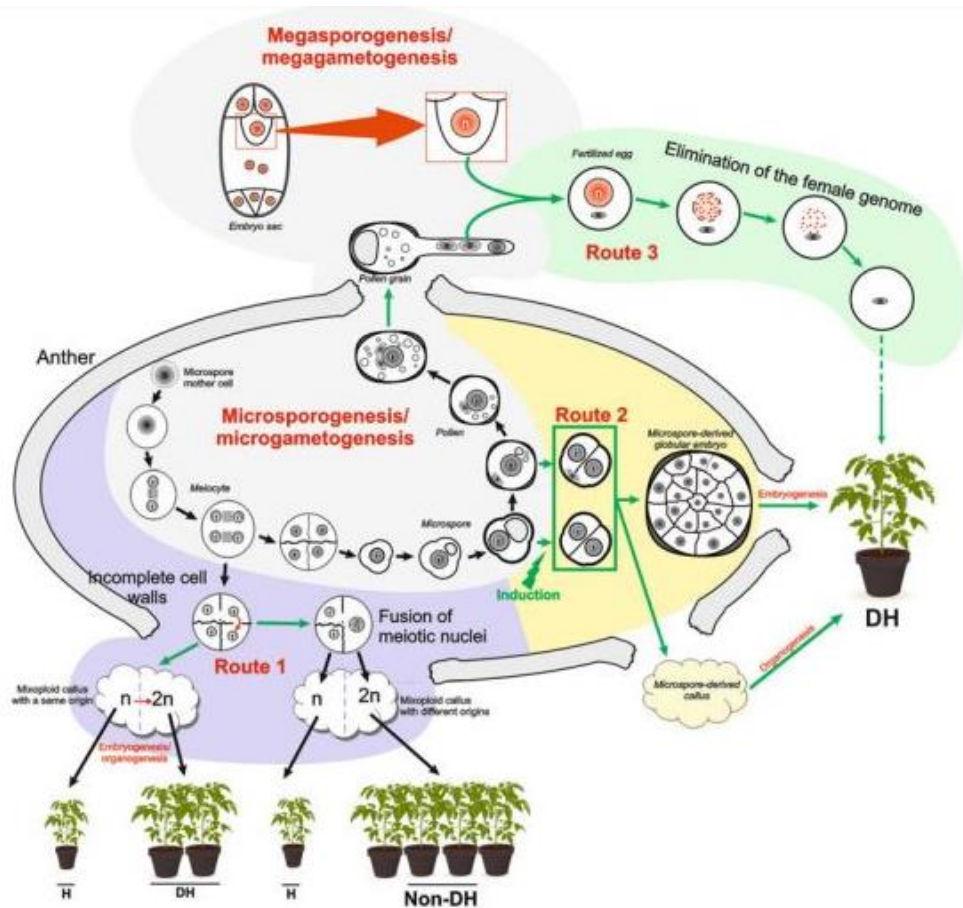


Figura 1. Diferentes rutas para la producción de embriones haploides vía androgénesis: (*Route 1*) desviación del meiocito hacia la proliferación *in vitro*; (*Route 2*) reprogramación del desarrollo de microsporas hacia la producción embriónica; (*Route 3*) eliminación del genoma materno tras la fecundación (Seguí-Simarro, 2010)

En la actualidad, las aplicaciones de los individuos DHs abarcan multitud de campos, tanto aplicados como experimentales (Weyen, 2021). Entre sus principales utilidades encontramos:

- Producción de Líneas Puras: la producción de embriones haploides y su duplicación genómica hasta individuos DH permite obtener líneas 100% homocigotas en todos sus *loci* en una única generación.
- Fijación de variación genética y genotipos de interés: el uso de DHs acelera los programas de mejora y producción de híbridos al reducirse el número de cruces, y por tanto generaciones, necesarios para fijar los caracteres de interés en la descendencia.
- Mapeos genómicos y selección asistida por marcadores: la homocigosis en todos los loci de los DH permite estudios y mapeos genómicos que revelen regiones

fuertemente ligadas y marcadores que podrían haber quedado ocultos a través de otras técnicas.

- Selección y predicción genómica: la selección recurrente de descendientes de individuos DH permite una mayor facilidad para trabajar con caracteres de baja heredabilidad. Esto es debido a que, si un carácter presenta baja heredabilidad, el fenotipo resultante es muy dependiente de las condiciones ambientales. Por ello, gracias a la total homocigosis de los DHs podemos eliminar la componente genética de la varianza fenotípica observada y atribuir las diferencias fenotípicas a diferencias ambientales, las cuales pueden llegar a ser controladas. Si controlamos el ambiente, aseguraremos siempre la misma respuesta entre los homocigotos para los mismos alelos, pudiendo ser fácilmente seleccionados los que posean los caracteres de interés. Además, la obtención de DHs de variedades existentes puede utilizarse como herramienta para purgarlas de alelos ineficientes e incluso predecir los mejores genotipos posibles.
- Transformación y edición genética: a través de la transformación o edición genética de un individuo y la producción de embriones DHs a partir de él (seleccionando los que posean la modificación en caso de no ser un evento presente en todos los individuos) podemos acelerar la fijación de esta modificación en homocigosis.
- Reverse Breeding: esta técnica se basa en el uso de híbridos con el fin de desvelar el genotipo de sus parentales. A través de la producción de DHs a partir de gametos no recombinantes de estos híbridos, podemos conocer el genotipo de los parentales que se cruzaron para la obtención del híbrido.

## **Androgénesis y embriogénesis de microsporas**

La embriogénesis de microsporas consiste en inducir la formación de embriones a partir de las microsporas presentes en los sacos polínicos del androceo. Estas células haploides surgen tras la meiosis de la célula madre del polen durante el desarrollo gametofítico que se da en el microsporangio. Son pues estadios precursores del gametofito masculino, conocido como polen. Así, a través del estrés inherente a las condiciones del cultivo *in vitro* y la aplicación en algunos casos de estreses adicionales, como choques térmicos, osmóticos o ayuno forzado, se consigue reprogramar el desarrollo gametofítico de estas microsporas hacia la vía esporofítica. De este modo se induce la producción de embriones haploides. La relativa simplicidad y alto rendimiento de esta

técnica en comparación con otras metodologías resultan clave para comprender su prometedor papel en la producción de DHs.

Existen dos metodologías para la inducción de embriogénesis de microsporas: el cultivo de anteras y el cultivo de microsporas aisladas.

En el cultivo de anteras, a través del aislamiento de las anteras en un medio de cultivo adecuado, es posible inducir el desarrollo como embriones de las microsporas contenidas en los sacos polínicos. Entre las ventajas de esta metodología encontramos su simplicidad tanto en la técnica como en medios de cultivo necesarios ya que al no haber extraído las microsporas de su entorno natural, están en interacción con el tejido que conforma la antera, el cual les aporta nutrientes y protección, facilitando su supervivencia. Su permanencia en la antera durante el cultivo *in vitro* supone también una de sus principales desventajas, ya que las propias dimensiones de la antera limitan la capacidad de crecimiento de los embriones, pudiendo surgir competencia por el espacio, reduciéndose el rendimiento de producción de embriones. Otra desventaja del cultivo de anteras es el riesgo de producción de callos y embriones diploides (no DHs) derivados del tejido somático de las anteras, que también está presente en el cultivo. Esto hace necesario analizar el origen de cada embrión producido con el fin de asegurar la presencia únicamente de los deseados embriones derivados de microsporas.

Por su parte, en el cultivo de microsporas aisladas se extraen las microsporas de las anteras para cultivarlas aisladas *in vitro* en medios de cultivo generalmente líquidos. Esta metodología resuelve las problemáticas encontradas en el cultivo de anteras, ya que no existen limitaciones espaciales para el desarrollo de las microsporas, ni existe el riesgo de encontrar estructuras diploides (no DHs) ya que únicamente se cultivan precursores haploides. En aquellas especies donde los protocolos están optimizados, es también un método más rápido que el respectivo cultivo de anteras. En cuanto a sus limitaciones, el cultivo de microsporas aisladas implica una mayor complejidad tanto técnica como en la composición de los medios de cultivo, al no estar presente el tejido de las anteras que protegía y nutría a las microsporas. Por ello sus protocolos deben ser altamente adaptados y optimizados ya que los aislados de microsporas son muy sensibles al entorno físico-químico *in vitro*, pudiendo sufrir grandes pérdidas de rendimiento productivo simplemente por pérdida de viabilidad de las microsporas. Sin embargo, una vez se consigue optimizar el proceso, el cultivo de microsporas aisladas resulta una opción más productiva que el cultivo de anteras, lo cual ha generado que

sea la tendencia mayoritaria en la producción de DHs en aquellas especies donde existen protocolos eficientes.

Con independencia de la metodología elegida, es necesario conocer el desarrollo y avance de la gametogénesis de aquella especie con la que se desee trabajar, ya que en la mayoría de especies la inducción de la embriogénesis de microsporas solamente es posible cuando la inducción se realiza alrededor de la primera mitosis del polen, que corresponde a los estadios de microspora madura (vacuolada) y polen bicelular joven, recién dividido (Seguí-Simarro *et al.*, 2008). Es por ello que conocer marcadores que permitan seleccionar muestras con microsporas en los estadios de desarrollo adecuados para la inducción aumentará la eficiencia de la técnica. Un ejemplo lo encontramos en la relación entre la longitud del botón (yema) floral y el estadio de desarrollo de las microsporas en especies como pimiento, berenjena y colza (Parra-Vega *et al.*, 2013; Rivas-Sendra *et al.*, 2019; Corral-Martínez *et al.*, 2021).

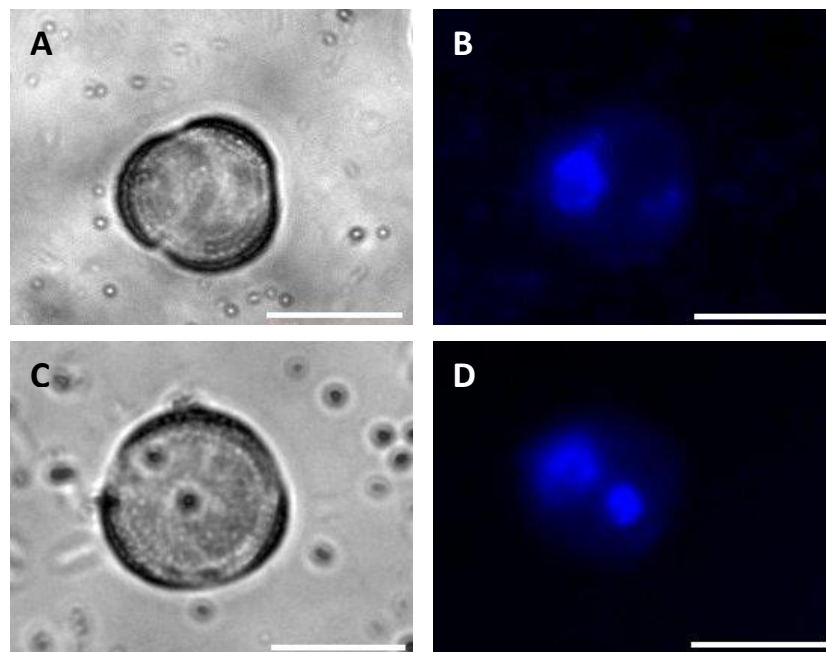


Figura 2. Microsporas de colza en estadio idóneo para el cultivo. (A) Microspora vacuolada en campo claro; (B) Microspora vacuolada teñido con DAPI; (C) Polen bicelular joven en campo claro; (D) Polen bicelular joven teñido con DAPI. Barras: 10  $\mu$ m.



## La colza

La colza (*Brassica napus*) es una especie vegetal de la familia *Brassicaceae*. Su centro de origen es todavía foco de debate entre la comunidad científica, habiendo algunos defensores de un origen mediterráneo frente a otros que defienden múltiples orígenes (Rakow, 2004). Con independencia de ello, sí es conocido su origen evolutivo, tratándose de un anfidiplóide con cuatro dotaciones cromosómicas no homólogas (AACC; n=19) surgido de la hibridación entre *Brassica rapa* (AA, n=10) y *Brassica oleracea* L. (CC, n=9) (OECD, 2012). La especie comprende diversas variedades y subespecies, como *Brassica napus* L. var. *rapifera*, *Brassica napus* L. subsp. *napus* y *Brassica napus* L. var. *oleifera*, conocida esta última comúnmente como colza.

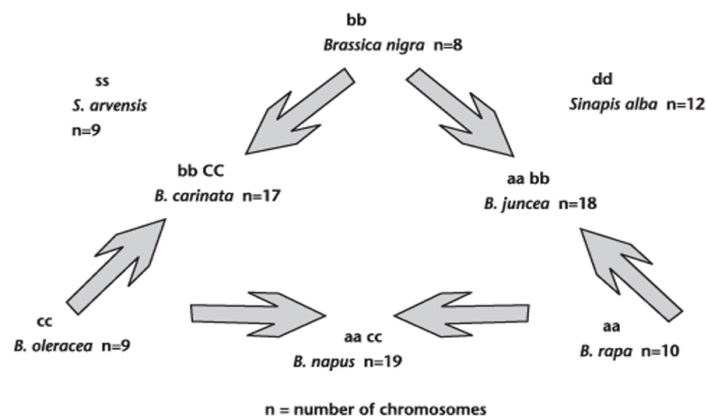


Figura 3. Relaciones filogenéticas entre especies del género *Brassica*. (Canola Council of Canada, 2016).

La colza tiene un gran interés agronómico debido a su semilla oleaginosa de la que se obtiene aceite para uso tanto industrial como de consumo humano y de ganado. En el año 2020 se produjo un total de 69.2 millones de toneladas de colza, situándose como el segundo cultivo oleaginoso más producido mundialmente, solo por detrás de la soja (FAO, 2020). Para ser apto para el consumo humano, el aceite de colza debe contener menos de un 2% de ácido erúico. Por ello, se han desarrollado diversos programas de mejora enfocados en obtener variedades con reducidos niveles de este ácido, hasta surgir las variedades actualmente producidas. Sin embargo, todavía existen múltiples posibilidades de mejora para reducirlo aún más, e incluso mejorar otras características de interés más allá de su uso oleaginoso.

La producción de tortas proteicas para el consumo del ganado otra vía de interés para los productores de colza. Los análisis nutricionales de las tortas resultantes del procesado de colza revelan niveles proteicos del 38%, muy cercanos a los que se

encuentran en otros alimentos de origen vegetal como la soja donde el porcentaje proteico es del 44%. Además, la proteína presente en ellos era equivalente en composición a la presente en productos lácteos o derivados de soja (So y Duncan, 2021). Del mismo modo, más allá de interés por las propiedades nutricionales, también resultan muy interesantes los programas que buscan mejorar la resistencia de la colza ante patógenos y enfermedades que afectan a su producción. Un ejemplo es la identificación de hasta 23 genes candidatos a conferir resistencia a la podredumbre seca o “Blackleg”, una enfermedad fúngica causada por *Leptosphaeria maculans* que puede llegar a producir pérdidas del rendimiento de más de un 80% en genotipos susceptibles (Dolatabadian *et al.*, 2022). Los programas de mejora de estas resistencias podrían verse acelerados gracias a las metodologías de producción de DHs. Es decir, aún existen muchos aspectos mejorables en este cultivo y es en este ámbito donde jugará un papel crucial la producción de DHs en colza.

## **Importancia de la colza en la embriogénesis de microsporas**

Uno de los factores clave para el éxito de la inducción de DHs es el genotipo de las plantas utilizadas. Son múltiples las especies e incluso variedades dentro de una especie que presentan recalcitrancia a la inducción de embriones derivados de microsporas. Por ello, una importante vía de estudio es tratar de elucidar cómo conseguir inducir en ellas embriogénesis de microsporas. Existen también diversas especies donde la metodología ha sido ampliamente estudiada y son consideradas especies modelo. Este es el caso de la colza, donde el gran rendimiento en embriones de algunas líneas y la simplicidad del cultivo *in vitro* de sus microsporas ha popularizado su empleo como modelo experimental para el estudio del proceso de la inducción de la embriogénesis de microsporas y el posterior desarrollo *in vitro* de los embriones derivados de ellas (Ferrie y Caswell, 2010; Corral-Martínez *et al.*, 2021).

Existen diferentes genotipos de colza que poseen una alta respuesta a la inducción de embriones a partir de microsporas aisladas, como la línea DH4079. Otros, como la línea DH12075, presentan una baja respuesta ante los mismos métodos de inducción (Corral-Martínez *et al.*, 2021). Las líneas de baja respuesta son de gran interés para la investigación, ya que conocer el motivo de su baja respuesta ante el mismo estímulo

puede aportar información valiosa sobre el proceso de la embriogénesis de microsporas, qué factores lo regulan, y cómo mejorar su eficiencia.

## **Las hormonas y su papel en la embriogénesis de microsporas**

Las distintas fitohormonas son elementos clave en múltiples procesos fisiológicos, incluido el desarrollo embrionario. Existen estudios que han hallado similitud en las variaciones de los perfiles hormonales durante el desarrollo de embriones convencionales y de los producidos por cultivo de microsporas. Más allá de su utilidad como modelo *in vitro* para estudiar el papel de las hormonas durante el desarrollo embrionario (Hays et al., 2001), el sistema de inducción de embriogénesis de microsporas en colza se plantea como un sistema muy útil para el estudio del efecto hormonal durante la inducción de embriogénesis, con el fin de encontrar pautas para su optimización.

Uno de los grupos de fitohormonas más ampliamente estudiados es el de las auxinas. Estas cumplen múltiples funciones en el desarrollo y señalización celular, siendo clave su acumulación para la correcta diferenciación de los embriones (Verma *et al.*, 2021). Esta función de organización y reprogramación celular ha sido también observada en experimentos con embriones producidos a partir del cultivo de microsporas de colza, donde se observó una acumulación de auxinas endógenas en aquellas microsporas que reprogramaron su desarrollo hacia la embriogénesis (Prem et al., 2012; Rodríguez-Sanz et al., 2015).

Otra fitohormona de gran importancia en este proceso es el ácido abscísico (ABA). Su papel en los procesos de respuesta a estreses en los vegetales debería de antemano hacernos pensar en su relevancia en el proceso de embriogénesis de microsporas donde gracias a la aplicación de estreses abióticos se reprograma el desarrollo de las mismas. Así, se ha observado que la aplicación exógena de ABA sobre un cultivo de microsporas de berenjena promovía la división celular y la formación de callos (Corral-Martínez y Seguí-Simarro, 2014).

Si bien estos dos ejemplos de fitohormonas suelen ser los más relevantes durante el desarrollo embriogénico, hay otras fitohormonas con un papel en este proceso. Se sabe que la aplicación de algunas citoquininas sobre cultivos de microsporas en cítricos

incrementa la respuesta embriogénica (Chiancone *et al.*, 2015). Por otra parte, hormonas como las giberelinas son conocidas por su capacidad de producir elongación en células cultivadas *in vitro*, pero algunos estudios realizados en especies recalcitrantes sugieren que no poseen un papel clave en el éxito de la embriogénesis de microsporas (Lulsdorf *et al.*, 2012).

Finalmente, uno de los estudios más recientes sobre el papel de las fitohormonas sobre la embriogénesis de microsporas lo encontramos en ensayos realizados por nuestro grupo, todavía no publicados. En ellos, se estudió la acumulación de IAA y ABA durante el cultivo de microsporas de dos líneas de colza con diferentes potenciales de inducción de embriogénesis de microsporas (DH4079 y DH12075), así como el perfil hormonal existente a lo largo del proceso de embriogénesis de microsporas. Los resultados obtenidos (ANEXO 1) mostraron diferencias entre ambas líneas, tanto en la acumulación de las fitohormonas, como en el perfil hormonal existente durante el proceso. Estas diferencias fueron la base sobre la que se diseñaron los ensayos recogidos en este trabajo.

Con todo ello, resulta evidente que las hormonas vegetales, tanto las endógenas como la aplicadas exógenamente, jugarán un papel fundamental en el desarrollo de los embriones durante el cultivo de microsporas. Su presencia, ausencia e interacciones serán clave para explicar los resultados obtenidos en la embriogénesis de microsporas. De este modo, profundizar en el estudio del efecto de la adición de hormonas y sustancias antagónicas e inhibitoras de las mismas al cultivo resulta una interesante vía para la mejora de los protocolos de inducción embriogénica de microsporas.

## **OBJETIVOS**

El objetivo de este estudio fue analizar el efecto de la modificación de los perfiles hormonales sobre la inducción de embriogénesis de microsporas en dos líneas de colza con diferentes potenciales de producción de embriones. Para ello se recurrió a la aplicación exógena de fitohormonas y compuestos que pudieran intervenir en sus rutas de señalización con los siguientes objetivos:

- Estudiar el efecto sobre la embriogénesis de microsporas de incrementar los niveles de ácido indolacético (IAA) y ácido abscísico (ABA).
- Estudiar el efecto sobre la embriogénesis de microsporas de la inhibición de la señalización de las fitohormonas anteriores a través de inhibidores específicos.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Material Vegetal**

Se utilizaron dos líneas DH de colza como plantas donantes para la extracción de microsporas. Estas fueron la línea de alta respuesta embriogénica DH4079 derivada del cultivar Topas (Ferrie y Möllers, 2011) y la línea de baja respuesta embriogénica DH12075, derivada del cruce entre las líneas Westar y Cresor (Malik *et al.*, 2008).

Ambas líneas donantes se cultivaron desde semilleros, pasándolas a maceta a partir de la aparición de las primeras hojas verdaderas. Durante su crecimiento vegetativo se mantuvieron en cámara de cultivo en condiciones térmicas de 23°C. Una vez se observaban las primeras inflorescencias, las plantas eran pasadas a otra cámara en condiciones de 15°C con el objetivo de incrementar la diferencia de temperatura al aplicar el choque térmico durante el cultivo de microsporas. Previamente a la toma de muestras de inflorescencias de las plantas donantes, era necesario una permanencia de al menos 1 semana desde su traspaso de la cámara de crecimiento vegetativo a la cámara de frío pues es un aspecto que favorece la respuesta embriogénica. Ambas cámaras mantuvieron un fotoperiodo de 16/8h luz y oscuridad respectivamente.

### **Extracción de microsporas**

Con el objetivo de maximizar el efecto del choque térmico que se aplicó, se realizaron el mayor número de pasos de la extracción de microsporas de colza posible manteniéndolas en hielo. En primer lugar, tras tomar diferentes inflorescencias de las plantas, se mantuvieron en hielo mientras se procedía a la medición de la longitud de los sépalos con el objetivo de seleccionar aquellos cuya longitud correspondía con los estadios de desarrollo óptimos para la inducción de embriogénesis en microsporas, es decir, el estadio de microspora vacuolada y el estadio de polen bicelular joven. De este modo, se seleccionaron aquellos botones florales con longitudes de sépalo de 3.4-3.6 mm en DH4079 y 2.7-3 mm en DH12075.

Seleccionados los botones, la extracción de microsporas continuó con la desinfección del material vegetal. Primeramente, manteniendo condiciones de esterilidad trabajando en cabina de flujo laminar, se realizó un lavado de los botones, previamente depositados en rejillas de infusores, en etanol 70% durante 30 segundos, a continuación, se lavaron

con hipoclorito sódico 4 g/L durante 10 minutos. Finalmente se realizaron tres lavados de 5 minutos en agua autoclavada mantenida, además, en nevera.

Desinfectado el material vegetal, se procedió a extraer las microsporas depositando los botones en un vaso de precipitados autoclavado sobre el cual se había añadido 2 mL de medio NLN-13. Este medio, indicado para el cultivo de microsporas (Lichter, 1982), consiste en una modificación del medio NLN basal. Su composición se recoge en la “Tabla 1” de este apartado, pero para su preparación se recurrió a preparados comerciales (Duchefa Biochemie) debido a su mayor simplicidad.

Tabla 1. Composición del medio NLN-13 (adaptado de Corral-Martínez et al., 2021).

<b>Macroelementos</b>	<b>mg/L</b>	<b>[mM]</b>
<i>Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></i>	500	3
<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	125	0.9
<i>KNO<sub>3</sub></i>	125	1.24
<i>MgSO<sub>4</sub></i>	61	0.51
<b>Microelementos</b>	<b>mg/L</b>	<b>[mM]</b>
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	0.0001
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	0.0001
FeNaEDTA	36.7	0.1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10	0.16
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	18.95	0.11
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	0.001
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10	0.03
<b>Vitaminas, aminoácidos y azúcares</b>	<b>mg/L</b>	<b>[mM]</b>
D(+)-Biotina	0.05	0.0002
Ácido fólico	0.5	0.0011
L-Glutamine	800	5.48
Glutati3n (reducido)	30	0.098
Glicina	2	0.027
Myoinositol	100	0.555
Ácido nicotínico	5	0.041
Clorhidrato de piridoxina	0.5	0.0024
L-Serina	100	0.95
Clorhidrato de tiamina	0.5	0.0015
Sacarosa	130,000	379.8

Mediante un émbolo mantenido en etanol absoluto, se machacaron los botones para liberar su contenido y filtrarlo a través de un doble filtro autoclavado de 41 µm a un tubo estéril de 15 mL. Tras recoger el material vegetal que se acumuló en el filtro, se procedió a un segundo machacado a fin de aumentar el rendimiento de extracción de microsporas. Completados unos 10-12 mL de filtrado, se procedió al siguiente paso del cultivo.

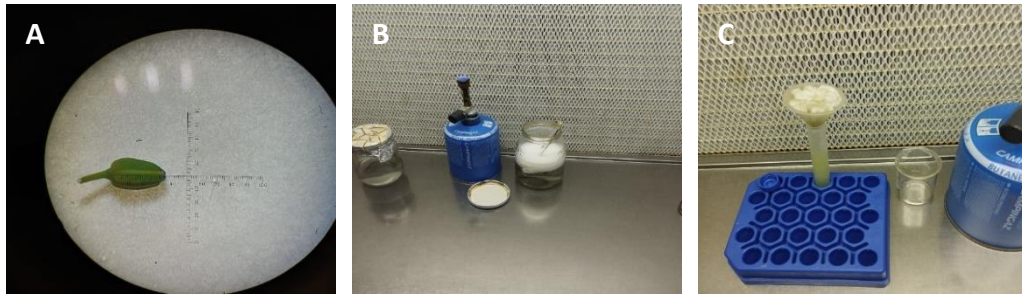


Figura 4. Distintas fases del proceso de extracción de microsporas; (A) Ejemplo de botón seleccionado para la extracción de microsporas; (B) Esterilización del material vegetal con solución en hipoclorito sódico; (C) filtrado del extracto de microsporas a través de un doble filtro de 41  $\mu\text{m}$ .

Con el fin de aislar las microsporas tras el filtrado se realizó una centrifugación a 870 rpm del extracto. Descartando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet en 10 mL de medio NLN-13 se repitió este proceso tres veces. Tras el último lavado, el pellet se resuspendió en 1 mL.

### Recuento celular

Las condiciones del cultivo de microsporas requerían una concentración de 20000 u/ml para el cultivo en placa multipocillo y de 40000 u/ml para el cultivo en placa individual de 35 mm de diámetro, por lo que se realizó un recuento de la concentración inicial del extracto para poder crear dicha suspensión celular. Así, tras cada aislamiento se hizo un recuento de microsporas con una cámara de recuento de tipo *Neubauer Improved* y se calcularon las distintas concentraciones celulares de cada cultivo realizado a través de la siguiente ecuación:

$$\text{Volumen Máximo a } 20000 \frac{u}{\text{mL}} = \frac{a * Vi * 5}{0.0001\text{mL} * 20000u}$$

$$\text{Volumen Máximo a } 40000 \frac{u}{\text{mL}} = \frac{a * Vi * 5}{0.0001\text{mL} * 40000u}$$

De este modo, ante un resultado  $X$  bastaría con resuspender el mL de suspensión de microsporas aisladas en  $X-1$  mL de medio NLN-13 para obtener nuestra suspensión de trabajo.



## Cultivo de microsporas

Una vez obtenida nuestra suspensión de microsporas se procedería con su cultivo en placas multipocillo (6 x 4) y en placas individuales de 35 mm según la concentración de la suspensión. Aplicando un volumen de 500  $\mu$ L por pocillo y de 1 mL por placa individual de 35 mm, estas placas podrían ser utilizadas para los correspondientes ensayos recogidos en este trabajo.

Previamente a la aplicación del choque térmico, la comprobación de la viabilidad de las microsporas implicaba un paso fundamental. De este modo, se procedería apartando un volumen de la suspensión de trabajo para hacer un ensayo de viabilidad con diacetato de fluoresceína (FDA), siendo la solución de trabajo FDA 1x a partir de un stock de 0.2% en acetona. Por cada mililitro de muestra a analizar se aplicaron 5  $\mu$ L de la solución FDA 1x, se mantuvieron en oscuridad durante unos 5 minutos y se procedió a la visualización vía microscopía de fluorescencia (Carl Zeiss Axiovert 40 CFL-HBO 50/AC) con sistema de captura de imágenes (Zeiss ZEN software). Debido a la capacidad de autofluorescencia de la exina del polen, con el fin de evitar sobreestimaciones de esta tinción, se trabajó bajo un mismo criterio, tomándose imágenes en condiciones de apertura del ocular de la cámara de 1400 fps, puesto que estas condiciones permitían que solamente aquellas células con señal de viabilidad adecuada apareciesen en la imagen, ocultándose posibles autofluorescencias o señales débiles no asociadas a viabilidad.

Con independencia del tratamiento hormonal, todas las placas se sometían a un choque térmico con el fin de inducir la respuesta embriogénica. Se recurrió a un choque térmico de 32°C durante 3 días, tras el cual el cultivo celular se mantenía a 25°C en oscuridad en una cámara de cultivo con el fin de realizar observaciones del desarrollo de las microsporas.

Así, entre los primeros 5 a 7 días de cultivo, a través de observaciones vía microscopio, podía observarse la presencia de las primeras divisiones celulares en las microsporas, un indicador del buen avance del cultivo. Por otra parte, tras 4 semanas de cultivo se podía realizar el recuento de estructuras embriogénicas puesto que ya eran visibles a simple vista en las placas, pudiendo ayudarnos del uso de lupas para observar con mayor nitidez y poder diferenciar desarrollos embriogénicos de simples callos.

## Tratamientos Hormonales

En los experimentos realizados se analizó el efecto sobre la respuesta embriogénica de los compuestos a continuación indicados. La aplicación exógena de los compuestos podía realizarse desde el inicio del cultivo o en algún punto del cultivo según qué se pretendiese observar. Del mismo modo, la presencia de cada compuesto podía mantenerse a lo largo de todo el cultivo desde su aplicación (“en continuo”) o bien eliminarse tras un cierto tiempo centrifugando el cultivo y resuspendiendo el *pellet* en medio NLN-13 nuevo sin presencia del compuesto (“lavado a día X”). Puesto que cada genotipo presenta una respuesta embriogénica diferente, para evaluar el posible papel beneficioso de cada compuesto en el aumento de respuesta embriogénica, se realizaron tratamientos diferentes en ambos genotipos de colza utilizados:

- **Ácido Indolacético (IAA):** A partir de tres stocks, 0.5 M (abreviado como “1”), IAA 5 mM (“2”) y IAA 500  $\mu$ M (“3”) diluidos en etanol absoluto, se procedió a ensayar con las siguientes concentraciones sobre el cultivo de microsporas, realizándose además un ensayo con presencia hormonal continua aplicada desde el inicio del cultivo y un duplicado donde se realizó el lavado a día 5:

*Tabla 2. Tratamientos aplicados al cultivo de microsporas durante el ensayo de IAA. Cantidades expresadas para 500 mL de cultivo; el número entre paréntesis indica el stock utilizado.*

	IAA ( $\mu$ L)	Etanol ( $\mu$ L)
Control	0	10
1 $\mu$ M	1 (3)	9
10 $\mu$ M	1 (2)	9
100 $\mu$ M	10 (2)	0
1 mM	1 (1)	9
10 mM	10 (1)	0

- **Auxinole:** A partir de dos stocks, 10 mM (abreviado como “1”), y 1 mM (“2”) diluidos en DMSO 100%, se procedió a ensayar con las siguientes concentraciones sobre el cultivo de microsporas, realizándose el ensayo con presencia hormonal aplicada desde el tercer día de cultivo y lavándose a día 4:

Tabla 3. Tratamientos aplicados al cultivo de microsporas durante el ensayo de Auxinole. Cantidades expresadas para 500 mL de cultivo; el número entre paréntesis indica el stock que utilizado.

	<b>Auxinole (μL)</b>	<b>DMSO 100% (μL)</b>
Control	0	5
2 μM	1 (2)	4
5 μM	2,5 (2)	2,5
10 μM	0,5 (1)	4,5
50 μM	2,5 (1)	2,5
100 μM	5 (1)	0

- **Bepiridil:** A partir de dos stocks, 10 mM (abreviado como “1”), y 2.5 mM (“2”) diluidos en etanol absoluto, se procedió a ensayar con las siguientes concentraciones sobre el cultivo de microsporas, realizándose el ensayo con presencia hormonal aplicada desde el tercer día de cultivo y lavándose a día 4:

Tabla 4. Tratamientos aplicados al cultivo de microsporas durante el ensayo de Bepiridil. Cantidades expresadas para 500 mL de cultivo; el número entre paréntesis indica el stock que utilizado.

	<b>Bepiridil (μL)</b>	<b>Etanol (μL)</b>
Control	0	5
5 μM	1(2)	4
10 μM	2 (2)	3
25 μM	5 (2)	0
50 μM	2,5 (1)	2,5
100 μM	5 (1)	0

- **Ácido 4-bifenilborónico (BBo):** A partir de dos stocks, 10 mM (abreviado como “1”), y 1 mM (“2”) diluidos en DMSO 100%, se procedió a ensayar con las siguientes concentraciones sobre el cultivo de microsporas, realizándose el ensayo con presencia hormonal aplicada desde el tercer día de cultivo y lavándose a día 4:

Tabla 5. Tratamientos aplicados al cultivo de microsporas durante el ensayo de BBo. Cantidades expresadas para 500 mL de cultivo; el número entre paréntesis indica el stock que utilizado.

	<b>BBO (μL)</b>	<b>DMSO 100% (μL)</b>
Control	0	5
1 μM	0,5 (2)	4,5
3 μM	1,5 (2)	3,5
10 μM	0,5 (1)	4,5
50 μM	2,5 (1)	2,5
100 μM	5 (1)	0

- **Ácido Abscísico (ABA):** A partir de dos stocks, 250 mM (abreviado como “1”), y 500 μM (“2”) diluidos en NaOH 0,33M se procedió a ensayar con las siguientes concentraciones sobre el cultivo de microsporas, realizándose el ensayo con presencia hormonal aplicada desde el tercer día de cultivo y lavándose a día 4:

Tabla 6. Tratamientos aplicados al cultivo de microsporas durante el ensayo de ABA. Cantidades expresadas para 500 mL de cultivo; el número entre paréntesis indica el stock utilizado

	ABA ( $\mu\text{L}$ )	NaOH 0,33M ( $\mu\text{L}$ )
Control	0	20
10 $\mu\text{M}$	10 (2)	10
100 $\mu\text{M}$	100 (2)	0
1 mM	2 (1)	18
10 mM	20	0

- **Abamine SG:** A partir de tres stocks, 250 mM (abreviado como "1"), 25 mM ("2") y 2,5 mM ("3") diluidos en DMSO 100%, se procedió a ensayar con las siguientes concentraciones sobre el cultivo de microsporas con aplicación al segundo día de cultivo y presencia continuada durante el resto del cultivo:

Tabla 7. Tratamientos aplicados al cultivo de microsporas durante el ensayo de Abamine SG. Cantidades expresadas para 500 mL de cultivo; el número entre paréntesis indica el stock utilizado

	Abamine SG ( $\mu\text{L}$ )	DMSO 100% ( $\mu\text{L}$ )
Control	0	20
10 $\mu\text{M}$	2 (3)	18
100 $\mu\text{M}$	20 (3)	0
1 mM	20 (2)	0
10 mM	(1)	0

- **AA1:** A partir de dos stocks, 10 mM (abreviado como "1"), y 1 mM ("2") diluidos en DMSO 100%, se procedió a ensayar con las siguientes concentraciones sobre el cultivo de microsporas, realizándose además un ensayo con presencia hormonal continua aplicada desde el inicio del cultivo y un duplicado donde se realizó el lavado a día 4:

Tabla 8. Tratamientos aplicados al cultivo de microsporas durante el ensayo de AA1. Cantidades expresadas para 500 mL de cultivo; el número entre paréntesis indica el stock que utilizó

	AA1 ( $\mu\text{L}$ )	DMSO 100% ( $\mu\text{L}$ )
Control	0	2,5
1 $\mu\text{M}$	0,5 (2)	2
2,5 $\mu\text{M}$	1,25 (2)	1,25
5 $\mu\text{M}$	2,5 (2)	0
10 $\mu\text{M}$	0,5 (1)	2
50 $\mu\text{M}$	2,5 (1)	0

## Análisis estadístico

Transcurridas 4 semanas desde el inicio del cultivo, se realizaron los recuentos de las estructuras surgidas. Los datos obtenidos pasaron en primer lugar un análisis de normalidad mediante un Test *t*-Student con un nivel de significación ( $\alpha$ ) de 0.05. Comprobada la normalidad de los datos, se pudieron realizar análisis paramétricos a

través del test ANOVA combinado con Test Tukey-HSD, con un  $\alpha$  de 0.05 de nuevo, que permitió la comparación entre los tratamientos.

## RESULTADOS

Aunque con muy distinta eficiencia, como ya se ha comentado en la introducción, los cultivos de microsporas de las líneas de alta y de baja respuesta de *B. napus* (DH4079 y DH12075, respectivamente) pasan por exactamente las mismas etapas, y tras su puesta en cultivo (Figura 5A) dan lugar a las mismas estructuras, tanto no embriogénicas (microsporas muertas o que no se inducen a embriogénesis y continúan su desarrollo hacia polen), como embriogénicas. En el caso de estas últimas, a los pocos días podían verse estructuras que habían comenzado a crecer en tamaño y sufrir divisiones internas (Figuras 5B, C). Del mismo modo, a partir de la tercera semana de cultivo, podían observarse estructuras embrionarias a simple vista (Figuras 5D, E) confirmando el resultado positivo de la inducción embriogénica de las microsporas cultivadas.

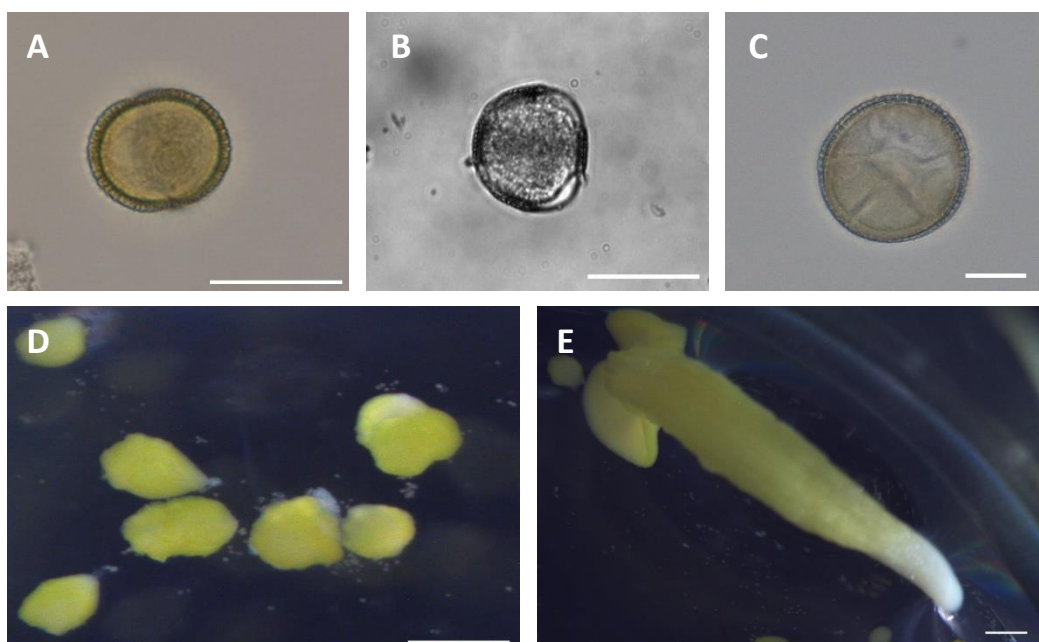


Figura 5. Fases del cultivo de microsporas de la línea DH4079; (A) Microsporas a inicio de cultivo, (B) Microspora tras tres días de cultivo, (C) Microspora tras 7 días de cultivo donde ya pueden observarse divisiones, (D) Embriones tras 28 días de cultivo, (E) Embrión cotiledonar tras 28 días de cultivo; Barras: 10  $\mu\text{m}$  (A, B y C), 1000  $\mu\text{m}$  (D y E).

Este sistema experimental es el que se utilizó para la determinación de los efectos de la aplicación de los distintos compuestos utilizados en este estudio. En concreto, la eficiencia de cada uno de los compuestos evaluados se determinó en base a su efecto sobre la producción de embriones contados a las 4 semanas desde el inicio del cultivo.

Los ensayos recogidos en este trabajo se plantearon a partir de los resultados previamente obtenidos por nuestro grupo, todavía sin publicar (recogidos en el ANEXO 1 de este trabajo), en los que se analizaban los niveles endógenos de IAA y ABA a lo largo de distintas etapas del cultivo de microsporas de colza de ambas líneas (DH4079 y DH12075). Dentro de cada genotipo se analizaron los niveles de las mencionadas hormonas en condiciones de inducción de embriogénesis (choque térmico de 32°C durante los primeros 3 días de cultivo), y también, como referencia, en condiciones no inductoras de embriogénesis con un cultivo a una temperatura continuada de 18°C. Los niveles de las fitohormonas se midieron a través de espectrometría de masas y cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para obtener una cuantificación de los niveles de las fitohormonas. La acumulación a lo largo del tiempo fue medida en nanogramos por cada gramo de muestra (ng/g de las Figuras A.1 y A.3 del ANEXO 1). En el genotipo DH12075 se observaron niveles promedio de IAA inferiores a los del DH4079 tanto en los ensayos con estrés como en los de 18°C (Figura A.1). Por otra parte, en DH12075 se encontraban altos niveles de ABA al cuarto día, mientras que el cuarto día en DH4079 presenta niveles inferiores en comparación a los días inmediatamente anterior y posterior, o sea, el tercer día y quinto día (Figura A.3). Estos resultados sugerían que el genotipo DH12075 tenía menor capacidad de acumulación de IAA y una mayor acumulación de ABA.

Además de las cantidades de IAA y ABA, también se analizaron los perfiles de estas hormonas a lo largo del tiempo de cultivo. Estos análisis mostraban perfiles diferentes para cada uno de los dos genotipos. En los ensayos con choque térmico, el genotipo de baja respuesta (DH12075) mostraba picos de acumulación de ambas hormonas al tercer día, mientras que el genotipo de alta respuesta (DH4079) los mostraba al cuarto día del cultivo (Figuras A.2 y A.4 del ANEXO 1). Ninguno de los genotipos mostró picos de IAA o ABA en los ensayos a 18°C (sin inducción), haciéndonos esto pensar en la relevancia que tendrán en la respuesta embriogénica acumulaciones de estas hormonas en momentos concretos en respuesta al estrés.

Con todo ello, se determinó que, ante la inducción por estrés térmico, la línea DH12075 acumulaba menos IAA endógeno que la línea DH4079. Además, en DH12075 los niveles endógenos de IAA sufrían un aumento al tercer día desde el inicio del cultivo y caían al cuarto día, mientras que en DH4079 surgía un pico de IAA endógeno al cuarto día. Del mismo modo, respecto a los niveles de ABA, en DH12075 se observó una acumulación promedio ligeramente mayor que en DH4079. Respecto a los perfiles hormonales, en

DH12075 se observó una gran acumulación al tercer y quinto día de cultivo mientras que en DH4079 se daba dicho pico al cuarto día únicamente.

Ante estos perfiles diferentes, se planteó evaluar el efecto que tendría en la respuesta embriónica imitar en cada línea el perfil hormonal de la otra, realizándose así los ensayos recogidos en este trabajo.

- Adición exógena de IAA:

Ante la menor acumulación de IAA en la línea DH12075, se ensayó la adición exógena de distintas concentraciones con el fin de emular el perfil de DH4079 donde había mayor acumulación.

La aplicación de IAA desde el inicio al cultivo de microsporas no generó ninguna mejora de la respuesta embriónica respecto al control en ninguna de las concentraciones ensayadas, llegando incluso a anularla en los casos de las concentraciones 100  $\mu$ M, 1 mM y 10 mM (Figura 6).

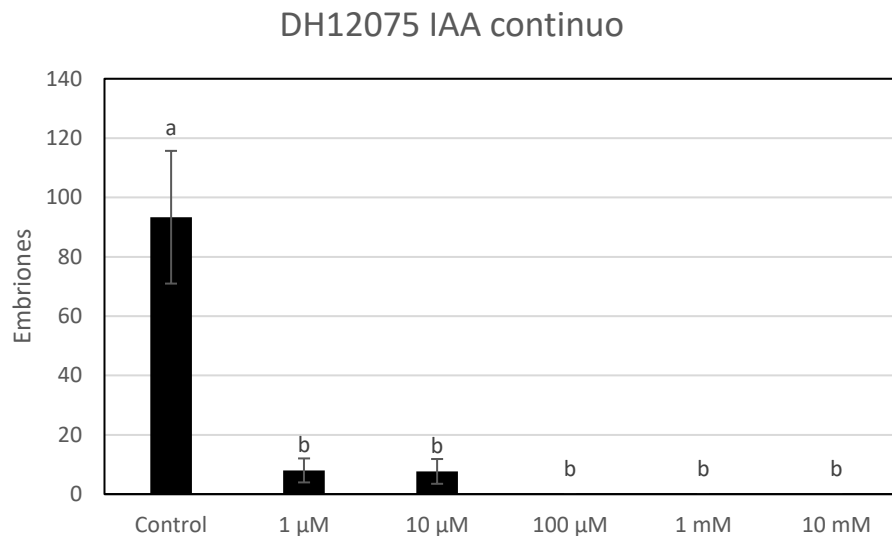


Figura 6. Recuento de embriones del cultivo DH12075 con presencia de IAA durante todo el cultivo. Las distintas letras sobre las barras de datos indican diferencias estadísticamente significativas según un análisis ANOVA con Test Tukey-HSD

Además de simplemente aumentar la cantidad de IAA presente en el cultivo, se ensayó limitar su presencia hasta el quinto día, último momento en el que en DH4079 se estimó la cantidad de IAA presente durante el cultivo (Figuras A.1 y A.2 del ANEXO 1).

De este modo, en el ensayo con presencia de IAA hasta el quinto día de cultivo de nuevo ninguna concentración mejoró la respuesta frente al control, si bien la concentración 1  $\mu$ M generó una respuesta estadísticamente no diferenciable de la del control (Figura 7).



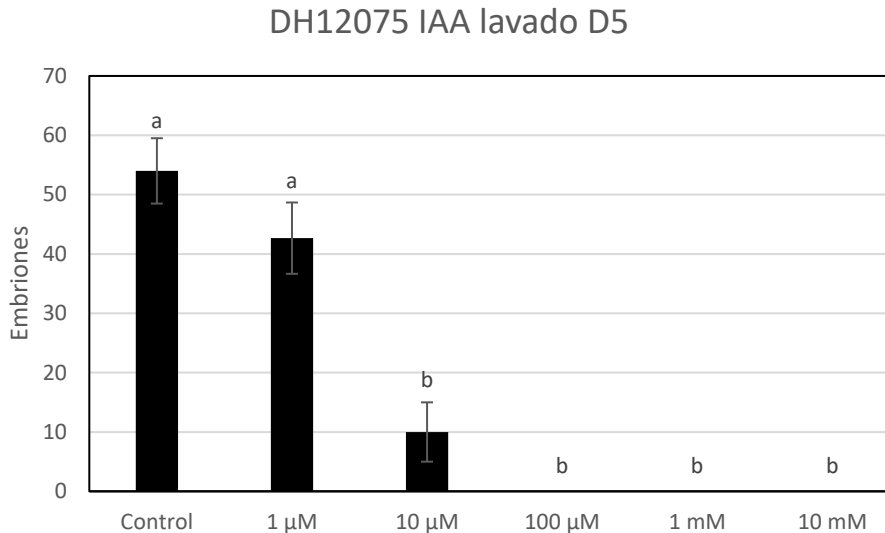


Figura 7. Recuento de embriones del cultivo DH12075 con presencia de IAA hasta el quinto día de cultivo. Las distintas letras sobre las barras de datos indican diferencias estadísticamente significativas según un análisis ANOVA con Test Tukey-HSD.

Vemos en estos resultados que ninguna concentración de IAA consigue mejorar la respuesta embriogénica en DH12075, independientemente de su presencia continuada o hasta el quinto día del cultivo

- Inhibición de la señalización IAA con Auxinole:

Auxinole es un compuesto con la posibilidad de modificar la señalización por IAA ya que es un inhibidor de los receptores *TIR/AFB*, claves en la respuesta a auxinas (Hayashi *et al.*, 2012). Así, ante el pico de acumulación observado al tercer día en DH12075, se probaron diferentes concentraciones de Auxinole para emular en esta línea el perfil que se daba en DH4079, donde el pico de IAA surgía al cuarto día (Figura A.2 del ANEXO 1). Esto es debido a que, si se evitaba la señalización de IAA al tercer día con Auxinole, pero se volvía a permitir al cuarto día, teóricamente DH12075 presentaría un perfil de IAA más parecido al de DH4079.

En el ensayo de aplicación de Auxinole desde el tercer día de cultivo y lavado al cuarto día, la concentración de 2 μM generó una mayor respuesta que el control, pero la diferencia entre ambas muestras no fue estadísticamente significativa; el resto de concentraciones probadas no consiguieron mejorar la respuesta frente al control, llegando a ser nula en el caso de la concentración 100 μM (Figura 8).

### DH12075 Auxinole D3 lavado D4

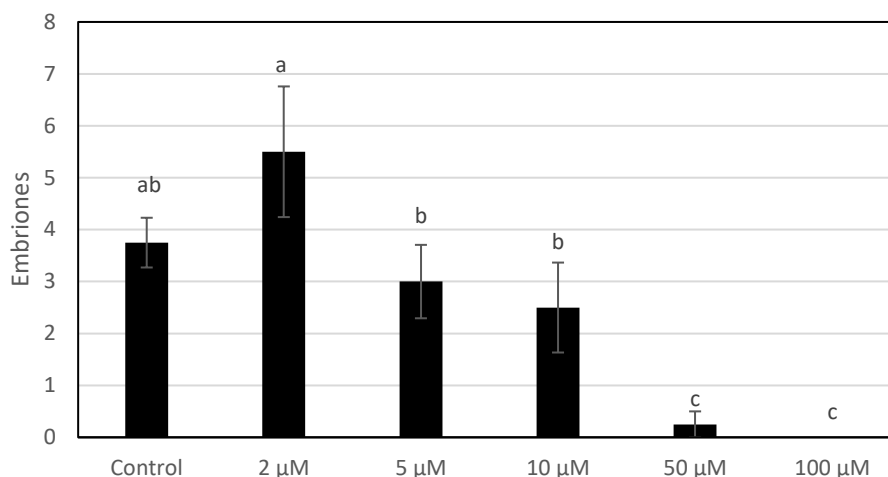


Figura 8. Recuento de embriones del cultivo DH12075 con presencia de Auxinole desde el tercer día de cultivo y con lavado a día 4. Las distintas letras sobre las barras de datos indican diferencias estadísticamente significativas según un análisis ANOVA con Test Tukey-HSD.

Ante la mayor producción de embriones de la concentración 2  $\mu\text{M}$ , aunque estadísticamente la diferencia no fuera significativamente diferente del control, el hecho de que el resultado no fuera negativo nos llevó a continuar trabajando con Auxinole en DH12075. Así, aplicando Auxinole 2  $\mu\text{M}$  al tercer día, lavándolo al cuarto y añadiendo diferentes concentraciones de IAA hasta el sexto día de cultivo se pretendió emular todavía más el perfil de IAA visto en DH4079, ya que no solamente se pretendía desplazar el pico de IAA del tercer día al cuarto en DH12075, sino que con la adición de IAA exógeno se podría suplir la menor acumulación endógena de IAA de esta línea (Figura A.1 del ANEXO 1).

Sin embargo, con el uso de la concentración 2  $\mu\text{M}$  de Auxinole desde el tercer día de cultivo con lavado y aplicación de distintas concentraciones de IAA al cuarto día, lavándose estas al sexto día, ninguna concentración mejoró la respuesta frente a los dos controles que se realizaron. Ambos controles mostraron una respuesta estadísticamente indiferenciable entre si y las concentraciones de IAA 100  $\mu\text{M}$ , 1 mM y 10 mM mostraron respuesta nula (Figura 9).

### DH12075 Auxinole 2 $\mu$ M D3 IAA D4

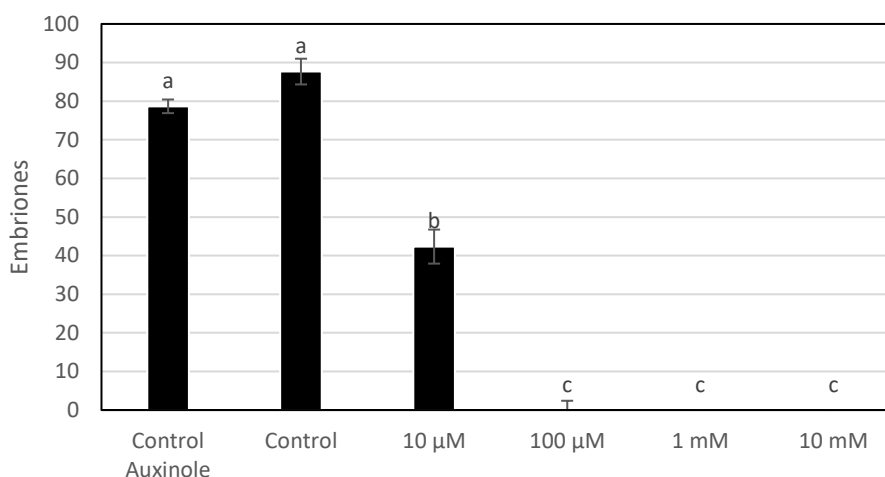


Figura 9. Recuento de embriones del cultivo DH12075 con presencia de la concentración 2  $\mu$ M de Auxinole desde el tercer día de cultivo, lavado a día 4 y aplicación a día 4 hasta día 6 de IAA 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM y 10 mM. El control denominado como "Control Auxinole" es un cultivo con presencia únicamente de Auxinole 2  $\mu$ M desde día 3 y lavado a día 4, sin aplicar luego el solvente presente en los stocks de IAA utilizados, como sí ocurre en el "Control". Las distintas letras sobre las barras de datos indican diferencias estadísticamente significativas según un análisis ANOVA con Test Tukey-HSD.

Vemos en estos ensayos que ninguna de las concentraciones de Auxinole, ni la combinación de Auxinole con IAA consiguió generar una mejora estadísticamente significativa de la respuesta embriogénica en la línea DH12075.

- Inhibición de la señalización de IAA con Bepridil:

Bepridil es un compuesto con capacidad de inhibir canales de calcio y que se ha encontrado que puede modular la señalización por calcio inducida por auxinas en plantas (De Vriese *et al.*, 2019). El calcio es un mensajero secundario implicado en la transducción de señales de múltiples procesos, incluida la señalización hormonal, bloqueando sus canales puede bloquearse dicha respuesta. Aplicándolo al tercer día de cultivo en DH12075 y eliminando su presencia con el lavado al cuarto día se pretendía bloquear la respuesta a la auxina IAA evitando el pico a día 3 y permitiendo que surja al cuarto día emulando lo que ocurre en DH4079 (Figura A.2 del ANEXO 1).

La aplicación de Bepridil desde el tercer día del cultivo y con lavado al cuarto día no generó mejoras estadísticamente significativas respecto al control, si bien las concentraciones 5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M aumentaron el número de embriones; en la concentración 50  $\mu$ M y en la concentración 100  $\mu$ M se dio un resultado nulo (Figura 10).

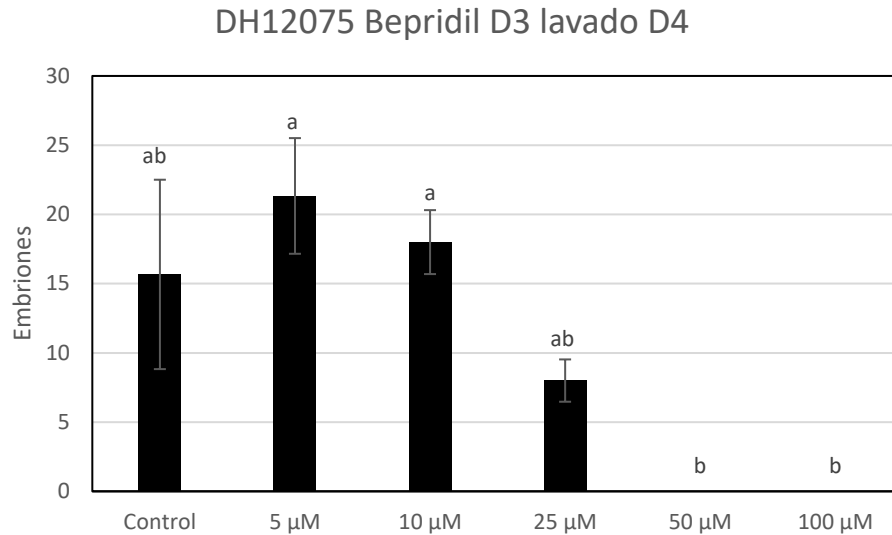


Figura 10. Recuento de embriones del cultivo DH12075 con presencia de Bepridil desde el tercer día de cultivo y con lavado a día 4. Las distintas letras sobre las barras de datos indican diferencias estadísticamente significativas según un análisis ANOVA con Test Tukey-HSD.

Estos resultados muestran que pese a la aplicación de Bepridil con el fin de modificar el perfil hormonal de IAA en DH12075 hacia el que se da en DH4079, no se ha conseguido una mejora estadísticamente significativa en la respuesta embriogénica.

- Inhibición de la síntesis de IAA con BBo:

BBo es un compuesto capaz de inhibir la ruta del indol-3-piruvato, una de las principales rutas de biosíntesis de IAA (Kakei *et al.*, 2015). Su uso al tercer día en el cultivo de microsporas de la línea DH12075 pretendía inhibir la biosíntesis de IAA, evitando el pico a día 3. Eliminando su presencia a día 4 se buscaba permitir de nuevo la síntesis de IAA, surgiendo así el pico a día cuatro que se daba en DH4079 (Figura A.2 del ANEXO 1).

La aplicación de BBo desde el tercer día de cultivo y lavado al cuarto día no generó en ninguna de las concentraciones ensayadas una mejora de la respuesta embriogénica respecto al control, llegando a observarse respuestas nulas en las concentraciones 50 µM y 100 µM (Figura 11).

### DH12075 BBo D3 lavado D4

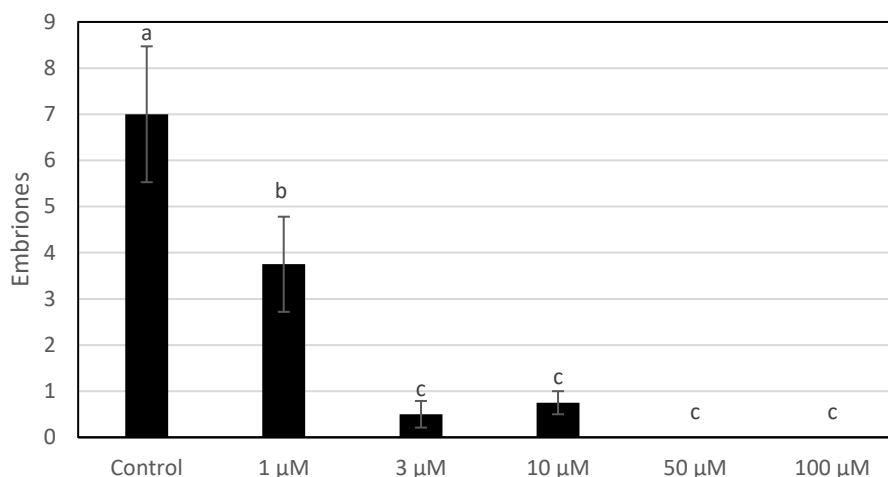


Figura 11. Recuento de embriones del cultivo DH12075 con presencia de BBo desde el tercer día de cultivo y con lavado a día 4. Las distintas letras sobre las barras de datos indican diferencias estadísticamente significativas según un análisis ANOVA con Test Tukey-HSD.

Estos resultados muestran que la aplicación de BBo con el fin de inhibir la síntesis de IAA al tercer día de cultivo en DH12075 no generó una mejora de la respuesta embriogénica.

- Adición exógena de ABA:

Ante las diferencias en el perfil hormonal de ABA encontradas entre ambas líneas (Figuras A.3 y A.4 del ANEXO 1), se ensayó la adición de ABA exógenamente a un cultivo de DH4079 al tercer día de cultivo. De este modo, al adicionar exógenamente ABA se buscaba estudiar el efecto de aumentar la concentración de ABA precisamente en uno de los días en el que esta línea sufría un pico de acumulación. Así, si bien no emulaba el perfil de DH12075 respecto al día del pico de acumulación (pues este se da al cuarto día), la mayor cantidad de ABA presente podría emular la concentración de ABA existente en la línea DH12075.

La aplicación de ABA desde el tercer día de cultivo y lavado al cuarto día generó en todas las concentraciones ensayadas una disminución de la respuesta embriogénica respecto al control, llegando a observarse respuestas nulas en las concentraciones 1 mM y 10 mM (Figura 12).

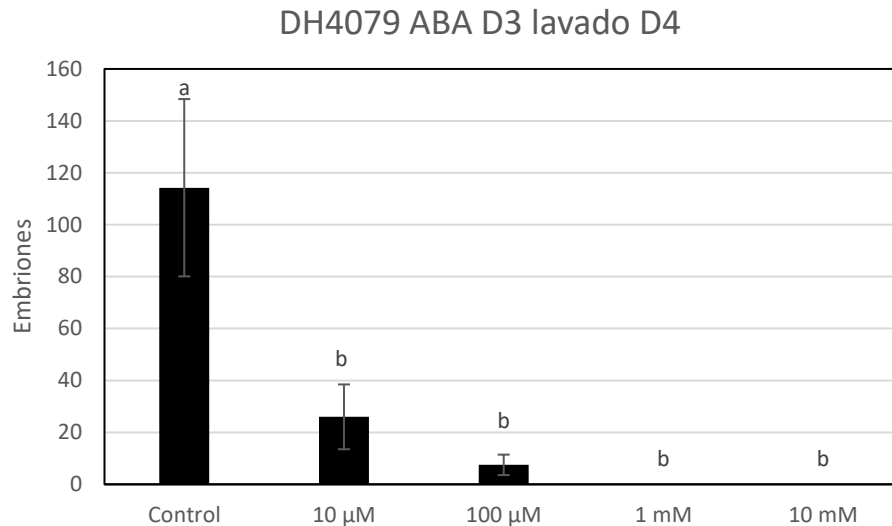


Figura 12. Recuento de embriones del cultivo DH4079 con presencia de ABA desde el tercer día de cultivo y con lavado a día 4. Las distintas letras sobre las barras de datos indican diferencias estadísticamente significativas según un análisis ANOVA con Test Tukey-HSD.

Vemos con estos resultados que la aplicación exógena de ABA al cultivo de DH4079 disminuyó su respuesta embriogénica

- Inhibición de la síntesis de ABA con Abamine SG:

Abamine SG es un compuesto capaz de inhibir la biosíntesis de ABA actuando sobre el enzima *NCED*, clave en la ruta de biosíntesis de la fitohormona (Kitahata *et al.*, 2006). A través de su aplicación a un cultivo de microsporas de DH4079 se trataría de evitar el surgimiento de los picos de acumulación típicos de esta línea, siendo al tercer y quinto día de cultivo (Figura A.4 del ANEXO 1).

La aplicación de Abamine SG desde el segundo día de cultivo y con presencia continua en el cultivo desde ese día generó en todas de las concentraciones ensayadas una disminución de la respuesta embriogénica respecto al control, llegando a observarse respuestas nulas en las concentraciones 1 mM y 10 mM; las concentraciones 10 µM y 100 µM, sin embargo, no podían ser diferenciadas estadísticamente del resultado obtenido en el control (Figura 13).

### DH4079 Abamine SG D2 continuo

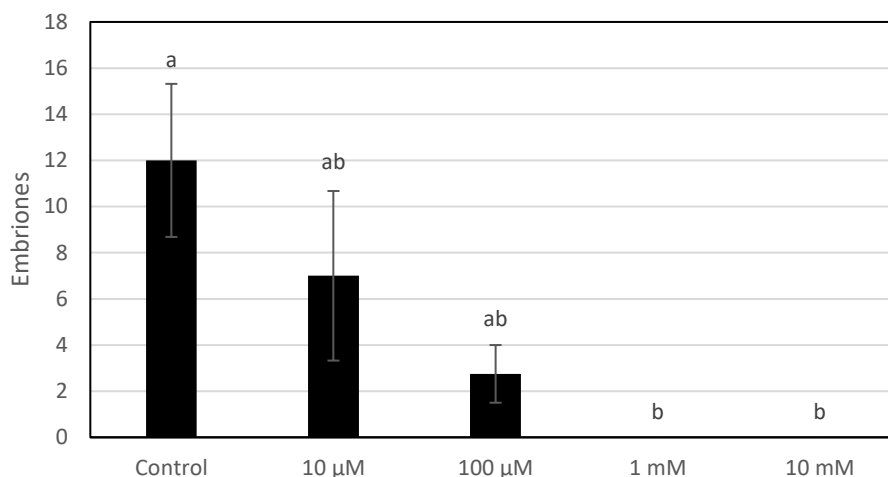


Figura 13. Recuento de embriones del cultivo DH4079 con presencia continuada de Abamine SG desde el segundo día de cultivo. Las distintas letras sobre las barras de datos indican diferencias estadísticamente significativas según un análisis ANOVA con Test Tukey-HSD.

Estos resultados muestran que la aplicación de Abamine SG al cultivo de microsporas generó una disminución de la respuesta embriogénica en la línea DH4079.

- Inhibición de la señalización de ABA con AA1:

AA1 es un compuesto capaz de actuar como antagonista de amplio espectro de los receptores de ABA (Ye *et al.*, 2017). Aplicándolo sobre un cultivo de la línea DH12075 se pretendía evitar el elevado pico de acumulación que surgía al cuarto día de cultivo (Figuras A.3 y A.4 del ANEXO 1).

En el ensayo de aplicación de AA1 al cultivo de microsporas desde su inicio con presencia continua, la concentración 5 µM mejoró la respuesta embriogénica respecto al control siendo significativamente diferente. Por su parte, otras concentraciones generaron una respuesta nula (2.5 µM, 10 µM y 50 µM) y la concentración 1 µM generó un mayor número de embriones que el control, pero estadísticamente no podían determinarse como diferentes (Figura 14).

### DH12075 AA1 continuo

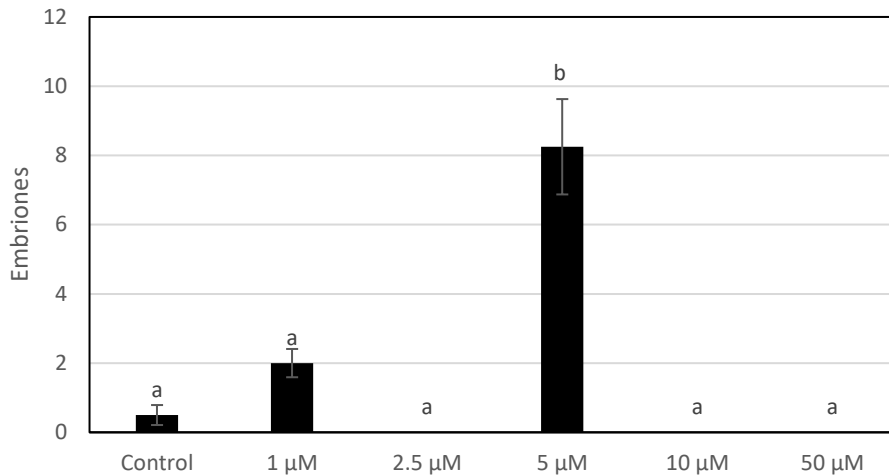
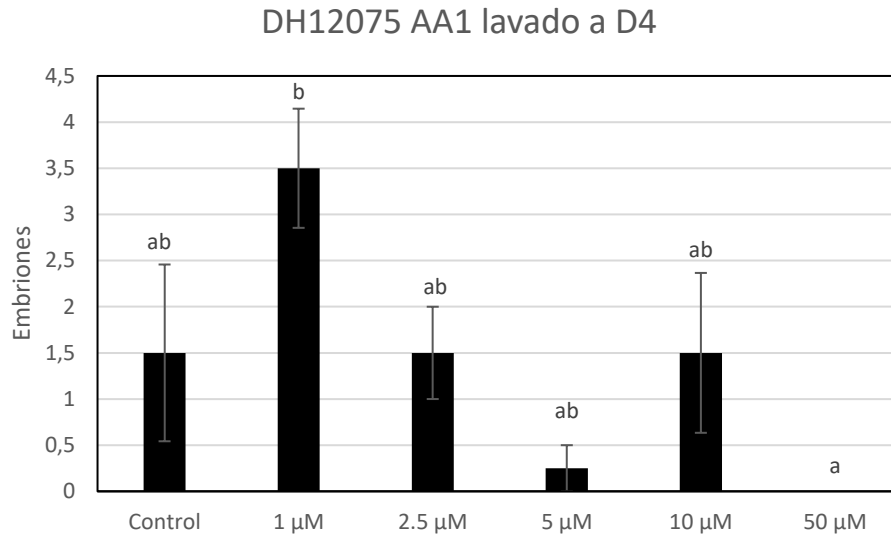


Figura 14. Recuento de embriones del cultivo de DH12075 con presencia continua de AA1 desde el inicio del cultivo. Las distintas letras sobre las barras de datos indican diferencias estadísticamente significativas según un análisis ANOVA con Test Tukey-HSD.

Otro ensayo con AA1 trató de emular todavía más en DH12075 el perfil hormonal de ABA que se daba en DH4079, ya que se aplicó AA1 desde el tercer día de cultivo para impedir el pico de acumulación de ABA al tercer día, pero se eliminó la presencia del compuesto al cuarto día para permitir la acumulación de ABA e imitar el pico característico de DH4079 (Figuras A.3 y A.4 del ANEXO 1).

La aplicación de AA1 desde el inicio del cultivo de microsporas con lavado al cuarto día generó un mayor número de embriones en la concentración 1 μM, pero estadísticamente no podía diferenciarse del resultado del control. Del mismo modo, surgió un número igual de embriones al del control en las concentraciones 2.5 μM y 10 μM y una reducción de la respuesta embriogénica en las concentraciones 5 μM y 50 μM, siendo nula en esta última (Figura 15).





*Figura 15. Recuento de embriones del cultivo DH12075 con presencia de AA1 desde el inicio del cultivo y lavado a día 4. Las distintas letras sobre las barras de datos indican diferencias estadísticamente significativas según un análisis ANOVA con Test Tukey-HSD.*

Estos resultados muestran que la aplicación de AA1 sobre el cultivo de microsporas de DH12075 mejoró en algunas concentraciones la respuesta embriogénica de la línea. Este hecho es especialmente relevante en el caso de la concentración 5  $\mu\text{M}$  con presencia continua desde el tercer día de cultivo, donde el análisis estadístico mostro diferencias significativas con el control.

## DISCUSIÓN

Los resultados previos obtenidos por nuestro grupo sobre las concentraciones y el perfil hormonal (Figuras A.1, A.2, A.3 y A.4 del ANEXO 1) mostraban diferencias entre ambas líneas. En primer lugar, en el genotipo DH12075 se observaron niveles promedio de IAA inferiores a los del DH4079 tanto en los ensayos con estrés como en los de 18°C (Figura A.1 del ANEXO 1). Por otra parte, en DH12075 se encontraban altos niveles de ABA al cuarto día, mientras que el cuarto día en DH4079 presenta niveles inferiores en comparación a los días inmediatamente anterior y posterior (Figura A.3 del ANEXO 1). Dado que en los cultivos de microsporas aisladas de *B. napus*, al contrario de lo que sucede en el resto de sistemas de inducción de embriogénesis de microsporas, no se añade ningún tipo de hormonas al medio de cultivo en ningún momento del proceso (Corral-Martínez et al., 2021), cualquier diferencia entre genotipos en los niveles endógenos de cualquier hormona ha de venir dado por una diferente capacidad de biosíntesis y/o metabolismo de la misma. Por tanto, los resultados arriba mencionados sugerían que el genotipo DH12075 tenía menor capacidad de síntesis de IAA y una mayor capacidad de síntesis de ABA.

A partir de estos resultados se trató de estudiar el efecto que tendría sobre cada genotipo la modificación de los niveles de estas fitohormonas en determinadas etapas del cultivo de microsporas, modificando así sus perfiles hormonales. Así, al trabajar sobre dos líneas con diferente potencial de inducción embriogénica y conociendo sus perfiles hormonales para IAA y ABA (ANEXO 1), podemos asociar los resultados con el papel de estas dos fitohormonas durante el proceso de embriogénesis de microsporas. De este modo, se analizarán estos resultados en bloques según la fitohormona implicada.

En primer lugar, el IAA es uno de los miembros más ampliamente estudiados del grupo de fitohormonas conocidas como auxinas. Las auxinas están implicadas en multitud de procesos asociados a la fisiología y el crecimiento de los vegetales, especialmente a través de la modulación de la expresión génica mediada por los *Auxin Response Factors* (ARF; Weijers et al., 2018). Si bien las respuestas a auxinas son variadas, sus efectos fisiológicos a nivel celular pueden agruparse en dos grandes grupos: aquellos que resultan en la expansión celular y aquellos que resultan en la división celular (Teale et al., 2006).

Además de su papel en el desarrollo de los vegetales, el IAA también presenta especial importancia en biotecnología vegetal, especialmente en el cultivo *in vitro*. De este modo, se ha descrito su papel en la producción de raíces y tallos durante el cultivo de tejidos (Melnyk, 2023), así como su influencia en procesos de embriogénesis *in vitro*, tanto somática como de microsporas (Prem et al., 2012; Rodríguez-Sanz et al., 2015).

Los niveles promedio de IAA en DH12075, comparativamente más bajos que en DH4079 (Figura A.1), nos hicieron plantearnos la aplicación exógena de IAA a los cultivos de DH12075. Sin embargo, ni con una presencia continuada en el cultivo (Figura 6), ni con presencia solo hasta el quinto día de cultivo (Figura 7), se observó un incremento en la respuesta embriogénica respecto al control. Más bien al contrario, pues la mayoría de combinaciones de concentraciones y tiempos de exposición dieron lugar a menores respuestas, incluso nulas en las concentraciones más elevadas. Estos resultados indican que los menores niveles de IAA no son la principal razón de la baja respuesta embriogénica en DH12075. De hecho, parece que incrementar la concentración de IAA en el medio de cultivo reduce el rendimiento de embriones de modo dependiente de la dosis de IAA utilizada. Es decir, asumiendo que al menos una parte del IAA del medio penetra al interior celular, un incremento de los niveles endógenos de IAA afecta negativamente a la producción final de embriones.

Los distintos perfiles de niveles de IAA durante el desarrollo de las microsporas en DH12075 (pico principal a día 3) y DH4079 (pico principal a día 4) nos hicieron plantearnos la posibilidad de modularlos para inhibir el pico de IAA al tercer día en DH12075, y ver si surge al cuarto, emulando el perfil de DH4079, una vez eliminados estos compuestos. Para inhibir la síntesis o la función señalizadora del IAA se utilizó Auxinole, Bepridil y BBo aplicados al tercer día (D3) y lavados al cuarto (D4).

Auxinole es un inhibidor de los receptores *TIR/AFB* de las células, los cuales son clave para la señalización por auxinas (Hayashi *et al.*, 2012). Nuestros resultados muestran que hasta 10  $\mu\text{M}$ , añadir Auxinole a día 3 y lavarlo a día 4 no tiene un efecto negativo en la producción de embriones (Figura 8). De hecho, a la concentración de 2  $\mu\text{M}$  se producen incluso más embriones, aunque el aumento no es estadísticamente significativo. Esta concentración, aplicada a día 3 y lavada a día 4, se utilizó para un segundo ensayo en el que se aplicaron distintas concentraciones de IAA entre los días 4 y 6 (Figura 9). Y en este caso, el efecto fue negativo para todas las concentraciones de

IAA, lo cual confirma el efecto negativo de aumentar los niveles de IAA mediante su adición exógena.

El uso de Bepridil, un antagonista de la señalización mediada por auxinas que inhibe los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (De Vriese *et al.*, 2019), dio unos resultados similares a los de Auxinole. Con su aplicación al tercer día y su lavado al cuarto, las tres concentraciones más bajas no afectaron negativamente al rendimiento de embriones respecto al cultivo control (Figura 10). Es más, con 5 y 10  $\mu\text{M}$  aumentó el rendimiento, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

El tercer compuesto utilizado para modular el IAA fue BBo, un inhibidor de la ruta del indol-3-piruvato, una de las principales rutas de biosíntesis de IAA, afectando a las enzimas *YUC*, claves para el avance de esta ruta (Takei *et al.*, 2015). A diferencia de lo observado con Auxinole y Bepridil, todas las concentraciones añadidas a día 3 y lavadas a día 4 claramente disminuyeron la respuesta embriogénica respecto al control, de manera claramente dependiente de la dosis de BBo utilizada (Figura 11).

De todos estos experimentos de modulación de los niveles de IAA en DH12075 se deduce que tanto reducir los niveles endógenos de IAA con BBo como aumentarlos añadiéndolo al cultivo, afecta muy negativamente a la producción de embriones diferenciados. Esto evidencia que los niveles endógenos de IAA están estrictamente regulados, y que una alteración, tanto al alza como a la baja, tiene un efecto en el adecuado progreso de la embriogénesis de microsporas. Esto no sería sorprendente dado el papel del IAA, ampliamente documentado, en distintos aspectos de la fisiología celular, donde es conocido que los niveles y distribución de auxinas son clave para la correcta polaridad de los tejidos (Zhao, 2010) y para la división asimétrica y diferenciación celular (Livanos *et al.*, 2015). Concretamente, el papel crucial de las auxinas en la diferenciación y división de los embriones (Chen *et al.*, 2010) refuerza la importancia del IAA y su correcta regulación en el desarrollo de embriones, pudiendo extrapolarse a los embriones derivados de microsporas (Pérez-Pérez *et al.*, 2019).

Sin embargo, la inhibición en DH12075 de la señalización mediada por IAA, tanto con dosis bajas como moderadas de Auxinole y Bepridil, no tiene este claro efecto negativo. Incluso pudiera ser que tuviera un efecto ligeramente positivo, aunque las diferencias en nuestros ensayos no hayan sido significativas. A este respecto, es importante señalar las elevadas desviaciones estándar observadas en todas las concentraciones, lo cual es indicativo de una elevada dispersión de los resultados de rendimiento. Esto no es

sorprendente en esta línea de baja respuesta, en la que 1-2 embriones de más o de menos en una de las tres repeticiones realizadas para cada concentración pueden tener un efecto muy notable en la varianza. Para confirmar si los aumentos de rendimiento observados con dosis bajas y moderadas de Auxinole y Bepridil son estadísticamente significativos o no, se deberían repetir estos experimentos más veces, a fin de obtener un tamaño muestral superior. Si con ello se reduce la varianza, es probable que las diferencias observadas pasaran a ser significativas. En dicho caso, se confirmaría que inhibir la señalización mediada por IAA a día 3 influye en la producción final de embriones. Es decir, el efecto observado en DH12075 (no negativo y posiblemente positivo) se debería a la inhibición de la señalización mediada por el pico de IAA a día 3, y no tanto a la ausencia de un pico a día 4 comparable al observado en DH4079, pues vemos que añadir IAA a día 4 o desde el principio del cultivo es negativo a cualquier concentración. Este hecho puede entenderse considerando estudios previos donde, en embriogénesis somática, se determinó que los niveles de IAA no eran tan relevantes para la adquisición de la identidad embrionaria como para el mantenimiento de dicha nueva identidad celular y el crecimiento del embrión (Karami *et al.*, 2023). Esto implicaría que en DH12075, al tercer día todavía no habría suficientes estructuras embriogénicas diferenciadas que pudieran proliferar como embriones por la presencia de IAA, sino que muchas microsporas todavía estarían reprogramando su desarrollo hacia la embriogénesis, y un pico de IAA les haría crecer de forma indiferenciada, de modo semejante a un callo.

Por su parte, el ácido abscísico (ABA) es una fitohormona implicada en procesos de maduración, mantenimiento de la dormición y tolerancia a la desecación en semillas (Nambara *et al.*, 2010; Maia *et al.*, 2014), así como de respuesta a estreses tanto abióticos (Yoshida *et al.*, 2019) como bióticos (Cao *et al.*, 2011) durante el desarrollo normal de las plantas. Su papel en la respuesta al estrés también ha sido estudiado en diversos sistemas de cultivo *in vitro*, debido al estrés que el propio cultivo implica para los tejidos vegetales, y resulta de especial interés su uso en el cultivo *in vitro* de embriones, especialmente para estudios de germinación y desarrollo de embriones (Johnson-Flanagan *et al.*, 1992; Ali *et al.*, 2021). Del mismo modo, existen estudios previos en *Arabidopsis thaliana* que reflejan una relación entre los niveles de ABA y la inducción de embriones somáticos a través del uso del regulador de crecimiento 2,4-D (Chen *et al.*, 2021). En cultivos de microsporas de berenjena, la adición de ABA al medio favoreció la división celular (Corral-Martínez y Seguí-Simarro, 2014).

Los perfiles hormonales previamente obtenidos por nuestro grupo mostraron unos elevados niveles de ABA en todas las etapas del desarrollo de los embriones derivados de las microsporas tanto de DH4079 como de DH12075, sin apenas diferencias entre ellos. Esto no resulta sorprendente, teniendo en cuenta el conocido papel del ABA en el desarrollo de los embriones (Ali *et al.*, 2021). Sin embargo, sí se detectaron importantes diferencias entre ambas líneas durante las primeras etapas de la inducción embriogénica. En primer lugar, los niveles generales de ABA fueron inferiores en DH4079 que en DH12075 (Figura A.3 del ANEXO 1). Además, previo al aumento de niveles en los embriones, se observó un pico a día 3 en DH4079 (ausente en DH12075), mientras que en DH12075, el pico se observaba a día 4 (Figura A.4 del ANEXO 1).

En el ensayo que se ilustra en la Figura 12 se trató de emular, en DH4079, el pico de ABA endógeno observado a día 4 en DH12075 mediante la adición al medio de cultivo de distintas concentraciones de ABA a día 3, a fin de que a día 4 hubieran aumentado sus niveles endógenos. En este ensayo se observó en todos los casos una caída de la respuesta embriogénica respecto al control, reduciéndose hasta niveles similares a los observados en DH12075 en condiciones estándar. Es decir, unos niveles de ABA superiores a los observados a día 4 en DH4079, bien sea porque se añade ABA al medio de cultivo en DH4079 o bien porque DH12075 los sintetiza de forma natural, afectan negativamente al progreso de la embriogénesis. Tras constatar este efecto negativo de los niveles elevados de ABA en la embriogénesis, se trató de reducirlos, también en DH4079, añadiendo Abamine SG a partir del día 2 de cultivo. Abamine SG es un inhibidor de la biosíntesis de ABA que actúa sobre el enzima NCED, clave en la ruta de biosíntesis (Kitahata *et al.*, 2006). Los resultados, como en el ensayo anterior, fueron negativos en cuanto a la producción de embriones (Figura 13). Considerados conjuntamente, estos experimentos de modulación de los niveles de ABA en DH4079 confirman que, al igual que se vio para el IAA, los niveles endógenos de ABA están estrictamente regulados y una alteración, tanto por exceso como por defecto, afecta muy negativamente a la producción de embriones diferenciados.

Por último, se trató de modular la señalización por ABA con AA1, un antagonista de amplio espectro de los receptores de ABA (Ye *et al.*, 2017), utilizando en este caso la línea DH12075, a fin de evaluar si una menor señalización por ABA influía en la respuesta embriogénica. El uso continuado de 5  $\mu$ M AA1 mejoró muy notablemente la respuesta embriogénica frente al control (Figura 14). Para refinar más el control, se añadió AA1 desde el inicio del cultivo hasta el día 4, que es cuando aparece el primer pico de ABA.

En este caso, fue la concentración de 1  $\mu\text{M}$  la que generó más embriones, más del doble que en condiciones control (Figura 15), aunque estadísticamente estos resultados no fueron significativamente distintos. De nuevo, al igual que sucedía con la inhibición de la señalización por IAA, encontramos que el tamaño muestral fue tan pequeño que pequeñas diferencias de rendimiento entre réplicas generaban varianzas elevadas, lo cual explicaría que una diferencia de rendimiento de más del doble no sea estadísticamente significativa. Ante esto, se revela necesario también en este caso repetir más veces estos ensayos y aumentar el número de réplicas para reducir la varianza, y con ello validar o no las diferencias observadas. En caso de validarse, esta mejora de la respuesta embriogénica en la línea DH12075 de baja respuesta podría interpretarse como una inhibición de los procesos mediados por ABA, que interferirían negativamente con el correcto desarrollo de los embriones derivados de las microsporas cultivadas. En un proceso *in vitro* similar, como la inducción de embriogénesis somática, se ha visto que una reducción de los niveles endógenos de IAA y un aumento de los de ABA (ambos causados por la aplicación exógena de uniconazole al cultivo) es suficiente para inhibir la proliferación de los callos y promover su diferenciación (Chen *et al.*, 2022).

En definitiva, todos estos resultados sugieren que cada línea tiene unos niveles distintos de IAA y ABA, y que la alteración de estos niveles tiene consecuencias muy negativas en la producción de embriones derivados de microsporas. Además, se han identificado diferencias específicas en determinadas etapas del proceso, principalmente los días 3 y 4 de cultivo, en los que a un pico de IAA o ABA en una línea le corresponde un valle en la otra línea. En el caso del IAA, nuestros resultados apuntan a la posibilidad de que el pico observado a día 3 en DH12075 estuviera interfiriendo con la inducción de las microsporas en estructuras embriogénicas. En el caso del ABA parece que, ante la aplicación de un mismo tratamiento de estrés térmico inductor de embriogénesis, la línea DH12075 presenta una mayor producción endógena de ABA que DH4079. Estos mayores niveles podrían quizás conferirle una mejor y/o mayor protección frente al estrés térmico, pero podrían también estar interfiriendo con los procesos fisiológicos que conducen a la transformación de una microspora en un embrión, tal como sugiere el hecho de que inhibir su papel como señalizador, sobre todo durante las primeras etapas del proceso, aumenta el rendimiento en embriones. De todos modos, este trabajo también pone de manifiesto que deberían repetirse estos ensayos para confirmar o rechazar estas hipótesis.

## **CONCLUSIONES**

De este trabajo pueden extraerse las siguientes conclusiones generales:

- Las líneas de *B. napus* DH4079 y DH12075, de alta y baja respuesta embriogénica, respectivamente, y que tienen distintos niveles endógenos de IAA y ABA, presentan una regulación muy estricta de los niveles de estas hormonas, de modo que su alteración tiene consecuencias muy negativas en la producción de embriones derivados de microsporas.
- El pico de IAA observado a día 3 en la línea de baja respuesta (DH12075) podría estar afectando negativamente a la inducción de las microsporas en estructuras embriogénicas, aunque harían falta más repeticiones para confirmar esta idea.
- Los mayores niveles generales de ABA observados en la línea DH12075 durante las primeras etapas del cultivo podrían estar interfiriendo con la transformación de la microspora en embrión, lo cual podría solucionarse inhibiendo la señalización mediada por ABA con AA1.



## **BIBLIOGRAFÍA**

Alan, A. R. (2021). Doubled Haploid Onion (*Allium cepa* L.) Production Via In Vitro Gynogenesis. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 2287, 151–169.

Ali, F., Qanmber, G., Li, F., & Wang, Z. (2021). Updated role of ABA in seed maturation, dormancy, and germination. *Journal of advanced research*, 35, 199–214.

Canola Council of Canada. (2016). Canola Encyclopedia: History of canola seed development. <https://www.canolacouncil.org/canola-encyclopedia/history-of-canola-seed-development/>

Chen, B., Fiers, M., Dekkers, B. J. W., Maas, L., van Esse, G. W., Angenent, G. C., Zhao, Y., & Boutilier, K. (2021). ABA signalling promotes cell totipotency in the shoot apex of germinating embryos. *Journal of experimental botany*, 72(18), 6418–6436.

Chen, D., Ren, Y., Deng, Y., & Zhao, J. (2010). Auxin polar transport is essential for the development of zygote and embryo in *Nicotiana tabacum* L. and correlated with ABP1 and PM H<sup>+</sup>-ATPase activities. *Journal of experimental botany*, 61(6), 1853–1867.

Chen, Y., Yu, H., Wang, Y., Li, F., Xing, Y., & Ge, X. (2022). Uniconazole Augments Abscisic Acid in Promoting Somatic Embryogenesis in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Frontiers in plant science*, 13, 865778.

Chiancone, B., Karasawa, M. M., Gianguzzi, V., Abdelgalel, A. M., Bárány, I., Testillano, P. S., Marinoni, D. T., Botta, R., & Germanà, M. A. (2015). Early embryo achievement through isolated microspore culture in *Citrus clementina* Hort. ex Tan., cvs. 'Monreal Rosso' and 'Nules'. *Frontiers in plant science*, 6, 413.

Coe, E. H. (1959). A line of maize with high haploid frequency. *Am Nat* 93:381–382

Corral-Martínez, P., & Seguí-Simarro, J. M. (2014). Refining the method for eggplant microspore culture: effect of abscisic acid, epibrassinolide, polyethylene glycol, naphthaleneacetic acid, 6-benzylaminopurine and arabinogalactan proteins. *Euphytica*, 195, 369-382.

Corral-Martínez, P., Camacho-Fernández, C., Mir, R., & Seguí-Simarro, J. M. (2021). Doubled Haploid Production in High- and Low-Response Genotypes of Rapeseed (*Brassica napus*) Through Isolated Microspore Culture. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 2288, 129–144.

De Vriese, K., Himschoot, E., Dünser, K., Nguyen, L., Drozdzecki, A., Costa, A., & Vanneste, S. (2019). Identification of novel inhibitors of auxin-induced Ca<sup>2+</sup> signaling via a plant-based chemical screen. *Plant Physiology*, 180(1), 480-496.

- Dolatabadian, A., Cornelsen, J., Huang, S., Zou, Z., & Fernando, W. G. D. (2022). Sustainability on the farm: breeding for resistance and management of major canola diseases in Canada contributing towards an IPM approach. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 44(2), 157–190.
- FAO. (2020). *Food Outlook - Biannual Report on Global Food Markets: June 2020*. Food Outlook, 1. Rome
- Ferrie, A. M. R., Caswell, K. L. (2010) Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 104:301–309.
- Ferrie, A. M. R., Möllers, C. (2011). Haploids and doubled haploids in Brassica spp. for genetic and genomic research. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 104, 375–386.
- Fu, S., Yin, L., Xu, M., Li, Y., Wang, M., Yang, J., Fu, T., Wang, J., Shen, J., Ali, A., Zou, Q., Yi, B., Wen, J., Tao, L., Kang, Z., & Tang, R. (2018). Maternal doubled haploid production in interploidy hybridization between Brassica napus and Brassica allooctaploids. *Planta*, 247(1), 113–125.
- Gilles, L. M., Martinant, J. P., Rogowsky, P. M., & Widiez, T. (2017). Haploid induction in plants. *Current biology : CB*, 27(20), R1095–R1097.
- Guha, S. and Maheshwari, S.C. (1964) In Vitro Production of Embryos from Anthers of Datura. *Nature*, 204, 497.
- Hayashi, K. I., Neve, J., Hirose, M., Kuboki, A., Shimada, Y., Kepinski, S., & Nozaki, H. (2012). Rational design of an auxin antagonist of the SCFTIR1 auxin receptor complex. *ACS chemical biology*, 7(3), 590-598.
- Hays, D., Mandel, R. & Pharis, R. (2001). Hormones in zygotic and microspore embryos of Brassica napus. *Plant Growth Regulation* 35, 47–58.
- Ishii, T., Karimi-Ashtiyani, R., & Houben, A. (2016). Haploidization via Chromosome Elimination: Means and Mechanisms. *Annual review of plant biology*, 67, 421–438.
- Johnson-Flanagan, A. M., Huiwen, Z., Geng, X. M., Brown, D. C., Nykiforuk, C. L., & Singh, J. (1992). Frost, Abscisic Acid, and Desiccation Hasten Embryo Development in Brassica napus. *Plant physiology*, 99(2), 700–706.
- Takej, Y., Yamazaki, C., Suzuki, M., Nakamura, A., Sato, A., Ishida, Y., Kikuchi, R., Higashi, S., Kokudo, Y., Ishii, T., Soeno, K., & Shimada, Y. (2015). Small-molecule auxin inhibitors that target YUCCA are powerful tools for studying auxin function. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 84(4), 827–837.
- Karami, O., Philipsen, C., Rahimi, A., Nurillah, A. R., Boutilier, K., & Offringa, R. (2023). Endogenous auxin maintains embryonic cell identity and promotes somatic embryo

development in Arabidopsis. The Plant journal : for cell and molecular biology, 113(1), 7–22.

Kasha, K. J., & Kao, K. N. (1970). High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Nature*, 225(5235), 874–876.

Kitahata, N., Han, S. Y., Noji, N., Saito, T., Kobayashi, M., Nakano, T., Kuchitsu, K., Shinozaki, K., Yoshida, S., Matsumoto, S., Tsujimoto, M., & Asami, T. (2006). A 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase inhibitor for use in the elucidation of abscisic acid action mechanisms. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 14(16), 5555–5561.

Koh, H. J., Kwon, S. Y., & Thomson, M. (2015). *Current technologies in plant molecular breeding. A guide book of plant molecular breeding for researchers*: Springer.

Lichter, R. (1982). Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 105(5), 427-434.

Livanos, P., Giannoutsou, E., Apostolakos, P., & Galatis, B. (2015). Auxin as an inducer of asymmetrical division generating the subsidiary cells in stomatal complexes of *Zea mays*. *Plant signaling & behavior*, 10(3), e984531.

Lulsdorf, M., Yuan, H. Y., Slater, S., Vandenberg, A., Han, X., & Zaharia, L. I. (2012). Androgenesis-inducing stress treatments change phytohormone levels in anthers of three legume species (Fabaceae). *Plant cell reports*, 31(7), 1255–1267.

Maia, J., Dekkers, B. J., Dolle, M. J., Ligterink, W., & Hilhorst, H. W. (2014). Abscisic acid (ABA) sensitivity regulates desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis* seeds. *New Phytologist*, 203(1), 81-93.

Malik, M. R., Wang, F., Dirpaul, J. M., Zhou, N., Hammerlindl, J., Keller, W., Abrams, S. R., Ferrie, A. M., & Krochko, J. E. (2008). Isolation of an embryogenic line from non-embryogenic *Brassica napus* cv. Westar through microspore embryogenesis. *Journal of experimental botany*, 59(10), 2857–2873.

Martín, A. (2002). Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. In: Nuez, F., Carrillo Becerril, J. M., Lozano, R. (eds) *Genómica y Mejora Vegetal*. Mundi-Prensa, Sevilla, pp 37-63

Nambara, E., Okamoto, M., Tatematsu, K., Yano, R., Seo, M., & Kamiya, Y. (2010). Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. *Seed Science Research*, 20(2), 55-67.

OECD. (2012). Organisation for Economic Co-operation and Development. Consensus document on the biology of the brassica crops (*Brassica* spp.). Series on Harmonisation of Regulatory oversight of Biotechnology, No 54, OECD, Paris, pp 142.

- Parra-Vega, V., González-García, B. & Seguí-Simarro, J.M. (2013). Morphological markers to correlate bud and anther development with microsporogenesis and microgametogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Acta Physiol Plant* 35, 627–633
- Pérez-Pérez, Y., El-Tantawy, A. A., Solís, M. T., Risueño, M. C., & Testillano, P. S. (2019). Stress-Induced Microspore Embryogenesis Requires Endogenous Auxin Synthesis and Polar Transport in Barley. *Frontiers in plant science*, 10, 1200.
- Prem, D., Solís, M. T., Bárány, I. et al. (2012). A new microspore embryogenesis system under low temperature which mimics zygotic embryogenesis initials, expresses auxin and efficiently regenerates doubled-haploid plants in *Brassica napus*. *BMC Plant Biol* 12, 127.
- Rakow, G. (2004). Species Origin and Economic Importance of Brassica. In: Pua, EC., Douglas, C.J. (eds) *Brassica. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol 54. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Ren, J., Wu, P., Trampe, B., Tian, X., Lübberstedt, T., & Chen, S. (2017). Novel technologies in doubled haploid line development. *Plant biotechnology journal*, 15(11), 1361–1370.
- Rivas-Sendra, A., Corral-Martínez, P., Porcel, R., Camacho-Fernández, C., Calabuig-Serna, A., & Seguí-Simarro, J. M. (2019). Embryogenic competence of microspores is associated with their ability to form a callosic, osmoprotective subintinal layer. *Journal of experimental botany*, 70(4), 1267–1281.
- Rodríguez-Sanz, H., Solís, M. T., López, M. F., Gómez-Cadenas, A., Risueño, M. C., & Testillano, P. S. (2015). Auxin biosynthesis, accumulation, action and transport are involved in stress-induced microspore embryogenesis initiation and progression in *Brassica napus*. *Plant and Cell Physiology*, 56(7), 1401-1417.
- Saeki, N., Kawanabe, T., Ying, H., Shimizu, M., Kojima, M., Abe, H., Okazaki, K., Kaji, M., Taylor, J. M., Sakakibara, H., Peacock, W. J., Dennis, E. S., & Fujimoto, R. (2016). Molecular and cellular characteristics of hybrid vigour in a commercial hybrid of Chinese cabbage. *BMC plant biology*, 16, 45.
- Seguí-Simarro, J. M. (2010). Androgenesis Revisited. *The Botanical Review*. 76. 377-404. 10.1007/s12229-010-9056-6.
- Seguí-Simarro, J. M., & Nuez, F. (2008). How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiologia plantarum*, 134(1), 1–12.
- So, K. K. Y., & Duncan, R. W. (2021). Breeding Canola (*Brassica napus* L.) for Protein in Feed and Food. *Plants (Basel, Switzerland)*, 10(10), 2220.

Teale, W. D., Paponov, I. A., & Palme, K. (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(11), 847–859.

Verma, S., Attuluri, V. P. S., & Robert, H. S. (2021). An essential function for auxin in embryo development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 13(4), a039966.

Weijers, D., Nemhauser, J., & Yang, Z. (2018). Auxin: small molecule, big impact. *Journal of experimental botany*, 69(2), 133–136.

Weyen, J. (2021). Applications of Doubled Haploids in Plant Breeding and Applied Research. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2287, 23–39.

Ye, Y., Zhou, L., Liu, X., Liu, H., Li, D., Cao, M., Chen, H., Xu, L., Zhu, J. K., & Zhao, Y. (2017). A Novel Chemical Inhibitor of ABA Signaling Targets All ABA Receptors. *Plant physiology*, 173(4), 2356–2369.

Yoshida, T., Christmann, A., Yamaguchi-Shinozaki, K., Grill, E., & Fernie, A. R. (2019). Revisiting the Basal Role of ABA - Roles Outside of Stress. *Trends in plant science*, 24(7), 625–635.

Zhao Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual review of plant biology*, 61, 49–64.

# ANEXO 1

## IAA: Niveles y Perfiles hormonales

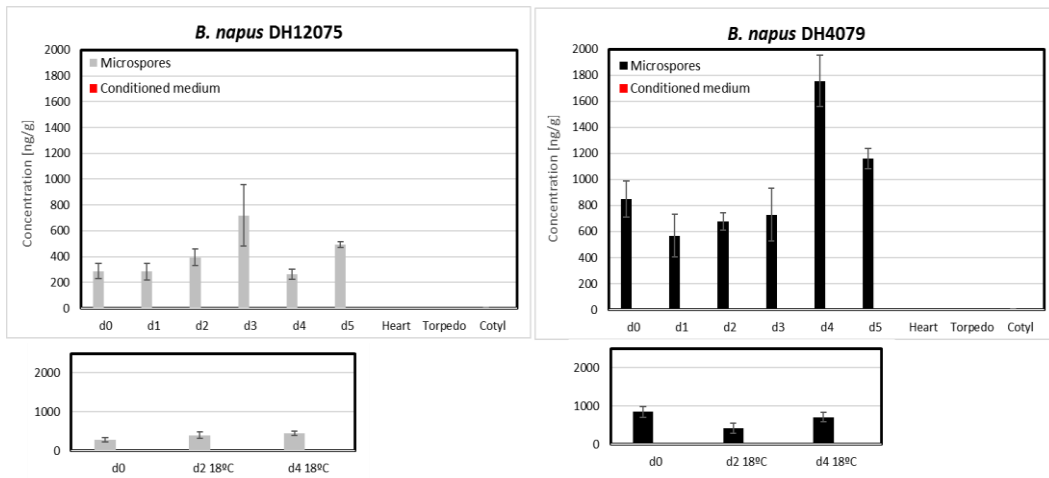


Figura A.1. Concentraciones de IAA en ambos genotipos a lo largo del tiempo y fases del desarrollo embrionario. Arriba: estrés de 32°C, Abajo: 18°C

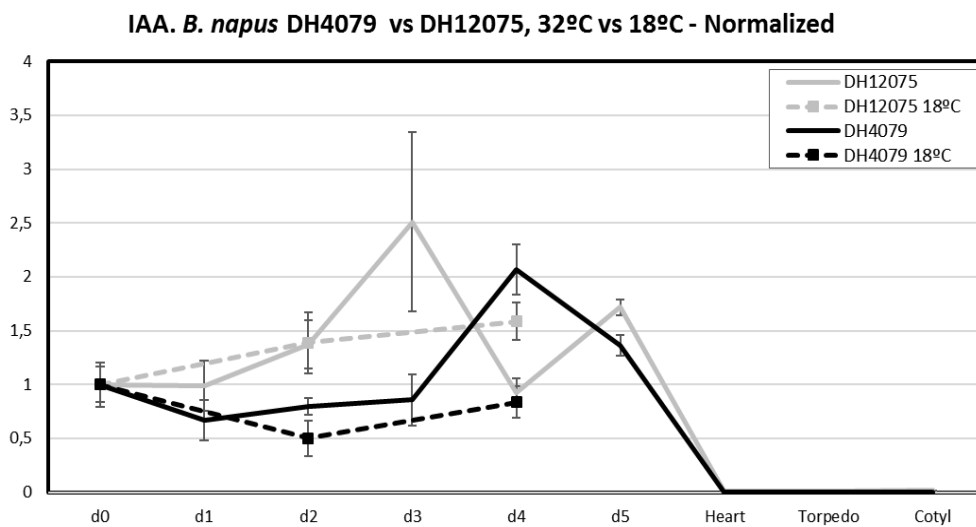


Figura A.2. Perfil hormonal de IAA a lo largo del desarrollo cultivo para los diferentes ensayos (línea continua implica choque térmico de 32°C, línea discontinua implica cultivo a 18°C).

## ABA: Niveles y Perfiles hormonales

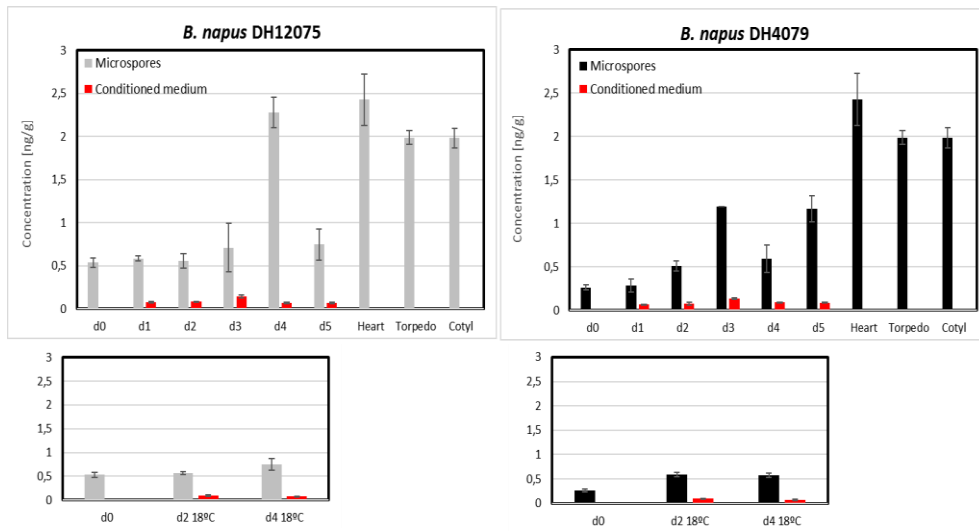


Figura A.3. Concentraciones de ABA en ambos genotipos a lo largo del tiempo y fases del desarrollo embrionario. Arriba: estrés de 32°C, Abajo: 18°C

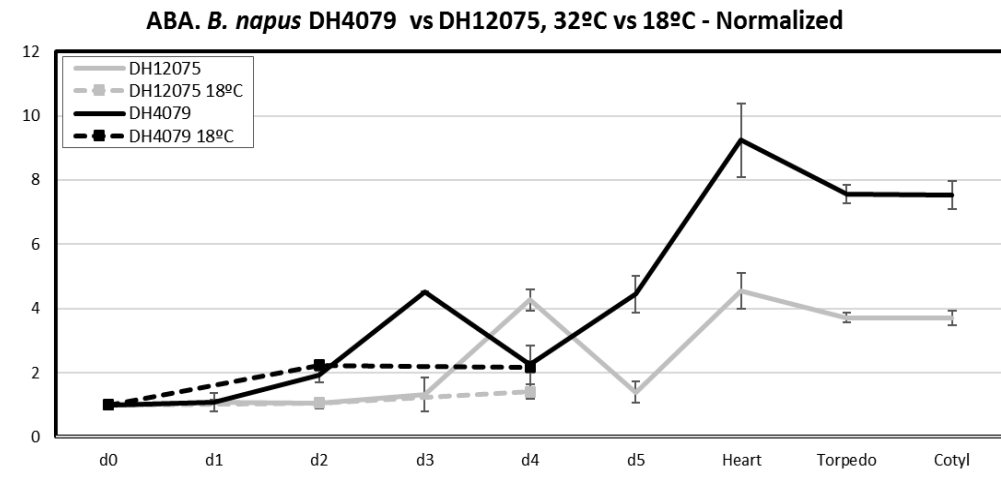


Figura A.4. Perfil hormonal de ABA a lo largo del cultivo para los diferentes ensayos (línea continua implica choque térmico de 32°C, línea discontinua implica cultivo a 18°C).