

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Genética



TESIS DOCTORAL

**Reprogramación del polen a embriogénesis inducida por
estrés: identidad celular, muerte celular programada y papel de
la metilación de DNA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Teresa Solís González

Directores

Pilar S. Testillano
M.C. Risueño Almeida
Manuel Díez Sancho

Madrid, 2012

El desarrollo del grano de polen es un proceso estrictamente regulado a nivel génico que conduce a la formación de un organismo haploide, el gametofito masculino o grano de polen, cuyas células poseen una alta especialización, necesaria para su importante función en la germinación del tubo polínico y doble fecundación de las plantas con flores. Mediante la aplicación de un tratamiento de estrés *in vitro* en la etapa adecuada del desarrollo, concretamente en la fase de microspora vacuolada, la microspora puede desviar su ruta de desarrollo gametofítico hacia una ruta embriogénica con la formación de un embrión haploide, proceso conocido como embriogénesis del polen, que representa una importante herramienta biotecnológica en mejora vegetal para la obtención rápida de plantas doble haploides, líneas isogénicas y nuevas variedades. Este proceso se ha puesto a punto en numerosas especies, sin embargo, su rendimiento es muy bajo en algunas plantas de interés económico, ya que todavía son poco conocidos los mecanismos celulares y moleculares que intervienen en el cambio de programa de desarrollo. El desarrollo esporofítico y gametofítico del polen en la antera está asociado al correcto desarrollo del tapetum o tejido nutricio de la antera, que una vez finalizada su función sufre una degeneración mediante muerte celular programada (MCP).

En esta Tesis se plantea el estudio de diferentes aspectos de la fisiología del proceso de embriogénesis del polen en comparación con el desarrollo gametofítico del polen, con el objetivo de comprender los mecanismos que controlan la reprogramación celular, la adquisición de competencia embriogénica y la identidad celular mediante tratamientos de estrés, centrándose el estudio en la identificación de marcadores de embriogénesis, la dinámica de la pared celular, la metilación del DNA y los sucesos de muerte celular programada (MCP). Por otro lado, debido a la importancia de la MCP y la metilación del DNA durante la reprogramación a embriogénesis inducida por estrés, se plantea también el estudio de la dinámica de estos dos procesos durante la diferenciación del polen *in vivo*, especialmente, durante el desarrollo y MCP del tapetum.

El material empleado para este estudio han sido diferentes sistemas vegetales, en función de los objetivos perseguidos en cada caso. Así, por un lado, se han utilizado especies herbáceas, modelos del proceso, en las cuales se han establecido eficientes sistemas de cultivo *in vitro* como *Brassica napus* y *Nicotiana tabacum*, y por otro lado, un árbol frutal, *Olea europaea*, con un mayor interés aplicado, en el que los sistemas de cultivo *in vitro*, están todavía en desarrollo. La comparación entre especies modelo y árboles, puede ser muy útil en el desarrollo y mejora de nuevos sistemas *in vitro*, por extensión de conocimientos entre especies.

El abordaje experimental ha consistido en el desarrollo de cultivos *in vitro* de microsporas aisladas y el empleo de diversas técnicas: a)citoquímicas para la detección *in situ* de diferentes componentes celulares (Calcofluor White para celulosa, I₂KI para almidón y Azul de Evans para detección de muerte celular), b)inmunocitoquímicas con anticuerpos específicos que reconocen pectinas con diferente grado de esterificación (Jim7 y Jim), RNA total (anti-RNA), citosinas metiladas (anti-5mdC) y MCP (caspasa 3), c)ensayos inmunoquímicos de “Dot blot” y ”Western blot”, d)ensayos de actividad enzimática, e)estudios de expresión mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y PCR semicuantitativa, f)electroforesis capilar de alta resolución (HPCE) para cuantificar el grado de metilación global del DNA y g)herramientas de transformación transitoria con GFP. Para ello, se emplearon diferentes métodos de procesamiento de muestras, los cuales fueron adaptados para el material objeto de estudio en cada momento.

Después del tratamiento de estrés inductor de la embriogénesis, las microsporas que reprograman su ruta abandonan su programa de desarrollo y adquieren competencia embriogénica, sin embargo, aquellas otras que no son capaces de reprogramarse hacia embriogénesis, se paran y mueren. En esta Tesis, **se ha optimizado el sistema de cultivo *in vitro* de microsporas** aisladas de *Brassica napus* para una mayor eficiencia de inducción a embriogénesis mediante estrés a 32°C, junto con el desarrollo de una metodología óptima para la germinación de embriones y su conversión a plantas

adultas. Al mismo tiempo, se ha desarrollado un nuevo sistema de cultivo *in vitro* en *Brassica napus* para la inducción eficiente de la embriogénesis a 18°C, sistema en el que la microspora sigue dos rutas de desarrollo embriogénico diferentes y permitirá abordar el desarrollo de estudios comparativos entre ellas.

Se han estudiado **otras posibles respuestas al tratamiento de estrés** inductor de las microsporas que no reprograman su ruta de desarrollo hacia embriogénesis, mediante el análisis de los niveles de **muerte celular** y marcadores de MCP durante las primeras etapas del cultivo embriogénico, identificándose por primera vez la localización y actividad enzimática tipo caspasa. Los resultados muestran que las primeras etapas del cultivo se caracterizan por elevados niveles de muerte celular e indican que algunas de las células que no responden al tratamiento de estrés inductor de embriogénesis, siguen una ruta dependiente de “actividad caspasa 3 like”, sugiriendo que parte de los elevados niveles de muerte celular detectados en las primeras etapas del cultivo, podrían deberse a procesos de muerte celular programada (MCP), posiblemente desencadenados por el tratamiento de estrés. La identificación de rutas de muerte celular programada como respuesta al tratamiento de estrés en cultivos de polen, serán de gran ayuda en el diseño de estrategias *in vitro* que puedan bloquear la MCP y que aumenten la viabilidad y la inducción de embriogénesis.

Se han **establecido marcadores moleculares y celulares** que cambian con la **identidad celular** y diferencian las células reprogramadas a embriogénesis en las primeras etapas del proceso, como son: la organización estructural idéntica de los núcleos, la tabicación citoplásmica, la ausencia de almidón y la diferente composición de pectinas y celulosa de la pared celular.

Los marcadores identificados son comunes para olivo y colza, sugiriendo que los mecanismos implicados en la reprogramación a embriogénesis son análogos en ambas especies pudiendo ser empleados como herramientas para la monitorización de procesos metabólicos implicados en la reprogramación y para la identificación de

células destinadas al programa de desarrollo embriogénico frente a aquellas otras células que no responden al tratamiento inductor.

Las pectinas son un componente principal de las paredes celulares, su modificación por la enzima pectinmetilesterasa (PME) actúa regulando la estructura y la rigidez de la pared celular. En este trabajo, se ha analizado la **dinámica de la esterificación de pectinas y el patrón de expresión de la *BnPME*** durante los dos programas de desarrollo del polen, el desarrollo gametofítico y la embriogénesis de polen inducida mediante tratamientos de estrés. Los resultados obtenidos indican que las pectinas esterificadas y no esterificadas tienen patrones de distribución opuestos durante los dos programas de desarrollo, en relación a los procesos de proliferación y diferenciación. Así, el polen maduro y las etapas más avanzadas del desarrollo embriogénico, con una mayor diferenciación celular, se caracterizan por elevados niveles de pectinas desmetilesterificadas, así como de una alta expresión de *BnPME*; mientras que las microsporas inmaduras y las primeras fases de embriogénesis, asociadas con procesos de proliferación, presentan una mayor proporción de pectinas altamente esterificadas y una expresión baja de *BnPME*. En base a estos resultados, los altos niveles de pectinas no esterificadas pueden ser considerados como marcadores del desarrollo gametofítico, mientras que la presencia de pectinas esterificadas pueden emplearse como un marcador del desarrollo embriogénico del polen, permitiendo la identificación de las microsporas inducidas y los primeros proembriones.

El análisis de **localización *in vivo* de la proteína de fusión GFP-PME** en el microscopio confocal en hojas de tabaco transformadas transitoriamente, indica que la proteína PME es dirigida a las paredes celulares diferenciadas de las células epidérmicas y del mesófilo, donde presumiblemente realiza su actividad enzimática sobre las pectinas *in muro*.

Los mecanismos que subyacen a la reprogramación nuclear, implican cambios en la estructura de la cromatina y la expresión génica de todo el genoma. Los cambios epigenéticos o modificaciones covalentes de los constituyentes de la cromatina, como la metilación del DNA, modulan la conformación de la cromatina y por tanto son un factor clave de regulación de estos cambios y como consecuencia, de la actividad génica. En este trabajo se ha analizado los **niveles y dinámica de metilación del DNA** durante el desarrollo y embriogénesis del polen.

Se ha puesto a punto el ensayo para cuantificar el nivel de metilación de DNA genómico mediante electroforesis capilar de alta resolución (HPCE) en anteras y microsporas aisladas en diversas etapas del desarrollo gametofítico del polen y del cultivo embriogénico. Los resultados indican cambios en la metilación del DNA y en la arquitectura nuclear durante la diferenciación, proliferación y MCP. Así, durante el proceso de maduración del polen y MCP del tapetum, se produce un aumento del nivel de metilación, asociado a la heterocromatinización que tiene lugar durante estos procesos. Sin embargo, tras la reprogramación a embriogénesis de las microsporas, los niveles de metilación disminuyen, en relación al proceso de proliferación que se inicia como consecuencia del cambio de programa de desarrollo. En etapas posteriores del proceso de embriogénesis, se aprecia un incremento en los niveles de metilación de DNA, asociado a la diferenciación que tiene lugar en las etapas avanzadas del desarrollo embriogénico. Además, los resultados obtenidos muestran cambios específicos en los patrones de distribución nuclear de la 5-metil-deoxicitidina (5mdC), durante los programas de desarrollo estudiados, en relación a los patrones de condensación cromatínica.

En este trabajo también se ha analizado **la expresión del gen de la enzima DNA metiltransferasa 1, *NtMET1***, principal responsable de la metilación del DNA, en etapas específicas de los cultivos embriogénicos, del desarrollo del polen y de la MCP del tapetum. Los resultados muestran que la expresión de *NtMET-1* está regulada durante el desarrollo gametofítico y la embriogénesis del polen; los cambios de nivel

de expresión están asociados a las variaciones de metilación global del DNA que suceden con el cambio de programa de desarrollo y a procesos de diferenciación y proliferación, aumentando su expresión en fases de alto grado de metilación y disminuyendo cuando la metilación global del DNA es baja.

Durante la microsporogénesis y desarrollo *in vivo* del polen, el tapetum, tejido nutricio de la antera, tiene una función fundamental y una vez terminada inicia un proceso de degradación mediante MCP. En este trabajo, se han analizado los cambios en núcleo y citoplasma para la **caracterización de la MCP y la identificación de marcadores de apoptosis** en el tapetum. Los resultados muestran por primera vez, la localización y determinación de actividad enzimática de proteínas tipo caspasa 3 en el tapetum, indicando que las células del tapetum sufren un proceso de MCP a través de una ruta dependiente de proteínas tipo caspasa 3. El proceso se caracteriza por una progresiva condensación cromatínica, lobulación nuclear, contracción citoplásmica y cambios en la distribución de RNA y segregación de ribonucleoproteínas (RNPs), características propias de los procesos de apoptosis de células animales.

También se ha analizado la **metilación del DNA durante el desarrollo y MCP del tapetum**, observándose un incremento de los niveles de metilación global del DNA y un cambio en el patrón de distribución de 5mdC, desde pequeños spots en etapas metabólicamente activas hasta su concentración en grandes masas de cromatina condensada en MCP avanzada. El análisis de **expresión de *NtMET1*** indica un incremento de la expresión **durante el desarrollo y MCP del tapetum**.

En este trabajo se han estudiado los **niveles y distribución de marcadores nucleares específicos implicados en la síntesis, procesamiento y degradación de RNA durante la diferenciación in vivo del polen y MCP del tapetum**. Se ha analizado la distribución de híbridos DNA:RNA, CstF (“cleavage stimulation factor”), RNAs poliadenilados y RNasa A. Los resultados obtenidos, muestran que durante la diferenciación del polen *in vivo* tiene lugar una remodelación del dominio

intercromatínico que conlleva una disminución gradual de la actividad transcripcional. El incremento de los niveles de metilación detectados en estos procesos aparecen asociados a esta disminución de la actividad transcripcional. Durante el desarrollo y MCP del tapetum, nuestros resultados aportan nuevos datos sobre la organización estructural y funcional del núcleo. La disminución de híbridos DNA:RNA, transcritos poliadenilados y de los factores de splicing como CstF en comparación con células transcripcionalmente activas, indican una disminución de la actividad transcripcional asociado al proceso de MCP, al mismo tiempo que sugieren la participación de la enzima RNasa A en la degradación de RNA en etapas tempranas de la MCP del tapetum apoyando la idea de que durante el desarrollo y MCP del tapetum se produce una disminución de la síntesis y procesamiento de RNAm, acompañado de un proceso de degradación masiva de RNA.

Los resultados obtenidos en esta Memoria Doctoral aportan una información clave sobre la fisiología de la reprogramación celular y la adquisición de competencia embriogénica, procesos de gran interés básico y que además podrán ser empleados en el diseño y optimización de nuevos sistemas *in vitro* con mayor eficiencia, además de establecer las bases para el diseño de estrategias de transformación.

AFS: Automatic Freeze-substitution System (Sistema de criosustitución automático)
AU: acetato de uranilo
BFB: Azul de bromofenol
BSA: Bovine Serum Albumin (Albúmina de suero bovino)
CF: Contraste de fase
CP: citrato de plomo
CW: Calcofluor White
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DNAc: Ácido desoxirribonucleico complementario
D.O: Densidad óptica
DAPI: 4',6-diaminido-2-fenilindol diacetato
DEPC: Dietilpirocarbonato
dH₂O: Agua destilada
DIC: Contraste diferencial
Dig: Digoxigenina
DMSO: Dimetilsulfóxido
dNTP: Desoxinucleótidos
D'TT: 1,4-ditiotreitol
CstF: "Cleavage stimulation transcription factor" (Factor estimulante del corte).
EDTA: Sal sódica del ácido etilendiaminetetracético
EtOH: Etanol
FCS: Fetal Calf Serum (Suero bovino fetal)
FISH: Fluorescence *In situ* Hybridization (Hibridación *in situ* con fluorescencia)
HPCE: Electroforesis capilar de alta resolución
I²KI: Yodo/yoduro potásico
IPTG: 1-isopropil-b-D-1-tiogalactopiranosido
l: Litro
LB: Medio de cultivo de Luria-Bertani
M: Molar (Moles/l)
MA: Metilación-acetilación
MCP: muerte celular programada
MET1: DNA metiltransferasa 1
MES: "2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid"
5mdC: 5 metildeoxicitidina.
min.: Minuto/s
mg: Miligramos
ml: Mililitro
mm: Milímetros
mM: Milimolar
MS: Medio de cultivo Murashige y Skoog
msp: Microspora
MV: microspora vacuolada
µm: Micrómetro
nm: Nanómetro
OCT: (Optimal Cutting Temperature)

Abreviaturas

PA: pared antera
PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis (Electroforesis en gel de poliacrilamida)
PBS: Phosphate buffered saline (Tampón fosfato salino)
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PM: polen maduro
PME: Pectinmetilesterasa
PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVC: Policloruro de vinilo
PVDF: difluoruro de polivinilo
RNA: Ácido ribonucleico
RNAasa: Ribonucleasa
RNAm: Ácido ribonucleico mensajero
RNAhn: Ácido ribonucleico heterogéneo nuclear
RNP: Ribonucleoproteína
SDS: Docecil sulfato sódico
Seg: Segundo/s
snRNP: Small nuclear RNP (pequeña ribonucleoproteína nuclear)
SSC: Citrato sódico 0.06 M, pH 7.0, y 0,6 M NaCl
Tap: Tapetum
TBS: Tris HCl 20 mM pH 7.8, NaCl 0.18 M
TCA: Ácido tricloroacético
TEMED: N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina
Tris: Trihidroximetilaminometano
T.a.: Temperatura ambiente
UV: Ultravioleta
Vol.: Volumen

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	El Grano de polen	3
1.1.1	Fertilización en Angiospermas	3
1.1.2	Desarrollo del grano de polen <i>in vivo</i>	7
1.1.3	Interés del grano de polen como sistema biológico.....	20
1.2	El proceso de embriogénesis.....	22
1.2.1	La embriogénesis cigótica.	22
1.2.2	La embriogénesis del polen.....	25
1.3	La pared celular	34
1.3.1	Composición de la pared celular.....	34
1.3.2	Pectinas.....	36
1.3.3	Pectinmetilesterasas	37
1.4	Marcas epigenéticas y desarrollo.....	42
1.4.1	Metilación del DNA.	43
1.4.2	DNA metiltransferasas en plantas.....	48
1.5	El Núcleo celular.....	51
1.5.1	La arquitectura nuclear / organización nuclear.....	52
1.6	Muerte celular programada.....	56
1.6.1	Características de la muerte celular programada en plantas.....	58
1.6.2	Caspasas.....	61
2	OBJETIVOS.....	65
3	MATERIAL Y MÉTODOS	71
3.1	Material vegetal y condiciones de cultivo	73
3.1.1	Plantas de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv Petit Habana SR1).....	73
3.1.2	Plantas de colza (<i>Brassica napus</i> L. cv. Topas).....	73
3.1.3	Meristemos de raíz de cebolla (<i>Allium cepa</i> L.).....	73
3.1.4	Microsporas de olivo (<i>Olea europea</i> L.).....	74
3.2	Cultivo de microsporas aisladas de <i>Brassica Napus</i> L.....	75

3.2.1 Preparación del medio de cultivo	75
3.2.2 Correlación entre el tamaño de las yemas florales y su fase de desarrollo	75
3.2.3 Aislamiento de microsporas y puesta en cultivo	76
3.2.4 Seguimiento del cultivo	77
3.2.5 Recogida de muestras	79
3.2.6 Germinación de embriones y regeneración de plántulas.	80
3.3 Técnicas de biología celular.....	80
3.3.1 Procesamiento de muestras para microscopia óptica	80
3.3.2 Recubrimiento de portaobjetos con APTES	83
3.3.3 Obtención de cortes en vibratomo	84
3.3.4 Obtención de cortes ultrafinos	85
3.3.5 Criotécnicas.....	88
3.3.6 Técnicas citoquímicas.....	98
3.3.7 Detección de muerte celular con Azul de Evans	104
3.4 Inmunocitoquímicas.....	104
3.4.1 Inmunocitoquímicas a nivel de microscopia óptica.....	104
3.4.2 Inmunomarcado con oro coloidal e hibridación <i>in situ</i> para microscopía electrónica.....	109
3.5 Cuantificación del porcentaje de metilación global del DNA genómico	113
3.5.1 Preparación del material vegetal	113
3.5.2 Extracción del DNA genómico.....	113
3.5.3 Evaluación del DNA genómico.....	114
3.5.4 Concentración del DNA extraído	114
3.5.5 Hidrólisis del DNA genómico	115
3.5.6 Electroforesis capilar de alta resolución	115
3.6 “Immunoblot”	118
3.6.1 Extracción de proteínas totales.....	118
3.6.2 Separación de proteínas por electroforesis en geles de Poliacrilamida en Condiciones Desnaturalizantes (PAGE-SDS)	120

3.6.3 Transferencia de proteínas e inmunodetección (Técnica de Western Blot)	121
3.6.4 “Immuno Dot blot”	124
3.7 Determinación de la actividad enzimática caspasa 3	126
3.7.1 Preparación del material	127
3.7.2 Extracción de proteínas	127
3.7.3 Ensayo de actividad caspasa 3	127
3.7.4 Análisis de los datos	129
3.8 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	129
3.8.1 Extracción de RNA total	129
3.8.2 Síntesis y marcado de la sonda	131
3.8.3 Preparación de las muestras	140
3.8.4 Pretratamiento de las muestras	140
3.8.5 Hibridación	140
3.8.6 Detección de los híbridos por inmunofluorescencia	140
3.9 RT-PCR Semicuantitativa	141
3.9.1 Transcripción inversa	141
3.9.2 Diseño y síntesis de oligonucleótidos para la obtención de cDNAs	141
3.9.3 RT-PCR Semicuantitativa	141
3.10 Estudios de localización mediante tecnología GFP	142
3.10.1 Obtención del producto de PCR <i>BnPME</i>	144
3.10.2 Transformación de <i>Agrobacterium thumefaciens</i>	154
3.10.3 Transformación transitoria de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> mediante agroinfiltración	155
3.10.4 Análisis confocal de las plantas transformadas	156
4 RESULTADOS	149
4.1 Desarrollo <i>in vitro</i> y caracterización celular de la reprogramación de la microspora a embriogénesis	151

4.1.1 Etapas principales del desarrollo <i>in vitro</i> de embriogénesis del polen en <i>Brassica napus</i>	151
4.1.2 Germinación de embriones y regeneración y aclimatación de las plantas derivadas de microsporas	155
4.1.3 Nuevo sistema de inducción a embriogénesis de microsporas de <i>Brassica napus</i> mediante estrés a 18°C.....	157
4.1.4 Marcadores celulares de las distintas etapas de embriogénesis del polen en <i>Brassica napus</i>	161
4.1.5 Caracterización celular de las primeras etapas de la embriogénesis del polen en olivo (<i>Olea europea L.</i>).....	171
4.2 Modificaciones en los componentes de la pared celular durante la inducción y desarrollo de la embriogénesis del polen.....	181
4.2.1 Cambios en la esterificación de pectinas de la pared celular durante los dos programas de desarrollo del polen.....	181
4.2.2 Análisis del patrón de expresión de pectinmetilesterasa durante los dos programas de desarrollo del grano de polen	193
4.2.3 Localización subcelular de la enzima pectinmetilesterasa (PME) mediante tecnología GFP.....	206
4.3 Cambios epigenéticos asociados a la reprogramación de la microspora a embriogénesis	213
4.3.1 Análisis de la metilación del DNA genómico.....	213
4.3.2 Análisis del patrón de expresión de DNA metiltransferasa 1 durante los dos programas de desarrollo del grano de polen.....	226
4.4 Tapetum y núcleo	240
4.4.1 Caracterización de la MCP del tapetum durante el desarrollo gametofítico del polen.....	240
4.4.2 Localización de antígenos nucleares durante la MCP del tapetum y el desarrollo del polen.....	261
4.5 Muerte celular durante las primeras etapas del cultivo <i>in vitro</i> de la microspora para inducción a embriogénesis	286

4.5.1 Detección de muerte celular durante las primeras etapas del cultivo <i>in vitro</i> de microsporas	286
4.5.2 Muerte celular programada durante las primeras etapas del cultivo <i>in vitro</i> de microsporas	290
5 DISCUSIÓN.....	297
5.1 Mejoras en la eficiencia de inducción a embriogénesis de la microspora mediante estrés térmico y desarrollo de un nuevo sistema <i>in vitro</i>	299
5.1.1 Optimización del sistema <i>in vitro</i> de embriogénesis de microsporas de <i>Brassica napus</i> a 32°C.....	299
5.1.2 Desarrollo de un nuevo sistema <i>in vitro</i> de inducción a embriogénesis de microsporas a 18°C.....	307
5.1.3 Mejoras en la eficiencia de germinación de embriones de polen y regeneración de plantas haploides/doble haploides.....	311
5.2 Otras respuestas celulares al estrés inductor de embriogénesis en el cultivo de microsporas: muerte celular programada.....	313
4.1.1 Las primeras etapas del cultivo <i>in vitro</i> de microsporas muestran altos niveles de muerte celular tras el tratamiento de estrés	313
5.2.1 La muerte celular en las primeras etapas del cultivo de microsporas presenta actividad tipo caspasa.	316
5.3 Marcadores tempranos de embriogénesis de polen.....	320
5.3.1 Marcadores celulares que diferencian las rutas de desarrollo gametofítico y embriogénico del polen.....	320
5.4 La esterificación de pectinas y la expresión de PECTINMETILESTERASA (PME) están regulados durante el desarrollo y embriogénesis del polen.....	333
5.4.1 Los componentes de la pared celular son marcadores de la reprogramación de la microspora a embriogénesis.....	333
5.4.2 Las pectinas esterificadas y no esterificadas muestran patrones de distribución opuestos durante el desarrollo gametofítico y la embriogénesis del polen	335

5.4.3 El patrón de expresión de <i>PME</i> cambia con los procesos de proliferación y diferenciación.....	336
5.4.4 Embriones derivados de microsporas y embriones cigóticos poseen un patrón de expresión de <i>PME</i> común	339
5.4.5 La proteína <i>PME</i> se localiza en la pared celular de células diferenciadas en hojas de tabaco transformadas con <i>PME-GFP</i>	340
5.5 La metilación del DNA y la expresión de la DNA metiltransferasa <i>MET1</i> cambian con la reprogramación celular y durante la embriogénesis	342
5.5.1 La diferenciación del polen está asociada al aumento de metilación del DNA.....	342
5.5.2 La reprogramación del polen está asociada a la disminución de la metilación del DNA y su redistribución nuclear.....	345
5.5.3 El desarrollo embriogénico del polen conlleva un aumento de metilación del DNA	347
5.5.4 La metilación del DNA y su patrón de distribución es análoga en embriones de microsporas y embriones cigóticos.....	348
5.5.5 La expresión del gen <i>MET1</i> está regulada durante el desarrollo y embriogénesis del polen	350
5.5.6 Embriones derivados de microsporas y embriones cigóticos poseen un patrón de expresión de <i>MET1</i> común	353
5.6 Muerte celular programada y metilación del DNA durante la diferenciación del polen <i>in vivo</i> y desarrollo del tapetum.....	356
5.6.1 La MCP del tapetum durante el desarrollo presenta características apoptóticas y actividad enzimática tipo caspasa 3	357
5.6.2 Durante la MCP del tapetum en el desarrollo gametofítico aumentan la metilación del DNA y la expresión de la DNA metiltransferasa, <i>MET1</i>	363
4.1.2 Cambios en la actividad y arquitectura nuclear durante el desarrollo y MCP del tapetum.....	365
5.6.3 Cambios en la actividad y arquitectura nuclear durante la diferenciación del polen.....	372

6	CONCLUSIONES.....	379
7	BIBLIOGRAFÍA.....	383

1 INTRODUCCIÓN

1.1 EL GRANO DE POLEN

1.1.1 Fertilización en Angiospermas

En el ciclo de vida de las angiospermas hay una alternancia entre una generación dominante diploide (esporofito) y una generación haploide (gametofito) (Ma and Sundaresan 2010) (Fig. 1.1).

Figura 1.1. Fertilización de angiospermas.

La generación esporofítica es la planta adulta desarrollada a partir de la germinación de la semilla, cuya función es la producción de esporas. La espora madre, entra en meiosis y produce 4 esporas hijas, que por división mitótica darán lugar a la otra generación: el gametofito.

Figura 1.2. Formación de los gametos masculino y femenino.

Las plantas con flores tienen dos tipos de gametofitos. El gametofito masculino es el grano de polen que da lugar a los gametos masculinos o células espermáticas. En el interior de los sacos polínicos de las anteras se encuentran las células madres de las microsporas, con una dotación genética diploide ($2n$), que al dividirse por meiosis forman una tétrada, conjunto de cuatro microsporas haploides (n) que darán lugar a los granos de polen (Fig. 1.2). El gametofito femenino es el saco embrionario que contiene la ovocélula u óvulo localizado dentro del ovario. La célula madre de la megaspora, diploide ($2n$), sufre la meiosis originando cuatro megasporas haploides (n), tres de las cuales degeneran y la restante sufre varias mitosis sucesivas hasta formar un saco embrionario con 7 células: la ovocélula o gameto femenino, dos sinérgidas que flanquean a la ovocélula, localizadas en el micrópilo al final del saco embrionario, tres antípodas localizadas en el lado opuesto, y la célula central con dos núcleos polares (Maheshwari and Johri 1950, Maheshwari 1963, Willemse 1984) (Fig. 1.2).

Cuando el proceso de polinización se ha completado, el grano de polen llega al estigma y germina desarrollando el tubo polínico, que crece a través del estilo, dirigiéndose a los óvulos (Ma and Sundaresan 2010). En este momento, en especies con grano de polen bicelular, la célula generativa del grano de polen se divide en las dos células espermáticas contenidas en el grano de polen, mientras que en especies con polen tricelular, la división de la célula generativa se produce antes de la emisión del tubo polínico. En cualquier caso, las células espermáticas viajan a lo largo del tubo polínico hasta alcanzar el gameto femenino. Una vez que la punta del tubo polínico llega al micrópilo del saco embrionario, el tubo crece hacia el interior del saco embrionario a través de una de las sinérgidas que flanquean la ovocélula, descargando allí su contenido: un núcleo espermático o gameto masculino (n) se fusiona con la ovocélula (n) produciendo el cigoto ($2n$) que desarrollará la próxima generación esporofítica, formando un embrión. El segundo núcleo espermático o gameto masculino (n) se fusiona con los dos núcleos polares (n) de la célula central del saco embrionario, produciendo el tejido nutritivo triploide ($3n$), denominado endospermo, que actúa como tejido de reserva para el crecimiento y desarrollo del embrión (Dumas and Rogowsky 2008, Sabelli and Larkins 2009) (Fig. 1.3).

A este proceso se le denomina doble fertilización, aunque la verdadera fertilización es la unión de la célula huevo con una de las células espermáticas.

Tras la fecundación de la célula huevo, comienza la fase esporofítica con la formación de un embrión diploide que se desarrolla en el interior del saco embrionario.

Figura 1.3. Doble fecundación en angiospermas.

La fertilización provoca que los integumentos del óvulo formen una cubierta, normalmente de consistencia dura y resistente, que será la cubierta de la semilla. Por otro lado, el ovario maduro se diferencia en un fruto protector alrededor de la semilla, que facilitará la dispersión de la misma (Miernyk et al. 2011) (Fig. 1.4).

El endospermo presente durante todo el proceso, proporciona nutrientes para el desarrollo del embrión y la germinación de la semilla.

Al finalizar el desarrollo del embrión o embriogénesis se forma el embrión maduro, que puede ser considerado una planta en miniatura en estado de vida latente, ya que tiene representados los tres órganos de una planta adulta: la radícula o raíz embrionaria, el hipocótilo o tallo y los cotiledones o primeras hojas (Fig. 1.4).

Figura 1.4. Embriogénesis cigótica en angiospermas dicotiledóneas.

Con las condiciones favorables, se produce la germinación de la semilla que dará lugar a la formación de la nueva planta en la que se repetirá de nuevo todo el proceso.

1.1.2 Desarrollo del grano de polen *in vivo*

1.1.2.1 Aparato reproductor masculino en angiospermas.

El androceo o aparato reproductor masculino está formado por los estambres, que se componen del filamento y la antera. El filamento es la parte estéril del estambre, que transmite agua y nutrientes a la antera y la posiciona para ayudar a la dispersión del polen. La antera es la parte fértil, constituida generalmente por dos partes simétricas llamadas tecas (aunque puede tener 1, 2 ó incluso 3 tecas) unidas por el tejido conectivo, zona de tejido estéril, que es la prolongación del filamento. Cada teca posee dos cavidades que se llaman sacos polínicos o microsporangios, donde se forman los granos de polen, que constituyen el gametofito masculino (Fig. 1.5).

Figura 1.5. Aparato masculino en angiospermas (Stanley and Linskens, 1974).

Al inicio del desarrollo, las células del primordio de la antera se dividen y se diferencian para formar varios tipos celulares (Ma 2005, Wilson and Zhang 2009).

En el estadio I se forma el primordio de la antera a partir del meristemo floral (Fig. 1.6). Las divisiones celulares dan lugar a la formación de 3 capas celulares. En el estadio II las células de la segunda capa, aumentan su tamaño y se convierten en células arquesporales, que tras experimentar una serie de divisiones periclinales, en el estadio III origina hacia el exterior una capa de células parietales (capa parietal primaria) y hacia el interior una capa de células esporógenas (capa esporógena primaria) (Hermann and Palser 2000, Canales et al. 2002, Li et al. 2010).

La capa parietal primaria se divide posteriormente dando lugar a una capa secundaria, en el estadio IV. La capa anterior se diferencia en el endotecio o tejido mecánico, mientras que la capa parietal secundaria se divide una vez más y forma una capa intermedia de células parenquimáticas, que degeneran rápidamente en el desarrollo, el tapetum, tejido nutricio de la antera que reviste el saco polínico en contacto directo con las células esporógenas y que va a intervenir muy activamente en el desarrollo del grano de polen (Hermann and Palser 2000, Canales et al. 2002, Li et al. 2010).

Figura 1.6. Morfogénesis de la antera.

En el estadio V del desarrollo, se aprecia ya una antera tetralobulada, en la que cada lóbulo contiene 4 tipos de células somáticas: la epidermis, el endotecio, la capa intermedia y el tapetum, que rodean a las células madre del polen (Ma and Sundaresan 2010) (Fig. 1.6 y 1.7).

Figura 1.7. Sección transversal de una antera joven.

Por otro lado, las células del tejido esporógeno van a dar lugar a diferentes células madres del polen. Cada una de ellas sufrirá meiosis para originar las microsporas, proceso conocido como microsporogénesis. Posteriormente, cada microspora

continuará su ruta de desarrollo hasta la formación del grano de polen maduro, proceso denominado microgametogénesis.

De manera que el desarrollo del polen es un proceso integrado en el cual, participan tres elementos: 1) Modificación de las células externas de la antera durante el desarrollo, 2) diferenciación de las células del tapetum (Pacini E, 1993) 3) desarrollo del polen a partir de la célula madre del polen mediante meiosis y mitosis haploide (Pacini 1997) ((Fig. 1.8).

En esta Tesis, se estudiarán diversos aspectos del proceso de desarrollo del polen y de las células del tapetum.

Figura 1.8. Desarrollo de la antera.

1.1.2.2 Microgametogénesis.

La célula madre del polen (PMC) está rodeada por una pared celular compuesta fundamentalmente por celulosa, que antes de la meiosis se desintegrará y será remplazada por una capa de calosa (Heslop-Harrison, 1966)(Heslop-Harrison, 1966; Risueño *et al.*, 1973)(Risueno, Gimenezm.G and Garcia 1973).

Figura 1.9. Esquema de los procesos de microsporogénesis y microgametogénesis. (Figura adaptada a partir de Twell D, 2006).

Durante la microesporogénesis la célula madre del polen sufre una división meiótica que da lugar a una tetrada, formada por cuatro microsporas haploides, que inicialmente se mantienen unidas por una capa de calosa que las rodea. Este estadio se completa tras la liberación de las microsporas al lóculo de la antera a partir de la degradación de la pared de calosa de la tetrada, por la acción de una mezcla de enzimas secretadas por el tapetum (Scott, Spielman and Dickinson 2004).

Durante la microgametogénesis, las microsporas liberadas aumentan su tamaño y sufren grandes cambios metabólicos y estructurales que afectan al citoplasma y al núcleo (Risueño 1988, Testillano 1988, Testillano 1991, González-Melendi 1996, Testillano et al. 1993)(Testillano, 1991;González-Melendi, 1996;Testillano and Risueño, 1988;Risueño *et al.*, 1988;Testillano *et al.*, 1993). Se produce un proceso de vacuolación citoplásmica en la microspora que culmina hacia el final de la larga interfase postmeiótica con la formación de una gran vacuola que ocupa la mayor parte del volumen del citoplasma y empuja lateralmente al núcleo, desplazándolo a una posición periférica en la célula próximo a la pared celular, provocando una reorganización del citoplasma (Shivanna 1985). El núcleo adquiere una organización estructural de abundante cromatina descondensada con pequeñas masas de cromatina condensada y un nucleolo con gran componente granular, organización típica de células activas en transcripción (Gonzalezmelendi et al. 1995).

En esta situación, la microspora sufre una primera mitosis asimétrica debido a la posición polar del núcleo y a la orientación del huso mitótico, de manera que después de la citocinesis, se origina un grano de polen bicelular formado por dos células hijas de diferente tamaño y estructura (McCormick 2004). La división asimétrica es un acontecimiento clave en el destino diferencial de ambas células (Twell, Park and Lalanne 1998, Park and Twell 2001). Esta primera mitosis se considera un marcador del fin del desarrollo de la microspora y el inicio del desarrollo del polen.

La célula de mayor tamaño es la célula vegetativa y la más pequeña es la célula generativa, ambas confinadas en la pared original de la microspora. La célula vegetativa ocupa la mayor parte del volumen del grano de polen, mientras que la generativa está incluida en el citoplasma de la anterior, próxima a la pared del grano de polen. No obstante, la célula generativa presenta una pared celular propia, en la que se ha detectado la presencia de calosa (Gorska-Btylass 1967), (Boavida, Becker and Feijo 2005) que permanece en la periferia rodeando el citoplasma de la célula generativa.

El núcleo de la célula vegetativa presenta una cromatina muy descondensada, propio de células muy activas transcripcionalmente. Por otro lado, el citoplasma vegetativo

es rico en todo tipo de orgánulos que van aumentando en número durante la maduración del grano de polen, al tiempo que se reabsorbe la vacuola que ocupaba gran parte de ese citoplasma (Risueno et al. 1970), (Sanger and Jackson 1971). Aparecen entonces gran número de plastidios que se van llenando de almidón (Feijo and Pais 1988) y otras moléculas de reserva como gotas de lípidos y partículas P con polisacáridos (Heslop-harrison 1979)(Heslop-Harrison, 1979). Así, en el polen ya maduro, la célula vegetativa posee gran cantidad de carbohidratos y/o reservas lipídicas junto con transcritos y proteínas, necesarios para el rápido crecimiento del tubo polínico (Pacini 1996). Además, también se acumulan osmoprotectores, incluyendo disacáridos, como prolina y glicina-betaína, para proteger las membranas vitales y proteínas de cualquier posible daño durante el proceso de deshidratación (Schwacke et al. 1999) que sufre el grano de polen como preparación para la dehiscencia (Bassani, Pacini and Franchi 1994).

Por el contrario, la célula generativa presenta un núcleo con cromatina muy condensada, propio de células con baja actividad transcripcional. También posee una fina capa de citoplasma con pocas mitocondrias, ribosomas, retículo endoplásmico disperso y dictiosomas (Sanger and Jackson 1971), (Burgess 1970). Sin embargo no aparecen plastidios en esta célula, posiblemente debido a la distribución polar de los orgánulos previa a la mitosis (Reynolds 1990). Se ha descrito una baja densidad de poros nucleares, indicativo de la escasa actividad transcripcional de la célula generativa (Wagner et al. 1990), aunque tiene lugar la expresión de genes cuyos productos se requieren para la segunda mitosis del polen, tales como ciclinas u otras proteínas de control del ciclo celular (Jacobs 1992).

En etapas sucesivas del proceso de maduración del polen, la célula generativa migra desde su posición inicial periférica, en contacto con la pared del polen, hacia el interior del grano de polen. Así en el último estadio de maduración del grano de polen, el núcleo vegetativo presenta una forma lobulada y el núcleo generativo, ya situado en el centro de la célula junto al núcleo vegetativo, que adquiere un perfil fusiforme (Martin, Risueno and Sogo 1970). Este proceso además está acompañado de un aumento progresivo del tamaño del grano de polen y un cambio de forma del

mismo, que al final del desarrollo adopta en muchos casos una morfología ovalada, debido en parte a la deshidratación parcial que tiene lugar en las etapas finales del proceso de maduración (Pacini 1996). En el momento de la antesis o dehiscencia, el contenido de agua se reduce de un 90% hasta un 45-50% (Barnabas 1985). A continuación, el grano de polen es transportado por el viento, insectos u otros agentes al estigma de un pistilo adecuado. Entonces tiene lugar la germinación y el grano de polen emite el tubo polínico que crece por el interior del estilo transportando los núcleos espermáticos (Arquiaga 1985). Uno de ellos se fusiona con la célula huevo o gameto femenino dando lugar al cigoto diploide y el otro se funde con la célula central del saco embrionario originando el endospermo triploide, responsable de la nutrición del embrión.

Esto indica que las células vegetativa y generativa no sólo son morfológicamente distintas, sino que tienen además diferente destino celular. La célula vegetativa es la encargada de la síntesis de la maquinaria necesaria para la formación de tubo polínico, que lleva los gametos masculinos a través del estilo hasta el saco embrionario o gametofito femenino para la doble fecundación. En cambio la célula generativa entra en ciclo celular y se divide mitóticamente dando lugar a dos núcleos espermáticos o gametos masculinos.

El momento en el que tiene lugar esta segunda mitosis, varía según la familia (McCormick 2004). No obstante, en la mayoría de los casos, el grano de polen maduro es bicelular y las células espermáticas se originan durante la emisión del tubo polínico (Cresti, Ciampolini and Sansavini 1980), como por ejemplo en *Nicotina tabacum*. Sin embargo, en otras especies, la segunda mitosis del polen ocurre en la antera dando lugar al grano de polen tricelular, como es el caso de la *Brassica napus*.

1.1.2.2.1 Formación de la pared celular del grano de polen.

Una de las características más importantes del grano de polen es su pared (Vizcay-Barrena and Wilson 2006).

La formación de la pared se inicia una vez completada la meiosis de la célula madre del polen y continúa durante la tetra y la fase de microspora vacuolada para completarse después de la primera mitosis del polen, gracias a la contribución fundamental del tapetum (Boavida et al. 2005).

La pared del grano de polen consta de dos capas diferentes: la exina y la intina.

La intina es la capa más interna y se localiza adyacente a la membrana plasmática del polen. Posee una composición relativamente simple, basada en microfibrillas de celulosa embebidas en una matriz de pectinas y hemicelulosa, secretadas por la microspora (origen gametofítico) en el estadio de microspora vacuolada (Owen and Makaroff 1995) y en su parte exterior tiene una gran cantidad de polisacáridos de diferente naturaleza (Sitte 1989).

Por otro lado, la exina, es la capa externa que se encuentra en toda la superficie del grano de polen, excepto en las zonas de las aperturas del tubo polínico. Estructuralmente, la exina es la pared celular más compleja en plantas y su gran diversidad morfológica es la base de la palinología con sus numerosas ramas y aplicaciones (Blackmore et al. 2007).

La exina se compone de dos capas: la más interna, nexina (terminología dada por Erdtman, 1993) o endexina (terminología dada por (Punt et al. 2007) y la más externa, la sexina (terminología dada por Erdtman, 1993) o ectexina (terminología dada por (Punt et al. 2007) que posee múltiples poros y pliegues. La sexina o ectexina es una capa ornamental que sirve como herramienta de diagnóstico para taxonomistas y paleobotánicos (Shukla AK 1998) y puede tener subcapas separadas: una externa o tectum y un segmento central formado por columnas (Fig. 1.10).

Figura 1.10. Esquema de la estructura de la pared del grano de polen (Punt, 2007).

La exina está compuesta fundamentalmente por esporopolenina, sustancia muy extendida en algas, hongos, musgos y helechos (Vizcay-Barrena and Wilson 2006) originada por polimerización oxidativa de ésteres carotenos y carotenoides (Brooks 1971). Se caracteriza por ser extremadamente resistente y servir como barrera protectora contra el exceso de deshidratación y ataque bacteriano y fúngico, mientras que el gameto masculino es liberado desde el gametofito, previo a la fertilización (Bedinger 1992).

El desarrollo de la exina se inicia con la deposición la primexina en la superficie de la microspora. La primexina es un material microfibrilar compuesto de una gran cantidad de polisacáridos, que actúa como molde que guía la acumulación posterior de esporopolenina, en la pared del polen (Rowley JR 1977, Scott et al. 2004)

La posición de las aperturas polínicas se establece durante la citocinesis microsporocítica (Heslopha.J 1968b, Heslopha.J 1968a).

La esporopolenina es polimerizada a partir de precursores sintetizados y secretados por el tapetum e incorporados a la pared del polen después de la disolución de la tetrada (Scott et al. 1991) donde polimeriza en puntos específicos de la primexina que sirve de punto de anclaje para la deposición de la esporopolenina para formar el principal componente de la pared (Heslopha.J 1968b, Heslopha.J 1968a).

Antes de la anthesis del polen se produce la deposición de pollenkit o trifina en la superficie de la exina (Blackmore et al. 2007), formando la cubierta del polen. Ambas sustancias tienen un origen lipídico, fundamentalmente (Owen and Makaroff 1995).

La trifina, formada por varios componentes, es producto de la degeneración temprana del tapetum, mientras que el pollenkit, de composición más homogénea, es resultado de la degeneración tardía de las células del tapetum (Pacini 1997). La cubierta del polen tiene muchas funciones, como por ejemplo, dar resistencia a la pared celular a la desecación, mantener los granos de polen unidos, ayudar a la adhesión del polen a la superficie del estigma durante la polinización y mantener las proteínas esporofíticas dentro de las cavidades de la exina (Ma 2005).

1.1.2.2 Expresión génica durante el desarrollo del polen

La actividad transcripcional durante el desarrollo del polen se estudió por primera vez entre 1970 y 1980 (Mascarenhas 1975, Mascarenhas 1990), cuando se demostró que la microspora es una célula altamente activa en la síntesis de RNA, mientras que después de la mitosis, los niveles de transcripción de las dos células del polen difieren significativamente entre sí, ya que la célula vegetativa es mucho más activa transcripcionalmente que la célula generativa (Mascarenhas 1975, Tupy et al. 1983, McCormick 1993, Bednarska 1984).

Durante el desarrollo del polen se produce una disminución gradual en los niveles de transcripción de ambas células del polen. Justo antes de la antesis, la síntesis de RNA en ambas células es casi indetectable (Mascarenhas 1975, Tupy et al. 1983, Bednarska 1984, Zienkiewicz et al. 2008), patrón común en las tres principales clases de RNA: RNA ribosómico, RNA transferente y RNA mensajero (Mascarenhas 1990).

En los últimos años se han desarrollado nuevas tecnologías capaces de analizar la expresión génica del gameto masculino a gran escala (Borg, Brownfield and Twell 2009). Estudios pioneros de tecnología “Serial Analysis of Gene Expression” (SAGE) (Lee and Lee 2003) y “Affymetrix Ag microarrays” (Becker et al. 2003, Honys and Twell 2003) han permitido el análisis del gameto masculino de especies modelo, basados en el genoma de *Arabidopsis*.

El desarrollo gametofítico del polen se puede dividir en dos grandes etapas principales, con diferentes perfiles transcriptómicos: una etapa temprana, desde la liberación de la microspora de la tetrada hasta la primera mitosis del polen y una etapa tardía, desde la formación del polen bicelular hasta el polen maduro o tricelular. En la primera etapa mencionada se expresan un mayor número de genes (cerca de 12000 genes activos). Este número decae de forma progresiva con la maduración del polen (7000 genes) (Honys and Twell 2004). Aunque hay un solapamiento de la mayoría de los genes expresados en las dos etapas, el porcentaje de genes específicos incrementa desde microsporas unicelulares al polen maduro. (Honys and Twell 2004).

La reducción en complejidad y el cambio a un programa de desarrollo tardío, está acompañado de un incremento en la expresión de genes implicados en procesos como el metabolismo de la pared celular, funciones del citoesqueleto y señalización celular, los cuales son muy importantes para la maduración del polen, la germinación y el crecimiento del tubo polínico (Becker et al. 2003, Honys and Twell 2004, Pina et al. 2005, Twell D 2006). Estos datos sugieren que las características transcripcionales implican función y especialización del polen (Wei et al. 2010).

El gran número de genes expresados y el cambio entre la fase temprana y la fase tardía del desarrollo del gameto masculino, exige una regulación coordinada de muchos genes a nivel transcripcional (Borg et al. 2009).

La comprensión e interpretación de los datos transcriptómicos de diferentes especies vegetales junto con todas las aproximaciones genéticas, tiene un importante impacto en el conocimiento del desarrollo del gameto masculino (Honys et al. 2006, Twell D 2006, Singh and Bhalla 2007). El valor particular de los estudios de transcriptómica reside en incrementar el conocimiento base de la complejidad y la dinámica de la expresión génica durante el desarrollo gametofítico y las células germinales (Honys and Twell 2004).

1.1.2.3 Desarrollo del tapetum.

El tapetum es la capa más interna de la pared de la antera, que reviste el saco polínico rodeando el tejido esporógeno. Las células del tapetum juegan un papel muy importante en la nutrición de las células madres de polen, así como en la formación de la exina mediante el depósito de precursores solubles que polimerizan sobre la superficie de las microsporas (Risueño et al. 1969, Heslop-Harrison 1971) y la deposición de trifina y pollenkitt antes de la dehiscencia de la antera (Shivanna 1985). Generalmente las células del tapetum secretor sufren cambios en la actividad relacionado con su función durante la microsporogénesis. Este dinamismo implica características estructurales específicas y termina con la degeneración del tapetum antes de la antesis. En general, antes de la primera división mitótica de la microspora

las células del tapetum empiezan a degenerar y mueren siguiendo un programa de muerte celular programada (Bedinger et al. 1994).

La diferenciación del tapetum se manifiesta por una masiva acumulación polar de mitocondrias, retículo endoplásmico y aparato de Golgi en la porción citoplásmica más próxima al lóculo de la antera. Las células del tapetum se hacen binucleadas hacia la paquitena de la profase meiótica de las células madre del polen, con un contenido en DNA diploide en cada núcleo (Testillano et al. 1993).

Las células del tapetum secretor mantienen su individualidad incluso después de que su citoplasma degenere y forman el pollenkit, que es depositado en el polen antes de la dehiscencia de la antera (Pacini and Hesse 2005).

Estudios ultraestructurales demostraron que cuando las células del tapetum se diferencian en secretoras, se conectan entre sí mediante la formación de largos canales citoplásmicos (Bedinger et al. 1994). Probablemente con la función de sincronizar la diferenciación del tapetum y su función durante el desarrollo del polen.

La degeneración del tapetum ocurre al mismo tiempo que el grano de polen continúa su maduración. Podría ser que los granos de polen completen su desarrollo con los nutrientes que han almacenado o por la llegada de otros nutrientes desde la planta y a partir de la hidrólisis de almidón de la pared de la antera (Pacini 2010).

1.1.3 Interés del grano de polen como sistema biológico.

Los primeros estudios sobre el polen datan de 1694, cuando Camerarius relacionó el polen con la formación de la semilla, pero hasta finales del siglo XIX y principios del siglo XX no aparecieron las primeras citas bibliográficas en las que se le relaciona el grano de polen directamente con la fertilización (Maheshwari and Johri 1950). Posteriormente han surgido gran número de estudios fisiológicos, genéticos y morfológicos sobre el tema (Maheshwari and Johri 1950, Maheshwari 1963, Raghavan 1976, Raghavan 1986, Johri 1984, Willemse 1984).

No obstante, además del papel del polen en la reproducción sexual vegetal, también constituye un microcosmos de procesos de desarrollo que lo convierte en un sistema

muy atractivo en el que se pueden estudiar procesos fundamentales de crecimiento celular y división, diferenciación celular y comunicación intracelular (Bedinger 1992, Honys and Twell 2003, Twell 1994, Twell et al. 2002). La progresión a partir de microsporas hasta polen maduro completamente diferenciado se caracteriza por la represión de genes tempranos y la activación de genes tardíos en el polen maduro. Las técnicas de biología celular para la localización *in situ* de moléculas y procesos son muy adecuadas para estudiar el desarrollo del grano de polen, ya que permiten caracterizar su localización subcelular, su momento de expresión, y sus cambios en relación con la actividad celular (Coronado 2002).

El patrón de desarrollo del polen ha sido caracterizado en numerosas especies, no obstante, no se conoce mucho sobre los mecanismos moleculares que subyacen (Honys et al. 2006, Toeller et al. 2008, Yang et al. 1999, Quan et al. 2008, Coimbra et al. 2009). Una mejor comprensión de la estructura y función del grano de polen facilitaría el desarrollo de técnicas destinadas a mejora vegetal (Wilms 1988).

En los últimos años, el interés por el estudio del grano de polen ha experimentado un incremento. La investigación de los aspectos funcionales del polen está adquiriendo gran relevancia, especialmente la correlación entre los estudios de microscopía electrónica, citoquímica, fisiología y bioquímica.

Ha habido un gran auge de los estudios de embriogénesis del polen (Heberleborgs 1982, Reynolds 1997, Zarsky et al. 1992, Dunwell 1985, Raghavan 1986) basados en la capacidad del grano de polen de desviarse de su ruta de desarrollo gametofítico normal, hacia una nueva vía de desarrollo en la que tras sufrir una serie de divisiones simétricas, da lugar a la formación de un embrión. Este embrión desarrollará una nueva planta haploide, que puede ser diploidizada con un tratamiento con colchicina y constituir un individuo homocigoto en el que se pueden expresar determinados genes seleccionados o introducidos artificialmente en el polen. De esta manera, se puede emplear el grano de polen como herramienta para generar nuevas líneas isogénicas y variedades para mejora vegetal, mediante la selección de genotipos que aporten calidad a los cultivos de plantas, como por ejemplo, para identificar

genotipos que aumenten la tolerancia a toxinas, temperaturas adversas y condiciones de estrés (Coronado MJ, 2002).

Asimismo, en los últimos años han surgido un gran número de publicaciones sobre la arquitectura de la pared del polen (Faegry 1964, Wodhouse 1965, Erdtman 1966, Erdtman 1969, Ferguson 1976, Crompton 1981). El incremento en las últimas décadas de la identificación de algunas familias y géneros de plantas implicadas en alergias causadas por el polen (Stanley 1974) ha encontrado en la exina del grano de polen una óptima guía fósil, ya que la gran estabilidad química de la sustancia que la compone, la esporopolenina, permite que quede fosilizada manteniéndose durante mucho tiempo. Estos restos fósiles del polen además, pueden ofrecer valiosa información para reconstruir el clima y la vegetación del pasado más remoto, lo que se conoce como palinología fósil. En base a este concepto, también cabe destacar la palinología forense, que surge, precisamente ante la posibilidad de reconstruir contextos ambientales reproducibles utilizables en un marco legal (Brettell, Butler and Almirall 2009)).

1.2 EL PROCESO DE EMBRIOGÉNESIS

1.2.1 La embriogénesis cigótica.

La embriogénesis es el proceso por el cual, el cigoto unicelular se desarrolla dando lugar a un organismo capaz de desarrollar un tallo, raíz y hojas. Durante la embriogénesis cigótica deben completarse los siguientes aspectos: establecer meristemas y el patrón morfológico de la planta, diferenciar los tipos primarios del tejido vegetal, generar órganos especializados de almacenaje de sustancias de reserva esenciales para la germinación de la semilla y posibilitar la permanencia en estado de latencia de la nueva planta hasta que las condiciones sean favorables para el desarrollo post-embriogénico (Goldberg, Depaiva and Yadegari 1994).

En dicotiledóneas la embriogénesis comienza con una división asimétrica del cigoto unicelular, dando lugar a una gran célula basal y una célula apical de menor tamaño (Fig. 1.11). Esta asimetría ya avanza lo que más adelante será el eje basal-apical del embrión (Schulz and Jensen 1968, Pritchard 1964, Jurgens 1995). La célula basal comienza a dividirse para formar el suspensor, órgano muy diferenciado y especializado que permite el anclaje, posicionamiento y aporte de nutrientes necesarios para el correcto desarrollo posterior del embrión (Goldberg et al. 1994). Por otro lado, la célula apical dará lugar al embrión propiamente dicho (Fig. 1.11). Tras un número definido de divisiones, se forma el embrión globular, en el cual se aprecia la primera diferenciación celular, con la formación del protodermo o capa externa del embrión (Harada J, 1993). Tras la sucesión de una serie de eventos de diferenciación dentro del embrión, se forma una capa interna de tejido (Goldberg et al. 1994).

A partir de aquí se produce un cambio drástico en la morfología del embrión globular con la aparición de los cotiledones a partir de dos dominios en el extremo apical, al mismo tiempo que la región del hipocótilo del eje comienza a elongarse y el meristemo radicular se empieza a diferenciar. En este momento el embrión adquiere forma de corazón, con una simetría bilateral (Fig. 1.11).

A continuación, los cotiledones y el eje aumentan su tamaño como resultado de divisiones celulares y el eje se alarga más hasta formar el embrión torpedo (Fig. 1.11).

Finalmente, la embriogénesis termina con la formación del embrión maduro, en el cual la masa de células internas se comienzan a especializar y acumulan gran cantidad de proteínas y reservas lipídicas que emplearán como fuente de alimento después de la geminación (Mansfield, Briarty and Erni 1991). En este momento también se produce la formación del extremo del tallo (Barton and Poethig 1993).

Figura 1.11. Visión general del proceso de embriogénesis en plantas. Representación esquemática de las principales fases del desarrollo. (Esquema modificado a partir de Goldberg, 1994). Abreviaturas: T: Célula Terminal; B: Célula Basal; EV: Embrión Verdadero;

S: Suspensor; Pd: Protoderma; Hs: Hipófisis; MB: Meristemo Basal; Pc: Procambium; C: Cotiledón; E: eje.

Al final del proceso de maduración, el embrión alcanza su máximo tamaño; las capas celulares que lo rodean se deshidratan, las actividades metabólicas se detienen y se produce un periodo de latencia (Goldberg, Barker and Perezgrau 1989, West and Harada 1993, Mansfield et al. 1991).

Los cambios morfológicos y etapas de la embriogénesis son bien conocidas, sin embargo el estudio de los procesos moleculares y celulares que subyacen y controlan el proceso es más limitado, en parte debido a la dificultad que supone el hecho de que todo este proceso se desarrolle dentro del gametofito femenino, rodeado de distintas capas de tejido esporofítico del óvulo, necesario para la protección y nutrición del embrión en desarrollo. Por este motivo, se han desarrollado diversos sistemas experimentales que facilitan su estudio:

- **Cultivos de embriones cigóticos**, a partir de la disección del óvulo y la extracción del embrión para su puesta en cultivo *in vitro*. Este sistema no permite el estudio de las primeras etapas de la embriogénesis, que se desarrollan *in vivo*.
- **Fusión *in vitro* de gametos aislados**. Este sistema requiere mucho tiempo y una gran experiencia para su puesta a punto (Kranz and Lorz 1993). Además no es aplicable a gran escala, condición importante para estudios moleculares bioquímicos y celulares.
- **Embriogénesis somática** directamente a partir de células de embriones cigóticos inmaduros cultivadas *in vitro*, en medios de cultivo especiales suplementados con hormonas. La mayoría de las especies forman callos, en las que las células hermanas siguen dividiéndose, pero sin dejar de estar unidas. Algunas de ellas pueden ser estimuladas hacia la producción de embriones, comparables a los cigotos en sus primeros estadios, pero que continúan con el desarrollo post-embriionario, sin pasar por la etapa de latencia que caracterizara a la embriogénesis cigótica *in vivo* (Steward, Mapes and Mears 1958).
- **Embriogénesis haploide**: a partir del cultivo *in vitro* de gametofitos inmaduros. A la embriogénesis a partir del gametofito femenino se la conoce como

ginogénesis, mientras que a partir del gametofito masculino, se conoce como embriogénesis del polen (Forster and Thomas 2005).

1.2.2 La embriogénesis del polen.

La inducción del polen a embriogénesis fue descubierta por Guha y Maheshwari en 1964 (Guha and Maheshwari 1964) en cultivos de anteras de *Datura innoxia*. El proceso consiste en desviar a la microspora de su ruta normal de desarrollo gametofítico que termina con la formación del grano de polen, hacia una nueva ruta de embriogénesis para dar lugar a embriones haploides y en último caso, plantas haploides (Fig. 1.2).

Figura 1.12. Esquema de la reprogramación del polen a embriogénesis.

El gran interés en haploides surgió a partir de la organización del “Primer Simposio de Haploides en plantas superiores” en 1974 en Canadá (Kasha 1974). Desde entonces se han llevado a cabo numerosas investigaciones con el objetivo de establecer técnicas eficientes para la producción de haploides y doble haploides en un gran número de especies, que incrementa cada vez más. Las recientes innovaciones científicas y tecnológicas, han proporcionado un mayor entendimiento de los mecanismos de control que subyacen que ha hecho resurgir el interés de los haploides en plantas superiores (Forster et al. 2007).

La producción de haploides mediante embriogénesis gamética con propósitos de mejora vegetal, ha sido objeto de estudios para muchos grupos de investigación desde su descubrimiento (SB 2005, Dunwell 2010a), (Germana et al. 2006, Germana 2011b, Jain SM 1996–1997, (ed) 1974, Magoon ML 1963, Maluszynski M 2003a, Maluszynski M 2003b, Palmer CE 2005, Segui-Simarro and Nuez 2008),(Segui-Simarro 2010), (Smykal 2000, Zhang YX 1990b),(Touraev A 2009, Zhang YX 1990a) (Xu et al. 2007).

En 2003, se documentó la inducción exitosa de la embriogénesis del polen a través del cultivo *in vitro* de anteras o microsporas aisladas, en más de 250 especies vegetales (Maluzynski et al., 2003b), incluyendo varias especies de interés agronómico, desde herbáceas como maíz, cebada, arroz, tabaco colza y trigo (Maluzynski et al., 2003a), o árboles como mandarino, naranjo amargo o alcornoque, entre otros (Germana et al. 2006, Srivastava and Chaturvedi 2008).

No obstante, entre todas estas especies potencialmente inducibles a embriogénesis de microsporas, no todos los cultivos responden de manera eficiente a la inducción de embriogénesis. Solo en algunos de ellos el potencial de reprogramación a embriogénesis es suficientemente alto para obtener un número de embriones adecuado para emplearse de forma rutinaria en la producción de DH en programas de mejora vegetal, como es el caso de la colza, el tabaco y la cebada, que se consideran sistemas modelo en los cuales esta tecnología se ha convertido en una herramienta de investigación estándar (Germana 2011b). Sin embargo, otras especies de interés científico o económico como *Arabidopsis* o tomate todavía se muestran extremadamente recalcitrantes a la inducción de embriogénesis haploide.

Entre especies modelo y extremadamente recalcitrantes, hay otras especies que todavía están lejos de tener una respuesta de inducción aceptable. Este es el caso de especies leñosas, donde la inducción de embriogénesis de microsporas sería especialmente ventajosa para programas de mejora vegetal, pero los avances obtenidos con éxito son todavía muy limitados (Srivastava and Chaturvedi 2008).

Existe un gran interés en la identificación de los factores genéticos moleculares que definen y controlan el proceso; las investigaciones recientes se centran en el estudio de estas especies consideradas como recalcitrantes para el cultivo de microsporas (Raghavan 1990, Bajaj 1990, Wenzel et al. 1995, Germana et al. 2006, Ferrie 2007, Ferrie 2009, Germana 2009, Dunwell 2010b).

1.2.2.1 Utilidad de los dobles haploides.

Los haploides son interesantes para investigación en general, pero su principal utilidad es la producción de líneas doble haploides (DH) mediante duplicación cromosómica, ya que son herramientas de gran utilidad para la investigación básica y aplicada, incluyendo programas de mejora vegetal (Chupeau 1998, Touraev, Pfosser and Heberle-Bors 2001, Forster et al. 2007, Dunwell 2010b).

En comparación con métodos de mejora convencional, la embriogénesis gamética supone la producción de líneas homocigotas viables en menor tiempo, ya que permite en un único paso el desarrollo de líneas homocigotas completas, a partir de parentales heterocigotos, con las que abordar otras estrategias como la selección *in vitro* de caracteres de interés (tolerancia a situaciones de estrés, patógenos....) o la creación de nuevas variedades (Clement 2001, Germana 2011a).

Los DH son también una herramienta muy poderosa en transgénesis para evitar hemocigotos y ahorrar tiempo y recursos en la producción de plantas transformadas con el transgen de interés en los dos cromosomas homólogos. Es más, desde un punto de vista científico básico, estas líneas son muy útiles para estudios básicos de “linkage” y estimación de fracciones de recombinación, ya que aunque estos estudios pueden realizarse también de forma convencional (retrocruzamientos o F₂), las líneas DH aportan la ventaja de ser auto-perpetuables.

Por otro lado, los DH también son una herramienta extremadamente útil para la selección genética y “screening” de mutantes recesivos, ya que el fenotipo de las plantas resultantes no está afectado por los efectos de dominancia y los caracteres determinados por genes recesivos pueden ser fácilmente identificados.

Otra ventaja de los DH es su habilidad de servir como sistema modelo para estudios de desarrollo *in vitro* de embriones sin la interferencia de tejido materno, debido a la gran similitud que presentan los embriones derivados de microsporas con la embriogénesis cigótica (Segui-Simarro and Nuez 2008, Supena et al. 2008).

La embriogénesis del polen se considera como uno de los ejemplos más llamativos de totipotencia celular (Reynolds 1997). Sin embargo, la eficiencia en la inducción de embriones a partir del polen continúa sin ser óptima, (Chupeau 1998). Conocer en

mayor profundidad los factores que influyen en el cambio de programa de desarrollo del polen, puede facilitar la determinación de indicadores que nos permitan delimitar más exactamente lo que acontece en la microspora/grano de polen. Un mayor conocimiento de estos procesos puede permitir conseguir condiciones que aumenten el porcentaje de gametos que comienzan su desarrollo esporofítico, lo cual perfeccionaría este sistema *in vitro* como herramienta de gran utilidad para sus diversas aplicaciones (Seguí-Simarro 2001).

La investigación de DH se ha visto ralentizada debido a problemas tecnológicos, sin embargo, recientes avances en este campo, han resuelto los pasos principales en el estudio de embriogénesis. De esta manera, se espera identificar algunos genes implicados en la reprogramación de microsporas y embriogénesis con objeto de obtener un mejor entendimiento de estos procesos y desarrollar protocolos más eficientes para la producción de plantas haploides y doble haploides.

En conclusión, la embriogénesis gamética y la tecnología haploide es una gran promesa para la contribución de la mejora vegetal, dirigida al incremento de la productividad en granjas y la calidad de productos alimentarios, sobre todo en países en desarrollo, pudiendo contribuir a reducir la proporción de gente que sufre de hambre y de enfermedades debido a la malnutrición en todo el mundo. Por lo tanto, es una inversión muy conveniente para la investigación agrícola enfocada a la efectiva utilización de la embriogénesis gamética y tecnología haploide en la mejora de todas las especies (Germana, 2011).

1.2.2.2 Metodología para la embriogénesis del polen.

La embriogénesis gamética se puede reproducir de forma experimental *in vitro* (Chupeau et al. 1998) mediante el empleo de diversos tratamientos de estrés (hormonas, vitaminas, sacarosa, ayuno, frío o choque térmico), que varían según la especie. Esta técnica se puede llevar a cabo a partir del cultivo de anteras o de microsporas aisladas, siendo este último método el que presenta mayores ventajas

con respecto al anterior, ya que la presencia de las paredes de la antera en el cultivo de anteras inmaduras completas, hace más difícil conocer con exactitud los factores que influyen directamente en la inducción y posterior desarrollo embriogénico del polen. Sin embargo en el cultivo de microsporas, los gametos masculinos inmaduros son aislados antes del cultivo, eliminando todo el tejido somático de la antera a partir de diferentes métodos.

El cultivo de anteras es un método muy empleado para la producción de dobles haploides en muchas especies por su simplicidad (Germana 2011a). El éxito obtenido en estos casos hace evidente los beneficios que ofrece. No obstante, aunque es una técnica muy extendida, los procesos implicados no se conocen bien y la presencia de tejidos extrínsecos, como la pared de la antera, lo convierte en un sistema desordenado para biología celular y otros estudios meticulosos (Forster et al. 2007).

Por otro lado, el cultivo de microsporas aisladas proporciona un mejor estudio de los procesos celulares, fisiológicos y bioquímicos implicados en la embriogénesis del polen (Nitsch 1977; Reinert and Bajaj 1977), ya que las microsporas aisladas pueden ser manipuladas mediante el empleo de técnicas de biología celular, microbiología y genética

La ausencia de todo el tejido esporofítico de la pared de la antera, permite que los distintos componentes del medio y tratamientos de cultivo tengan un acceso directo a las microsporas. Además, esta alternativa evita la regeneración de embriones diploides y plantas a partir de tejido somático (Germana, Micheli and Standardi 2005, Ferrie and Caswell 2011, Germana 2011a), ya que la presencia de tejido somático de la antera susceptible de ser también reprogramado, implica que en el cultivo de anteras sea necesario contemplar también la presencia de embriones diploides, procedentes del tejido somático, que pueden no ser portadores de los caracteres deseados (Seguí-Simarro 2001).

No obstante, el rango de especies en las que se puede emplear el cultivo de microsporas aisladas es más limitado que el del cultivo de anteras. Sin embargo en aquellas especies en las que las condiciones adecuadas están bien establecidas, es el

método de elección debido a que su gran eficiencia permite la obtención de un mayor número de microsporas inducidas que los cultivos de anteras. Esta ventaja hace que los cultivos de microsporas sean un sistema experimental adecuado para el estudio de embriogénesis, ya que se pueden obtener un gran número de embriones en todas las fases del desarrollo (Forster et al. 2007).

En laboratorios de todo el mundo, los cultivos de microsporas aisladas están bien establecidos y se utilizan de forma rutinaria para el desarrollo de nuevas variedades, así como para la investigación básica en áreas como genómica, expresión génica y mapeo genético (Ferrie and Caswell 2011).

El cultivo de microsporas ha proporcionado una valiosa información sobre los mecanismos que subyacen tras el proceso de embriogénesis de microsporas. Por ejemplo, estudios de cultivos de microsporas dirigidos a la identificación del estrés que hace que la microspora se desvíe de la ruta gametofítica para seguir la ruta embriogénica (Shariatpanahi et al. 2006). Se han aislado y caracterizado varios genes implicados en la reprogramación de microsporas desde la fase gametofítica a la esporofítica, dando lugar a la embriogénesis de microsporas como un sistema para el estudio del cambio de la fase de reprogramación celular y totipotencia en plantas superiores (Hosp et al. 2007b, Hosp et al. 2007a, Tsuwamoto, Fukuoka and Takahata 2007). Cambios en la cromatina y otros aspectos de la reorganización del genoma, en procesos de autofagia y/o apoptosis implicados en la degradación de estructuras gametofíticas (Hosp et al. 2007b, Hosp et al. 2007a) similitudes genéticas de la reprogramación de otros organismos, incluyendo animales (“genes stem”) son nuevas perspectivas para investigaciones futuras.

1.2.2.3 Factores que afectan a la inducción.

Existen múltiples factores tanto endógenos como exógenos que pueden afectar a la inducción de embriogénesis del polen. Los más importantes son el genotipo, la fase de desarrollo del polen seleccionada y el tratamiento estrés inductor de embriogénesis.

Entre los factores endógenos, la mayoría de los investigadores que trabajan en la embriogénesis del polen, reconocen que el genotipo es uno de los factores claves controlando la respuesta de las microsporas a embriogénesis. Se ha observado que todas las especies estudiadas hasta el momento, muestran una diferente respuesta entre distintos cultivares. Incluso, en especies modelo el genotipo tiene una importante influencia, produciendo cultivares con alta o nula respuesta dentro de las mismas especies (Ferrie et al. 2005, Touraev et al. 2001, Malik et al. 2008).

La formación de microsporas competentes que cambian su ruta de desarrollo hacia la ruta embriogénica, está controlado por la interacción entre genes nucleares y citoplasma, a su vez influido por el ambiente (Heberlebers 1985).

Estudios llevados a cabo en *Solanum tuberosum* mostraron que la habilidad de reprogramación de la microspora a embriogénesis es un carácter hereditario recesivo, controlado por más de un gen (Chupeau 1998, Rudolf, Bohanec and Hansen 1999, Smykal 2000).

Otro de los factores implicados en la inducción a embriogénesis es la fase del desarrollo del polen seleccionada. Para la mayoría de las especies, la microspora vacuolada o polen bicelular joven son las fases más sensibles para la inducción embriogénica, es decir alrededor de la primera mitosis del polen (Raghavan 1986, Touraev et al. 2001, Maraschin et al. 2005). De hecho, parece existir una asociación entre la habilidad de reprogramar su ruta de desarrollo y la polaridad de la división del polen (Reynolds 1997) Twell & Howden, 1998). Pero en especies no modelo, donde la inducción es más difícil de conseguir, se han descrito franjas de desarrollo más estrechas para la inducción.

Además del genotipo y la fase desarrollo del polen más sensible a la inducción, el tercer factor crítico son las condiciones de cultivo y en particular, el tratamiento físico o químico necesario para inducir la embriogénesis del polen.

Una vez seleccionada la microspora en la fase de desarrollo adecuada, se debe aplicar un tratamiento de estrés, que será el inductor de la reprogramación a embriogénesis.

Los tratamientos de estrés más empleados son el calor y el ayuno, pero hay especies que pueden tener requerimientos especiales.

Una vez que se ha sometido al estrés inductor, algunas microsporas mueren inmediatamente, otras parecen iniciar programas de muerte celular programada o siguen una ruta similar a la ruta de desarrollo gametofítico hasta alcanzar la fase de polen maduro (Hosp et al. 2007a) y un pequeño porcentaje, son efectivamente inducidas por el tratamiento inductor y sufren toda una serie de cambios a diferentes niveles, desde la arquitectura celular hasta la expresión génica.

Los cambios a gran escala inducen reposición nuclear y modificaciones de los elementos del citoesqueleto y rotura de la gran vacuola central. Los cambios a nivel de expresión se pueden agrupar en 3 categorías (Pauls et al. 2006): respuesta celular al estrés, supresión del programa de desarrollo gametofítico y expresión del programa de embriogénesis. Un importante número de genes, proteínas y metabolitos se han identificado como desencadenantes directos o indirectos de cada uno de los estadios (Maraschin et al. 2005, Maraschin et al. 2006, Pauls et al. 2006, Munoz-Amatriain et al. 2006, Malik et al. 2007, Hosp et al. 2007a, Hosp et al. 2007b, Joosen et al. 2007, Malik et al. 2008, Seguí-Simarro and Nuez 2008, Dunwell et al. 2010).

La respuesta celular al estrés requiere la internalización previa de la señal extracelular de estrés mediante rutas de transducción de señales. Aunque no se conoce mucho a este respecto, se han propuesto algunas señales extracelulares reguladas por proteínas homólogas de quinasas (Coronado et al. 2002, Testillano et al. 2005) como intermediarios de la transducción de la señal extracelular de estrés para la activación de programas de expresión génica (Seguí-Simarro and Nuez 2008).

Asimismo, en relación a la respuesta celular al estrés, se han descrito cambios en la síntesis de proteínas de choque térmico (HSP) en varias especies después de tratamiento de estrés como la exposición de calor, colchicina o ayuno durante la embriogénesis de microsporas (Cordewener et al. 1995, Zarsky et al. 1995, Smykal 2000, Seguí-Simarro, Testillano and Risueño 2003). De hecho, se piensa que las HSPs

tienen un papel citoprotector en relación a la tolerancia al estrés (Seguí-Simarro and Nuez 2008).

Por otro lado, para la inducción del programa de embriogénesis la célula debe cancelar previamente el programa de desarrollo gametofítico. El bloqueo de la síntesis y la eliminación de las reservas de almidón (marcador de la maduración del polen) son factores clave en este proceso. De hecho, se ha observado la regulación a la baja de genes implicados en la biosíntesis y acumulación de almidón (Maraschin et al. 2006). En paralelo, una especie de programa de dediferenciación parece operar para limpiar el citoplasma de moléculas relacionadas con la microgametogénesis (Maraschin et al. 2005, Seguí-Simarro and Nuez 2008).

En este trabajo se aborda el estudio de algunos mecanismos moleculares y celulares que tienen relación de forma directa o indirecta con los primeros momentos de la inducción a embriogénesis mediante choque térmico.

1.3 LA PARED CELULAR

La pared celular vegetal es la capa externa que rodea la membrana plasmática de células vegetales. Se trata de un compartimento muy dinámico, con una estructura compleja que influye en la determinación del tamaño y la forma de la célula, así como en su crecimiento y desarrollo, en la comunicación intercelular y en la interacción de la célula con el entorno (Knox 2008).

1.3.1 Composición de la pared celular.

Generalmente, la estructura de la pared celular vegetal está formada por tres partes fundamentales.

- Pared primaria, capa más externa, que se forma inmediatamente después de la división celular. Está constituida por microfibrillas de celulosa embebidas en sustancias pépticas y proteicas.
- Pared secundaria, capa adyacente a la membrana plasmática. Se forma en algunas células una vez que se ha detenido el crecimiento celular y comienza la

especialización de cada tipo celular. Está compuesta básicamente por fibras de celulosa y hemicelulosa.

- Lamina media. Es una estructura formada principalmente de sustancias pépticas, que se encarga de unir las paredes primarias de dos células contiguas.

La pared celular primaria está compuesta fundamentalmente por polisacáridos, enzimas y proteínas estructurales, que cambian su composición y distribución durante el crecimiento y diferenciación celular (Barany et al. 2010a). Los polisacáridos de la pared celular, se clasifican en 3 grupos: celulosa, hemicelulosa y pectinas.

La celulosa es uno de los principales polisacáridos de la pared celular, que consiste en un polímero de (1,4)- β -D-glucosa dispuesto en microfibrillas. La rigidez estructural y la resistencia de la pared celular dependen de la integridad de la red formada por la celulosa y los glucanos entrelazados.

Figura 1.13. Estructura de la pared celular (Lodish et al., 2001).

El xiloglucano (XG) representa la mayor parte de la hemicelulosa llegando a formar hasta el 30% en peso seco de la pared celular primaria. La modificación de XG catalizada por enzimas específicas, es un proceso clave para la expansión celular durante el crecimiento celular (Barany et al. 2010a). El metabolismo del XG, aumenta durante el crecimiento de la célula vegetal, contribuyendo a la extensión de la pared celular.

Las pectinas son el principal componente de la pared celular primaria en especies dicotiledóneas, donde generalmente comprenden el 30-35% del peso seco de la pared celular (Pelloux, Rusterucci and Mellerowicz 2007, Smith and Harris 1999).

Figura 1.14. Representación esquemática de la pared celular (Somerville et al., 2004).

1.3.2 Pectinas.

El término pectina engloba una familia compleja y heterogénea de polisacáridos que tienen en común la presencia de ácido galacturónico (GalA) y rhamnosa (Rha) (Willats et al. 2001). Se diferencian 4 dominios de polisacáridos principales: homogalacturonano (HGA), rhamnogalacturonano I (RGI), rhamnogalacturonano II (RGII) y xilogalacturonano (XGA), que difieren en la estructura de la macromolécula y en la diversidad de sus cadenas laterales (Willats, Knox and Mikkelsen 2006, Pelloux et al. 2007, Caffall and Mohnen 2009).

Las pectinas se sintetizan a partir de nucleótidos azucarados por al menos 53 glicosiltransferasas diferentes, localizadas en el *cis*-Golgi y que después son secretadas en la pared celular (Willats et al. 2001, Willats et al. 2006). Su estructura puede ser alterada de forma significativa, por la actividad de enzimas específicas de pared celular, a lo largo del desarrollo (Willats and Knox 1999). Estos cambios tienen un papel crucial en varios procesos de desarrollo y crecimiento en la planta. En particular, HGA, el principal componente pectídico, compuesto por residuos de (1,4)- α -D-ácido galacturónico (GalA), es metilesterificado en el carboxilo de la posición 6, en el Golgi-*medio* por pectinmetiltransferasas, y depositado en la pared celular en una forma altamente metilesterificada (70-80%)(O'Neill 1990).

El grado de metilesterificación de HGA está controlado por la enzima pectinmetilesterasa (PME), que está regulada a su vez, por el pH de la pared celular, por inhibidores endógenos (PMEi) (Pelletier et al. 2010) e incluso, es posible que también por dominios intramoleculares "PMEi like" (Bosch, Cheung and Hepler 2005, Juge 2006, Rockel et al. 2008).

La proporción de pectinas esterificadas y no esterificadas y su distribución en la pared de las células vegetales está relacionada con distintos procesos (Goldberg, Morvan and Roland 1986, Dolan, Linstead and Roberts 1997, Hasegawa et al. 2000, Domozych et al. 2006). Parece que contribuyen a la adhesión celular y que juegan un papel importante en las propiedades mecánicas de las células vegetales (Ryden et al.

2003, Baluska et al. 2005), ya que su desesterificación da lugar a la formación de puentes de calcio que proporcionan rigidez a la pared celular.

Por otro lado, las pectinas también forman parte de capas concretas de la pared del grano de polen, especialmente, la primexina (Hess and Frosch 1994, Majewska-Sawka and Rodriguez-Garcia 2006), la intina (Heslopharrison 1979, Bedinger 1992, Geitmann et al. 1995, Li et al. 1995) y las zonas de apertura del polen, con acumulaciones masivas (Taylor and Hepler 1997) Barany et al. 2010b).

1.3.3 Pectinmetilesterasas

Las enzimas PME (PME, EC 3.1.1.11), que pertenece a la clase 8 de carbohidrato-esterasas, se encuentran unidas a la pared celular mediante interacciones (Coutinho et al. 2003).

En los últimos años, han aumentado los datos sobre las funciones de las PMEs en plantas, que incluyen datos genómicos que muestran que las PMEs pertenece a una gran familia de múltiples genes cuya estructura primaria y cuaternaria están muy conservadas en los taxones vegetales (Pelloux et al. 2007). La secuenciación del genoma de *Arabidopsis*, ha contribuido a la identificación de 67 genes relacionados con PME en esta especie.

Generalmente, las PMEs son sintetizadas como pre-pro-proteínas. La región pre o péptido señal es necesaria para dirigir la proteína al retículo endoplásmico. A continuación, la pro-PME es secretada al apoplasta a través de la región *cis* hasta la región *trans* del Golgi y solo la parte madura de PME (sin la región pro) se encuentra en la pared de la célula (Micheli 2001)(Fig. 1.15).

Figura 1.15. Hipótesis de la co-secreción de pectinas y PME al apoplasta (Micheli, 2001).

Aunque el papel de la región pro no se conoce, existen varias hipótesis: puede jugar un papel importante en la función biológica de PME, puede dirigir a la PME a la pared celular, puede que actúe como una chaperona intramolecular permitiendo la

conformación adecuada de PME o puede actuar como inhibidor de la actividad enzimática de PME, para prevenir la desesterificación prematura de pectinas antes de su inserción en la pared celular. La similitud observada entre la región pro y el inhibidor de PME identificado en kiwi, apoyan esta última hipótesis (Camardella et al. 2000).

La estructura tridimensional de la PME de raíz de zanahoria identificada mediante estudios de difracción de rayos X (Johansson et al. 2002) revela que la enzima tiene una estructura hélice β plegada hacia la derecha (Fig. 1.6). El sitio activo contiene dos residuos de ácido aspártico (D136, Q135) en el centro, dos glutaminas (Q113, Q135) y un residuo de arginina (R225) localizados en la superficie de la hélice β en la hendidura de unión a pectinas.

PME cataliza la desesterificación específica de HGA dentro de la pared celular vegetal, de manera que los grupos carboxilo quedan cargados negativamente a la vez que se produce la liberación de metanol y protones en el proceso (Moustakas et al. 1991) (Fig. 1.17).

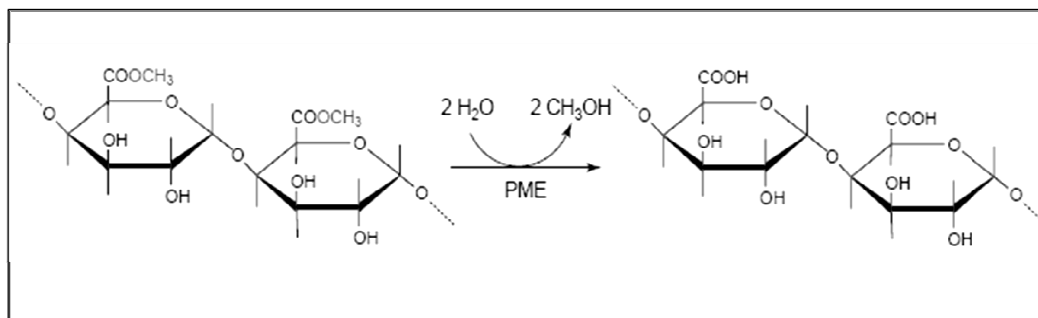


Figura 1.17. Desesterificación de pectinas por la acción de pectinmetilesterasas (PMEs)

Hasta hace algunos años, se asumía de forma general que las PME de plantas actuaban de forma lineal sobre los residuos de HGA de las pectinas, produciendo bloques de carboxilos libres cargados negativamente, que pueden interactuar con

iones de calcio (Goldberg et al. 1986) y aumentar la rigidez de la pared celular; mientras que las PME de hongos y bacterias tenían una actividad al azar, promoviendo la liberación de protones al medio que pueden estimular la actividad de hidrolasas de la pared celular como poligalacturonasas y pectoliasas, (Nari et al. 1986, Moustacas et al. 1991) que pueden actuar degradando pectinas y por lo tanto, aumentando la flexibilidad de la pared celular.

Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la actividad de PME también depende de pH y el grado inicial de metilesterificación de pectinas. De manera que algunas isoformas pueden actuar al azar bajo condiciones de pH ácido pero linealmente bajo condiciones de pH alcalino. Y a un pH dado, algunas isoformas son más efectivas que otras sobre pectinas altamente metilesterificadas (Catoire et al. 1998, Goldberg 2001).

Es decir, el patrón de acción de la PME madura en la pared celular está regulado por numerosos factores lo que revela la complejidad de estas enzimas (Micheli 2001).

En cualquier caso, el papel principal de PME reside en la remodelación de pectinas *in muro* (Pelloux et al. 2007). El balance entre las formas metilesterificadas y desesterificadas de HGA es esencial para los mecanismos de la pared y debe estar estrictamente regulado durante el crecimiento celular y desarrollo (Ridley, O'Neill and Mohnen 2001, Willats et al. 2001, Pelloux et al. 2007, Wolf, Mouille and Pelloux 2009)

En los últimos años, se ha demostrado que PME está implicada en una gran variedad de procesos fisiológicos y bioquímicos en plantas, incluyendo, extensión de la pared celular, adhesión celular, maduración de frutos y senescencia, microsporogénesis y crecimiento de tubo polínico, diferenciación celular, germinación de semillas, elongación del hipocótilo e incluso en el movimiento sistémico del virus del mosaico del tabaco (Tieman and Handa 1994, Wen, Zhu and Hawes 1999, Micheli et al. 2000, Chen and Citovsky 2003).

Recientes avances en bioquímica y biología molecular han revelado el gran número de isoformas de PME, que sostienen la complejidad de su participación en el desarrollo de plantas. La determinación de estas funciones será de gran ayuda para el conocimiento del número general de genes de PME en *Arabidopsis* y permitirán elegir estrategias moleculares adaptadas para cada gen de estudio (Micheli 2001).

Las PME han sido muy estudiadas en los procesos de fructificación, dado que su acción se relaciona con la dinámica de endurecimiento de los tejidos del fruto, tema de gran incidencia agronómica. Sin embargo, casi no hay datos sobre su expresión, localización y actividad en muchos procesos de desarrollo, como los analizados en esta Tesis.

En esta Tesis Doctoral, se pretende estudiar la importancia de los cambios detectados en varios componentes de la pared celular durante el desarrollo gametofítico de la célula, así como en las etapas principales de la ruta embriogénica.

1.4 MARCAS EPIGENÉTICAS Y DESARROLLO.

Durante mucho tiempo, el concepto de herencia genética se ha limitado a la secuencia del DNA. Sin embargo, en los últimos años se ha producido una importante revolución en el campo de la genética como consecuencia de toda una serie de observaciones experimentales que indican que la secuencia de DNA por sí misma no transporta toda la información necesaria para determinar el fenotipo del organismo.

Así surge el término epigenética, que hace referencia, en un sentido amplio, al estudio de todos aquellos factores no genéticos que intervienen en la determinación de la ontogenia, es decir, el estudio de cambios heredables en la expresión génica sin modificaciones en la secuencia de bases del DNA.

Las modificaciones epigenéticas mejor conocidas son la metilación del DNA, modificaciones postraduccionales de histonas, incluyendo metilación, acetilación, ubiquitinación y fosforilación (Jenuwein and Allis 2001) y las interrelaciones del RNA no codificante con el DNA (Fig. 1.18).

Se ha demostrado que el control epigenético de la expresión génica está mediado por cambios específicos en la estructura de la cromatina. Por ello, la cromatina es entendida hoy en día como una estructura dinámica e interactiva, que sufre continuos procesos de modificación y remodelación, como respuesta a procesos de señalización celular (Causevic et al. 2005).

Más allá de la secuencia primaria de DNA en el genoma, la organización cromatínica juega un papel fundamental en la determinación de los patrones de expresión génica: regiones de eucromatina, menos compactadas, son las más accesibles para la transcripción, mientras que las regiones de heterocromatina, altamente compactadas, dificultan la transcripción. De este modo, la misma secuencia de genes puede ser expresada correctamente o silenciada transcripcionalmente, según si se trata de una región de eucromatina o heterocromatínica.

Figura 1.18. Principales modificaciones epigenéticas (Matouk et al., 2008).

La epigenética se refiere por lo tanto, al control de la expresión génica basado en la organización cromatínica en vez de la información genética de la secuencia de DNA primaria (Bender 2004).

1.4.1 Metilación del DNA.

La metilación del DNA es una modificación epigenética en el genoma de plantas y animales, que constituye un mecanismo muy poderoso para la regulación de la expresión génica (Zemach and Grafi 2007), ya que reprime la transcripción al impedir la accesibilidad de la secuencia del DNA a los factores de transcripción que finalmente regulan la expresión génica.

Esta modificación epigenética puede ser reversible tanto durante el desarrollo como en respuesta a diferentes condiciones de estrés, en animales y plantas (Chinnusamy and Zhu 2009).

La incorporación química de un grupo metilo en la posición C5 del anillo pirimidínico del nucleótido citosina del DNA, supone la forma de metilación del DNA más frecuente y su papel en el desarrollo de procariotas y eucariotas ha sido objeto de numerosos estudios (Finnegan and Kovac 2000). Sin embargo, la adición de grupos metilo a bases nitrogenadas puede producirse también sobre residuos de nitrógeno no cíclicos de la adenina (N6) o citosina (N4) (Jeltsch 2002, Vanyushin 2006).

El DNA de las plantas está altamente metilado, pudiendo tener lugar esta modificación en cualquier residuo de citosina del genoma (Vanyunshin et al., 2011). No obstante, la distribución de citosinas metiladas no es al azar, sino que en plantas, la mayoría de los residuos metilados se producen dentro de regiones heterocromáticas transcripcionalmente inactivas, las cuales a menudo, están enriquecidas de secuencias repetitivas de DNA (Zemach and Grafi 2007, Furner and

Matzke 2011). Mientras que en animales, la metilación de citosinas es predominante en secuencias simétricas tipo CG, en plantas es frecuente encontrar citosinas metiladas tanto en regiones simétricas CG y CHG, como no simétricas CHH (donde H puede ser una citosina(C), una adenina (A) o una timina (T) (Gruenbaum et al. 1981, Meyer, Niedenhof and Tenlohuis 1994, Furner and Matzke 2011, Law and Jacobsen 2010). No obstante, se ha observado que la transmisión clonal de los patrones de metilación está restringida a citosinas de secuencias simétricas, de manera que la metilación de citosinas de secuencias no simétricas, probablemente no se transmite a través de los ciclos de replicación del DNA (Finnegan et al. 1998, Mirouze and Paszkowski 2011).

Hay que destacar que estos patrones no son estáticos en el genoma vegetal, sino que existen evidencias que indican que pueden cambiar de forma sustancial según el estado de desarrollo y las condiciones ambientales (Mirouze and Paszkowski 2011).

La metilación covalente de la citosina es heredada en una de las dos hebras de DNA hijas después de la replicación del DNA, proporcionando una memoria epigenética de la huella de metilación original en el dúplex parental del DNA (Bender 2004).

En la nueva hebra de DNA recién sintetizada, la huella de metilación puede ser re-establecida, empleando grupos metilo pre-existentes en la hebra complementaria como guía. De este modo, la metilación queda establecida y puede ser perpetuada indefinidamente, incluso, si el estímulo original para la metilación ya no está presente (Fig.1.19).

Figura 1.19. Modelo de la transmisión del patrón de metilación del DNA en la replicación

En la mayoría de los casos donde la huella de la metilación se ha perdido del genoma de plantas, generalmente no se debe a un corte directo de la citosinas metiladas, sino a un fallo en el mantenimiento de la huella de metilación previa, después de la replicación del DNA (Bender 2004). No obstante, en algunos procesos biológicos, como la impronta genética (fenómeno genético por el que ciertos genes son

expresados de un modo específico que depende del sexo del progenitor) (Gehring, Choi and Fischer 2004) la citosina metilada puede ser eliminada por una familia de DNA glicosilasas (Law and Jacobsen 2010) que incluye DME (demeter) (Choi Y et al., 2002), ROS1, represor del silenciamiento (Gong Z et al., 2002) y DML2 y DML3 (demeter-like 2 y 3) (Penterman et al. 2007).

La metilación del DNA es esencial para el correcto crecimiento y desarrollo de los organismos eucariotas. De tal modo que en animales, alteraciones en los patrones de metilación genómica generan daños letales (Li, Bestor and Jaenisch 1992), mientras que en plantas, aunque no alcanzan la letalidad, pueden producir disfunciones del desarrollo normal de los organismos (Kakutani, Jeddeloh and Richards 1995, Finnegan, Peacock and Dennis 1996, Finnegan et al. 1998, Finnegan, Peacock and Dennis 2000).

En plantas, la metilación del DNA ejerce un papel fundamental en el desarrollo y crecimiento del organismo (Vanyushin 2006, Valledor et al. 2007, Meijon et al. 2010). Se han descrito diversos procesos morfogénicos y de desarrollo en los que la metilación juega un papel fundamental (Grant-Downton and Dickinson 2005, Grant-Downton and Dickinson 2006, Valledor et al. 2007) ya sea como posible herramienta de adaptación rápida a las condiciones externas favorables o desfavorables, o bien, como mecanismo regulador del desarrollo normal de la planta.

Por un lado, la abundancia de metiltransferasas en plantas, la presencia de dos códigos distintos de metilación (sobre secuencias CG o CHG), la existencia de la familia de enzimas CMT, entre otras singularidades, pueden estar relacionadas con la naturaleza sésil de las plantas, que no les permite escapar de aquellas condiciones ambientales que les resultan desfavorables, aportándoles un mecanismo regulador adicional de gran plasticidad. Las plantas requieren de una adaptación muy eficiente de su programa genético a las condiciones microambientales de los hábitats en los que se desarrollan. Dado que estas adaptaciones deben ser reversibles, los mecanismos epigenéticos proveen a las plantas de formas de regulación rápidas y eficaces que pueden ser reformuladas para cada situación ambiental, figurando la

metilación del DNA entre estos mecanismos epigenéticos adaptativos (Hasbun et al. 2007).

Por otro lado, la metilación del DNA controla la diferenciación mediante la regulación de genes específicos de tejidos y mantiene la estabilidad celular (Fraga and Esteller 2007). Se ha visto que el control epigenético juega un papel esencial en el proceso de diferenciación celular permitiendo a las células ser reprogramadas para generar nuevas rutas de diferenciación (Morgan et al. 2005, Costa and Shaw 2007). La metilación del DNA, junto con las modificaciones de histonas, están implicadas en el control del estado funcional de la cromatina y la expresión génica (Kouzarides 2007, Pfluger and Wagner 2007, Exner and Hennig 2008). Ambos procesos pueden activar o reprimir la transcripción a partir de la generación de configuraciones de la cromatina abiertas o cerradas, respetivamente. Generalmente, configuraciones de la cromatina abiertas, incrementan la accesibilidad al genoma de la maquinaria de la transcripción (Reyes 2006, Kouzarides 2007, Pfluger and Wagner 2007).

Figura 1.20. Implicación de la metilación del DNA en la transcripción.

Las modificaciones en los perfiles de metilación son responsables de la activación o inactivación de genes específicos, mientras que procesos aberrantes de metilación se asocian a la pérdida de la impronta genética.

En base a esto, la metilación del DNA ejerce también una función de defensa al reprimir la transcripción de elementos móviles o invasivos al genoma, tales como transposones o DNA viral, proporcionando estabilidad genética, ya que estos elementos se caracterizan por presentar islas CHG a lo largo de su secuencia, que cuando se desmetilan, permiten que salten a través del genoma pudiendo interrumpir secuencias génicas, provocando el silenciamiento y viabilidad fenotípica (Kubis et al. 2003).

El conocimiento disponible sobre el control epigenético durante la diferenciación y la organogénesis es muy limitado (Goodrich and Tweedie 2002). Los niveles de metilación de citosinas globales, varían mucho según la especie, órganos y estados de desarrollo (Valledor et al. 2007).

En mamíferos, se han encontrado promotores de genes con regulación dependiente de la metilación del DNA, que tienen un papel importante en el desarrollo y la diferenciación. En plantas, sin embargo, hay muy poca información sobre los mecanismos dependientes de metilación del DNA implicados en el control de la diferenciación celular (Berdasco et al. 2008).

Se necesitan más investigaciones para determinar el papel funcional exacto de la regulación génica mediante la metilación de promotores de DNA durante procesos de diferenciación celular y en el establecimiento del mantenimiento del estado indiferenciado.

1.4.2 DNA metiltransferasas en plantas.

La metilación de las citosinas del DNA, se lleva a cabo por enzimas DNA metiltransferasas, encargadas de catalizar la transferencia de grupos metilo desde S-adenosilmetionina (SAM) hasta los residuos de citosina (Billen 1968, Lark 1968) en la nueva hebra de DNA replicada (Bird 1978), produciéndose metilcitosina y S-adenosilhomocisteína (SAH) (Fig. 1.21). Cambios en los patrones de metilación entre generaciones celulares deben ocurrir por la metilación *de novo* o por la reprogramación de patrones de metilación del DNA entre generaciones (Finnegan and Kovac 2000).

Figura 1.21. Mecanismo de acción de las metiltransferasas.

Las DNA metiltransferasas en bacterias y eucariotas contienen una serie de motivos proteicos que constituyen el sitio de unión para el DNA diana y un sitio activo de cisteína que cataliza el ataque nucleofílico en la posición 6 del anillo de la citosina para facilitar la transferencia del grupo metilo a la posición 5 (Bestor 2000). Además

de este dominio catalítico, las metiltransferasas eucariotas también transportan extensas secuencias amino terminal que dirigen a la enzima a las regiones genómicas adecuadas.

En plantas, se han caracterizado 3 familias de DNA metiltransferasas filogenéticamente relacionadas, pero estructural y funcionalmente diferentes: la metiltransferasas I (METI), cromometiltransferasas (CMT) y “Domain rearranged methylases” (DRM) (Finnegan and Kovac 2000).

El primer grupo, METI, engloba a metiltransferasas fundamentalmente de mantenimiento de metilación CG, es decir, que restablecen los patrones de metilación tras la replicación, empleando como molde hebras hemimetiladas. Este grupo se identificó en *Arabidopsis* a partir de su homología con la región catalítica carboxilo terminal de la metiltransferasa de mamíferos, Dnmt1 (Finnegan and Dennis 1993), la cual tiene una función similar a MET1 actuando como enzima de mantenimiento, perpetuando la metilación específicamente en los sitios GC (Bestor 2000). No obstante, existen evidencias cada vez más numerosas de que MET1 también puede actuar con actividad metiltransferasa *de novo* en nuevas secuencias (Gehring and Henikoff 2007), reprimiéndose la metilación *de novo* en mutantes *MET1* de *Arabidopsis* (Aufsatz et al. 2004).

El gen *MET1* pertenece a una pequeña familia multigénica de al menos 5 miembros (Finnegan and Dennis 1993, Genger et al. 1999), de los cuales se ha caracterizado parcialmente cuatro de ellos. Dos de estos genes, *MET2a* y *MET3*, se encuentran estrechamente ligados, pero los otros dos, *MET1* y *MET2b*, no presentan tal vinculación, aunque se sabe con certeza que los cuatro genes proceden del mismo gen ancestral (Finnegan and Kovac 2000).

MET1 es la metiltransferasa predominante en la mayoría de las plantas y se expresa tanto en tejidos vegetativos como florales (Ronemus et al. 1996). Por otro lado, *MET2a* y *MET2b* son transcritos en todos los tejidos, aunque el nivel de transcripción es mucho más bajo que el caso de *MET1* (Genger et al. 1999).

El segundo grupo, las CMTs, se identificó previamente en el genoma de *Arabidopsis* (Henikoff and Comai 1998), aunque posteriores estudios, demostraron que es ubicuo en el genoma de plantas (Rose et al. 1998, Papa et al. 2001). Este grupo, se caracteriza por la inserción de un cromodominio entre los motivos II y IV del dominio conservado de las metiltransferasas (Finnegan and Kovac 2000). Sorprendentemente, la combinación del dominio cromo con los motivos catalíticos de la metiltransferasa, propio de esta clase, es una característica única del mundo vegetal, ya que no se han identificado genes relacionados con CMT en genomas animales o fúngicos (Bender 2004).

Dentro de esta familia se han identificado, al menos en *Arabidopsis*, tres enzimas diferentes (CMT1, CMT2, CMT3) (Genger et al. 1999). Todas ellas parecen estar involucradas en la transformación del DNA en heterocromatina, siendo responsables del mantenimiento de la metilación de los sitios CpNpG y, particularmente, en retrotransposones (Lidroth et al., 2001; Tompa et al., 2002).

El tercer grupo, DRM, se identificó mediante el análisis del genoma de *Arabidopsis* por homología con las enzimas Dnmt3 en mamíferos (Cao and Jacobsen 2002). Este grupo está compuesto por DRM1 y DRM2, las cuales participan en la metilación asimétrica del DNA (Cao and Jacobsen 2002, Cao et al. 2003).

1.5 EL NÚCLEO CELULAR.

En los últimos años se han logrado importantes avances en el conocimiento de la organización del núcleo celular. El núcleo está organizado en compartimentos estructurales y funcionales, que tienen un gran dinamismo y están implicados en la replicación y transcripción del DNA, así como en el procesamiento y transporte de los RNAs nucleares (Misteli 2005).

La replicación es el proceso de síntesis de DNA, mecanismo que permite duplicar los cromosomas, portadores de la información genética, antes de cada división celular. La transcripción es el mecanismo de síntesis de RNA a partir del molde de DNA. En el caso de genes que codifican proteínas, la transcripción permite copiar la información del DNA en moléculas de RNA que serán traducidas en el citoplasma para generar las proteínas codificadas por los genes.

El procesamiento del RNA mensajero (mRNA), que codifica proteínas, incluye modificaciones esenciales en el RNA naciente ó transcrito primario: a) el “splicing”, proceso que conduce a la eliminación de las secuencias intrónicas, no codificantes, b) la formación de una caperuza de guanósina metilada en el extremo 5', modificación necesaria para que el mRNA sea reconocido por la maquinaria citoplásmica de síntesis de proteínas, el ribosoma, que traduce el mensaje del mRNA en una proteína, y c) la poliadenilación, que consiste en la adición de 100 a 200 nucleótidos de adenina al extremo 3' (cola de poli A), mecanismo que estabiliza los mRNA y previene su degradación por nucleasas.

Durante mucho tiempo, el núcleo celular se consideró como un compartimento estructurado estático. No obstante, en las últimas décadas esta visión ha cambiado drásticamente, debido principalmente a los avances técnicos en el campo de la microscopía. Actualmente, el núcleo celular se considera como un complejo altamente organizado y extremadamente dinámico, donde los componentes nucleares interaccionan unos con otros y ocupan posiciones específicas, organizadas en dominios estructurales y funcionales (Taddei, A et al., 2004; Misteli, T. (2005); Esteller, M. (2005) Esteller 2007).

De hecho, el núcleo se propone como una entidad con capacidad autoorganización (Misteli 2005).

1.5.1 La arquitectura nuclear / organización nuclear.

La arquitectura nuclear es el resultado de la heterogeneidad morfológica y funcional generada por las diferentes posiciones de los compartimentos subnucleares dentro del núcleo. Un dominio nuclear se define como una región dentro del núcleo, que es morfológicamente y/o funcionalmente distinta de los alrededores (Misteli 2005).

Figura 1.22. Estructura del núcleo (Spector et al., 2001).

La caracterización de los compartimentos nucleares es bien conocida desde los clásicos estudios citológicos realizados por Cajal (1910), a escala de microscopía óptica, y por Monneron y Bernhard (1969), a escala de microscopía electrónica. Hoy en día se sabe que estos compartimentos estructurales disponen de una maquinaria molecular muy compleja, parcialmente identificada en los últimos 20 años con métodos de inmunofluorescencia e hibridación *in situ* que utilizan anticuerpos y sondas para reconocer proteínas y ácidos nucleicos (DNAs y RNAs) que juegan un papel esencial para la fisiología nuclear (Lamond and Earnshaw 1998, Misteli 2005).

En la actualidad, el núcleo eucariótico rodeado de la envuelta nuclear, se considera organizado en tres compartimentos principales, el cromatínico o cromosómico, donde se distribuyen los cromosomas y se produce la replicación y transcripción del DNA, el dominio intercromatínico, que comprende los cuerpos nucleares y otras estructuras implicadas en el procesamiento de RNAs nucleares y el nucleolo, estructura nuclear mejor conocida, localizada en el dominio intercromatínico.

La envoltura nuclear es característica y exclusiva de los núcleos eucariotas, lo que supone un importante avance en la regulación de la expresión génica frente a células

procariotas. La existencia de esta envoltura permite que los procesos de transcripción y traducción de mensajeros se realicen en compartimentos diferentes. A nivel ultraestructural, la envoltura nuclear consta de dos membranas separadas por un estrecho espacio perinuclear y contiene numerosos poros nucleares, que son estructuras dinámicas cuyo número varía en función de la actividad celular (Alberts et al., 1983).

En el dominio cromosómico, la fibra de cromatina correspondiente a cada cromosoma particular, no se distribuye al azar en el compartimento nuclear, sino que ocupa una localización específica conocida como dominio o territorio cromosómico, una característica que confina la organización espacial dentro del compartimento nuclear (Cremer and Cremer 2001).

La cromatina es el dominio que alberga la información genética de la célula, el genoma. Está formada a partes iguales de DNA, histonas y proteínas no histonas. Las histonas son las proteínas responsables del empaquetamiento del DNA eucariótico en nucleosomas, lo que representa el primer nivel de organización para el empaquetamiento de las moléculas del DNA. El empaquetamiento alcanza su máximo grado de condensación en los cromosomas metafásicos. También existen, aunque en proporciones variables, proteínas de diferentes tipos, comúnmente llamadas no histonas, entre las que se encuentran varias polimerasas de DNA y RNA, así como proteínas reguladoras (Kornberg and Klug 1981, McGhee and Felsenfeld 1980).

La estructura de la cromatina no solo es importante para el empaquetamiento del DNA, sino que también juega un papel importante en diversos procesos biológicos como la expresión génica, la replicación del DNA y la reparación, la recombinación y segregación cromosómica (Fuchs et al. 2006).

Los diferentes patrones de organización cromosómica se asocian con perfiles de expresión génica característicos y propiedades de tinción específicas. Así, la eucromatina representa la cromatina descondensada y potencialmente activa, mientras que la heterocromatina está condensada y transcripcionalmente inactiva.

La región intercromatínica es el espacio nuclear existente entre las masas de cromatina condensada. En esta región se lleva a cabo la replicación del DNA, la transcripción y el procesamiento temprano de ribonucleoproteínas (RNPs) heterogéneas (Fakan y Puvion 1980). Las ribonucleoproteínas (RNPs) están asociadas y forman parte de la maquinaria de transcripción y splicing.

Mediante la técnica de tinción con EDTA (Bernhard et al., 1969), específica para ribonucleoproteínas, se ha podido observar que en células eucariotas, las RNPs están siempre organizadas como estructuras morfológicamente reconocibles conocidas como fibrillas pericromatínicas (FP), gránulos pericromatínicos (GP), localizadas en la periferia de la cromatina condensada y gránulos intercromatínicos (GI) localizados en el llamado espacio intercromatínico.

Las FP son finas estructuras fibrilares reconocidas como equivalente morfológico de la transcripción (Fakan, 1994, 2004), así como de splicing (Cmarko et al. 1999) e incluso del procesamiento del extremo 3' (Schul, vanDriel and deJong 1996, Cardinale et al. 2007). Los GP, están implicados en el almacén y transporte de mRNA del núcleo al citoplasma (Fakan, S.1994). Finalmente, los GI representan un lugar de almacén para snRNP y factores de transcripción no-snRNP y un posible lugar de unión para el ensamblaje de espliceosomas (Misteli and Spector 1998, Bogolyubov, Stepanova and Parfenov 2009). La densidad de gránulos y fibras presentes en esta región sufre numerosas variaciones en relación al estado funcional del núcleo tanto en células animales como vegetales (Bernhard et al., 1971; Fakan y Puvion 1980; Testillano et al., 1993b).

En la región intercromatínica, también se ha descrito la presencia de unas estructuras llamadas cuerpos nucleares, que pueden estar asociados o no a las masas de cromatina y que en ocasiones, se encuentran en la proximidad del nucleolo (Matera 1999). Estas estructuras son características de determinados tipos celulares o de estadios en diferenciación concretos. Además, algunos cuerpos nucleares como “kariosomas” (Sankaran.K and Hyde 1965), cuerpos densos (Jordan et al, 1978) y “micropuffs” (Risueno et al. 1978) parecen ser específicos de especies vegetales;

mientras que otros como los “coiled bodies” o cuerpos de Cajal se encuentran tanto en células animales como vegetales (Medina et al. 1986, Beven et al. 1995, Cioce and Lamond 2005). Los cuerpos de Cajal fueron descubiertos por Cajal (1903) en tejido nervioso de mamíferos y fueron descritos inicialmente como “cuerpos auxiliares” del nucleolo. Los cuerpos de Cajal no están implicados en el procesado del pre-mRNA, pero han sido relacionados con el estado de actividad celular, al haberse observado un mayor número de ellos en células metabólicamente activas (Andrade et al., 1993; Carmo-Fonseca et al., 1992; Gall et al., 2000; Straatman et al., 2001; Cioce y Lamond, 2005; Stanek y Neugebauer et al., 2006).

Estas estructuras nucleares parecen estar relacionadas con el transporte o retirada de factores de transcripción y/o proteínas hacia o desde los lugares de transcripción de ambos pre-mRNA y pre-rRNA (Carmofonseca, Ferreira and Lamond 1993, Malatesta et al. 1994).

En el estudio comparativo entre células normales y transformadas se encontraron diferencias en cuanto al número de estos cuerpos, sugiriéndose que su presencia podría ser el reflejo de un aumento en la actividad metabólica celular (Spector, Okeefe and Jimenezgarcia 1993).

Por último, el nucleolo, compartimento nuclear localizado en el dominio intercromatínico, donde en células eucariotas tiene lugar la transcripción de los RNAs ribosómicos (rRNA) así como su procesamiento, ensamblaje y transporte en forma de partículas preribosómicas (Gossens et al., 1984; Risueño y Testillano 1994; Hadjiolov et al., 1985; Risueño y Medina 1986; Raska et al., 2004, 2006; Hernández-Verdún, 2006). El nucleolo se organiza en torno a la región organizadora nucleolar o NOR, que contiene los cistrones ribosómicos. El nucleolo es un orgánulo muy dinámico que se organiza y desorganiza en cada ciclo celular y es capaz de responder rápidamente a las variaciones en las necesidades metabólicas celulares (Malatesta, Zancanaro and Biggiogera 2011), siendo especialmente sensible a las variaciones en la síntesis de rRNA (Hernandez-Verdun 2006).

1.6 MUERTE CELULAR PROGRAMADA

La muerte celular programada (MCP) es un proceso genéticamente controlado de eliminación celular, esencial para el crecimiento y supervivencia de la planta (Gadjev, Stone and Gechev 2008).

En plantas, la muerte celular programada se ha relacionado con numerosos procesos de desarrollo: formación de embriones, degeneración de la aleurona durante la germinación de monocotiledóneas, diferenciación de los elementos traqueales en los tejidos del xilema, formación del parénquima y tricomas de raíces, degeneración del tapetum de anteras, abscisión de órganos florales, remodelación y senescencia de hojas, y más recientemente, con la eliminación del polen en procesos de autoincompatibilidad (Thomas and Franklin-Tong 2004), Wang y col. 2009).

El proceso de MCP tiene lugar a través de una serie de eventos celulares característicos que terminan con el desmantelamiento de los orgánulos intracelulares.

Figura 1.23. Muerte celular programada en plantas y su implicación en procesos de desarrollo y en respuesta a fluctuaciones ambientales (Gadjev et al. 2008)

La masiva reorganización del núcleo y la estructura de los orgánulos en células apoptóticas tienen como consecuencia la destrucción de toda la maquinaria celular biosintética, mientras que la integridad de la membrana plasmática se mantiene, por lo que se previene la liberación del contenido celular al espacio extracelular (Malatesta 2011).

En animales, se tiene un amplio conocimiento sobre la muerte celular programada, sin embargo, el conocimiento acerca de los mecanismos genéticos que regulan y ejecutan la MCP en plantas es más limitado.

En células vegetales, la función fisiológica de MCP y los posibles mecanismos implicados en el proceso, se conocen muy poco y son objeto de numerosas

investigaciones Burbridge et al. 2006; Bozhkov et al. 2005; Suarez et al. 2004; Reape et al. 2008). Los estudios más recientes revelan distintos detalles de este proceso, contribuyendo a la mayor comprensión de la maquinaria que lo controla.

1.6.1 Características de la muerte celular programada en plantas

El proceso de muerte celular programada en vegetales comparte características morfológicas y bioquímicas con el fenómeno de apoptosis en animales, (Lam 2004) incluyendo contracción del citoplasma, condensación y agregación de la cromatina y fragmentación del DNA nuclear (Cohen 1993, Wang et al. 1996). Estos procesos requieren síntesis *de novo* de proteínas y son independientes de factores externos, al contrario de lo que ocurre en la necrosis, la cual no depende de un control genético específico, ni de la actividad celular (Van Breusegem and Dat 2006).

La muerte celular programada en plantas presenta unos atributos especiales, que se deben principalmente a la pared celular, la cual impide la eliminación de la célula muerta por las células colindantes. Además, orgánulos específicos de plantas como vacuolas y cloroplastos, contribuyen de forma importante en el proceso de muerte celular y en la determinación de las características únicas de este proceso en plantas. En la mayoría de los casos, al producirse muerte celular programada, se mantiene la pared celular tras la descomposición de los protoplastos y la reutilización de sus componentes. Este es el caso de la formación de los elementos traqueales en los que no solo permanece la pared celular, sino que además se produce un reforzamiento de la misma (Nakashima et al. 2000).

Las vacuolas son un elemento crucial en la mediación de la lisis celular, además de ser depósito de numerosos metabolitos e intervenir en la defensa y el reciclado de los componentes celulares. El colapso del tonoplasto y la liberación de proteasas y nucleasas acumuladas, se consideran fenómenos comunes a todos los tipos de muerte celular programada en plantas.

Se producen invaginaciones en el tonoplasto, liberando vesículas hacia el interior de la vacuola, difíciles de diferenciar en los primeros estadios de muerte celular programada. Estos procesos van seguidos de cambios en la morfología nuclear, condensación cromatínica y fragmentación del DNA (Gunawardena y col. 2004).

Las vacuolas son los orgánulos encargados de llevar a cabo la autofagia en plantas mientras que en animales son los lisosomas (Bassham 2001).

En muchos casos las células que sufren muerte celular programada en plantas exhiben una morfología típica de muerte celular autofágica: incremento del tamaño vacuolar y celular, entrada de orgánulos a la vacuola seguido de la degradación de orgánulos y lisis de la vacuola, que da como resultado la muerte celular (Gaffal, Friedrichs and El-Gammal 2007) (Fig. 1.24).

Los cloroplastos son una fuente importante de señales que desencadenan la muerte celular programada en plantas, tales como, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o ion superóxido (O_2) (Koussevitzky col. 2007, Lee y col., 2007, Liu y col., 2007, Wagner y col., 2004). Las cadenas de transporte fotosintético producen peróxido de hidrogeno e ion superóxido, sobre todo en casos de una alta producción de energía (Gechev et al. 2006).

Figura 1.24. Características morfológicas de la muerte celular programada.

El papel regulador de los cloroplastos en la muerte celular programada parece estar coordinado con el de las mitocondrias. Las mitocondrias son decisivas en la muerte celular de animales; son muchos los agentes letales que las utilizan como blanco, ya que tras la muerte se produce la liberación del citocromo c y otras proteínas apoptóticas, que inician la activación de las caspasas y la apoptosis. Aunque el papel de las mitocondrias en la muerte celular programada en plantas no es tan relevante, sin embargo si se han descrito diversos tipos de muerte celular programada en plantas en los que está implicado el citocromo c: muerte celular inducida por choque térmico, muerte celular asociada a la formación de elementos traqueales e incluso

muerte celular producida como consecuencia de las reacciones de autoincompatibilidad (Balk y col., 1999; Yu y col., 2002, Thomas and Franklin-Tong, 2004).

Todo este proceso de muerte celular programada se lleva a cabo mediante una compleja ruta molecular mediada por proteasas específicas, que juegan un papel fundamental en el proceso, son las caspasas (“cysteine aspartyl-especific proteases”).

1.6.2 Caspasas

Estas proteasas se expresan en la célula de forma constitutiva como proenzimas o zimógenos, que se activan por proteólisis tras la estimulación de la vía apoptótica (Fig. 1.25).

En la especie humana se conocen 11 tipos, que se clasifican en dos grupos: caspasas iniciadoras y caspasas efectoras o ejecutoras. Las caspasas iniciadoras se activan tras la recepción de la señal apoptótica y por autocatálisis por proximidad, transmiten la señal a las caspasas efectoras. Por otro lado, las caspasas efectoras son las encargadas del desmantelamiento celular mediante la proteólisis de una gran variedad de proteínas implicadas en supervivencia celular como proteínas del citoesqueleto, proteínas implicadas en la reparación del daño en el DNA y proteínas implicadas en el ciclo celular.

La proteína ejecutora predominante en células animales es la caspasa 3, responsable de la mayor parte de los efectos desencadenantes de muerte celular y objeto de estudio en esta Tesis.

Figura 1.25. Esquema de activación de las procaspasas. La fragmentación de las procaspasas se realiza específicamente sobre los enlaces Asp-x y dirige la formación de la caspasa activa, formada por un heterotetrámero p20₂ - p10₂ y la liberación de un predominio.

(Figura adaptada de Lavrick et al., 2005b).

Se conocen 3 vías principales que llevan a la activación de caspasas y por lo tanto a la muerte celular (Fig. 1.26):

Figura 1.26. Rutas de inducción de la muerte celular programada.

1) Vía de activación a través de receptores de muerte o vía extrínseca, en la cual la principal responsable de la iniciación del proceso es la caspasa 8. Esta ruta se activa tras la unión de distintos ligandos de muerte ($\text{TNF}\alpha$, FAS-L, TRAIL) a sus receptores específicos localizados en la membrana celular. Tras esta activación se produce la trimerización del receptor y la formación de un complejo multiproteico inicial conocido como DISC (complejo inductor de señales de muerte) sobre el cual se recluta la caspasa iniciadora 8 que se autoactiva por aproximación (Strasser et al., 2000; Igney and Krammer 20002; Lavrik et al., 2003; Lavrik et al., 2005).

2) Vía mitocondrial o ruta intrínseca; activada principalmente como respuesta a daños celulares producidos por radiación ultravioleta, grandes genotóxicos y retirada de factores de crecimiento. Se caracteriza por la liberación de proteínas mitocondriales al citoplasma (citocromo c entre otras) y la activación de la caspasa iniciadora 9 mediante la estructura proteica denominada apoptosoma (Li et al. 1997). Esta ruta está controlada por proteínas de la familia Bcl-2 (Green and Reed, 1998).

En plantas, aunque se ha descrito la traslocación del citocromo c al citoplasma, su posible función como señal de muerte celular no se ha demostrado aún, sino tan sólo como una consecuencia de la destrucción de la mitocondria (Lam 2004). Estudios recientes indican que la rotura de la permeabilidad de la mitocondria podría estar relacionada con la inducción de muerte celular en algunos sistemas de plantas (Lam E 2004), pero se requieren más estudios genéticos y moleculares para el entendimiento del mecanismo implicado.

3) Vía dependiente de retículo endoplásmico, descrita en modelos murinos, aunque no está muy clara el papel del retículo en la activación de apoptosis en humanos.

En plantas, aunque se ha observado una actividad proteolítica similar a caspasas, en el genoma de *Arabidopsis* no se ha conseguido identificar el gen que codifica para enzimas caspasas. Así surgió el término metacaspasas, consideradas como candidatas de regulación y ejecución de la MCP en plantas (van der Hoorn and Jones 2004) . Estas enzimas, presentes en plantas, hongos y protozoos, se definen como ortólogos

La microspora o grano de polen inmaduro sigue un desarrollo gametofítico *in vivo*, que da lugar al grano de polen maduro o gametofito masculino. Mediante la aplicación de un tratamiento de estrés *in vitro*, la microspora puede desviar su ruta de desarrollo gametofítico y reprogramarse hacia una ruta embriogénica con la formación de un embrión, proceso conocido como embriogénesis del polen. Este sistema constituye una potente herramienta biotecnológica en mejora vegetal para la generación rápida de nuevas variedades mediante plantas doble-haploides. El desarrollo esporofítico y gametofítico del polen en la antera está asociado al correcto desarrollo del tapetum o tejido nutricional de la antera, que una vez finalizada su función sufre una degeneración mediante muerte celular programada (MCP), asumiendo posteriormente esta función la célula vegetativa hasta la formación de los gametos a partir de la célula generativa.

En esta Tesis, se plantea el estudio de diferentes aspectos de la fisiología del proceso *in vitro* de embriogénesis del polen en comparación con el desarrollo gametofítico del polen, centrándose en los sucesos de MCP, los marcadores de embriogénesis, la dinámica de la pared celular y la metilación del DNA, con el objetivo de comprender los mecanismos que controlan la reprogramación celular mediante tratamientos de estrés y la adquisición posterior de competencia embriogénica. Por otro lado, debido a la importancia de la MCP y la metilación del DNA durante la reprogramación a embriogénesis inducida por estrés, se plantea también el estudio de la dinámica de estos dos procesos durante la diferenciación del polen *in vivo*, especialmente durante el desarrollo y MCP del tapetum.

Para este estudio se ha empleado fundamentalmente la especie modelo *Brassica napus*, más susceptible de inducción a embriogénesis, y en objetivos específicos se ha realizado un estudio comparativo con *Nicotiana tabacum*, especie herbácea y *Olea europea*, especie leñosa de gran interés económico pero muy recalcitrante, en la que los sistemas de cultivo *in vitro* están todavía en desarrollo. El abordaje experimental ha sido el empleo de técnicas citoquímicas para la detección *in situ* de diferentes

componentes celulares (Azul de Toluidina, Calcofluor White para celulosa, tinción con I₂KI para almidón y Azul de Evans para detección de muerte celular) e inmunocitoquímicas con anticuerpos específicos (Jim7, Jim5, que reconocen pectinas con diferente grado de esterificación, anti-RNA, anti-5mdC para detectar citosinas metiladas y anti-caspasa 3 para detectar MCP), ensayos inmunoquímicos de “Dot blot” y “Western blot”, ensayos de actividad enzimática, estudios de expresión génica mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y PCR semicuantitativa y electroforesis capilar de alta resolución (HPCE) para cuantificar el grado de metilación global del DNA y herramientas de transformación transitoria con GFP.

Para la realización de este estudio se proponen los siguientes objetivos:

1. **Optimización de cultivo *in vitro* de microsporas aisladas de *Brassica napus L*** para una mayor eficiencia de inducción a embriogénesis, germinación de embriones y conversión a plantas adultas determinando además, mejores condiciones de crecimiento de la planta donadora.
2. **Análisis de otras respuestas celulares al estrés inductor de embriogénesis en cultivo de microsporas.** Evaluación del comportamiento del cultivo, determinándose los niveles de muerte celular y sus efectos. Identificación de características de muerte celular programada (MCP): actividad enzimática caspasa 3 y localización de proteínas tipo caspasa 3 activa.
3. **Búsqueda e identificación de marcadores de embriogénesis.** Determinación de cambios a nivel celular y subcelular en la organización del núcleo, citoplasma y pared celular, que acompañan a la reprogramación de la microspora a embriogénesis, en comparación con la ruta gametofítica.
4. **Análisis de la distribución diferencial de componentes de la pared celular asociada a la reprogramación del polen a embriogénesis** en relación con procesos de proliferación y diferenciación. Estudio de la

proporción y distribución de pectinas esterificadas y no esterificadas de la pared celular. Análisis de los patrones de expresión *in situ* del gen pectinmetilesterasa (*PME*) que codifica para la enzima PME, implicada en la regulación del grado de esterificación de pectinas de la pared celular y localización subcelular *in vivo* de la proteína PME mediante tecnología GFP. Estudio comparativo del nivel de expresión y distribución de PME en embriones cotiledonares cigóticos y derivados de microsporas.

5. **Análisis de la dinámica de metilación del DNA durante el desarrollo gametofítico y la reprogramación del polen a embriogénesis.** Puesta a punto del sistema de cuantificación de metilación global mediante HPCE para nuestro material de estudio. Determinación del nivel de metilación global del DNA y su patrón de distribución nuclear en relación a la dinámica de la arquitectura nuclear. Análisis de los patrones de expresión *in situ* del gen DNA metiltransferasa I (*MET1*), que codifica para la enzima MET1, principal responsable de la metilación del DNA. Estudio comparativo del patrón de metilación del DNA y expresión de *MET1* en embriones cotiledonares cigóticos y derivados de microsporas.

6. **Análisis de la muerte celular programada y la metilación del DNA durante la diferenciación del polen *in vivo*.** Caracterización del proceso de desarrollo y muerte celular programada (MCP) del tapetum. Localización de antígenos análogos a caspasa 3 y determinación de actividad enzimática caspasa 3. Localización ultraestructural de marcadores nucleares específicos en relación a actividad transcripcional y degradación de RNA. Determinación del nivel de metilación global del DNA y su patrón de distribución nuclear, en relación a la dinámica de la arquitectura nuclear. Análisis del patrón de expresión *in situ* del gen *MET1*.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO

3.1.1 Plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv Petit Habana SR1)

Las semillas de tabaco de la variedad Petit Habana SR1 se esterilizaron por inmersión en hipoclorito sódico comercial al 30% durante 10 min. A continuación, se realizaron varios lavados con agua destilada estéril y se dejaron secar al aire sobre papel de filtro.

Las semillas se germinaron en tiestos con una proporción tierra/vermiculita 2:1, en una cámara de crecimiento de plantas con 25°C de temperatura, 80% de humedad relativa y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

Transcurridos 15 días, aparecieron las primeras plántulas y un mes y medio después, éstas empezaron a florecer.

En el momento de la floración, se seleccionaron diferentes tamaños de botones florales para estudios del desarrollo gametofítico del polen *in vivo*, tanto en anteras completas como en microsporas aisladas a partir de las mismas.

3.1.2 Plantas de colza (*Brassica napus* L. cv. Topas)

El crecimiento de las plantas de colza de la variedad Topas se llevó a cabo en cámaras de crecimiento con una temperatura de 18°C, una humedad del 80% y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

Transcurridos de 2 a 3 meses desde la siembra de las semillas, las plantas empezaron a florecer.

Los botones florales se emplearon tanto para estudios del desarrollo gametofítico del polen *in vivo* como para el cultivo *in vitro* de microsporas aisladas.

3.1.3 Meristemos de raíz de cebolla (*Allium cepa* L.)

Se utilizaron bulbos de cebolla de la variedad francesa, obtenidos en el mercado. Para su germinación, se eliminaron las primeras capas secas y se lavaron con abundante agua para eliminar los inhibidores de la germinación que contienen los bulbos comerciales.

A continuación, se colocaron en tubos largos y estrechos llenos de agua filtrada, de forma que la corona radicular quedase sumergida en la misma.

Al cabo de varios días a temperatura ambiente se desarrollaron raíces de 3 -4 cm de longitud, que brotaron desde la corona radicular quedando sumergidas en el agua del tubo que sostiene el bulbo.

El meristemo se localiza en la zona amarillenta de la punta de la raíz. Las muestras se obtuvieron cortando con un bisturí el ápice de la raíz, un poco más largo que el meristemo en sí mismo para no dañar el tejido de interés.

Después de la fijación se cortó el meristemo y se continuó con su procesamiento.

3.1.4 Microsporas de olivo (*Olea europea L.*)

Los botones florales se recogieron en los meses de Abril- Mayo de árboles de olivo de los cultivares Cornicabra (Madrid) y Arbequina, del “Olive World Germplasm Bank in Córdoba).

Para los cultivos de olivo, se seleccionaron los botones florales con mayor contenido en anteras en fase de microspora vacuolada.

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

3.2.1 Preparación del medio de cultivo

Se empleó el medio de cultivo denominado NLN-13 (Lichter, 1982), cuya composición se detalla en la tabla 3.1.

Macronutrientes		Vitaminas	
KNO ₃	150 mg	Ácido nicotínico	5 mg
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	500 mg	Piridoxina HCl	05 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	125 mg	Tiamina HCl	0,5 mg
KH ₂ PO ₄	125 mg	Glicina	2 mg
NaFe(III)-EDTA	40 mg	Biotina	0,05 mg
Micronutrientes		Ácido fólico	0,5 mg
MnSO ₄ ·4H ₂ O	25 mg	Complementos	
H ₃ BO ₃	10 mg	L-Glutamina	800 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg	L-Serina	100 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25 mg	Glutation	30 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025 mg	Mio-inositol	100 mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025 mg	Sacarosa	130 mg
pH 6,0			

Tabla 1. Composición de 1 litro de medio de cultivo NLN-13

La preparación del medio, se realizó a partir de preparados comerciales de la casa comercial Duchefa que consistían en una mezcla de sales basales (macro y micronutrientes) y vitaminas. Estos componentes, junto con las cantidades correspondientes de sacarosa (Merck) y nitrato de calcio (Merck) se diluyeron en agua Milli-Q.

A continuación, se ajustó el pH a 6 y se enrasó a 1L. Finalmente, el medio se esterilizó utilizando las unidades de filtración “Sterifil® Aseptic System and Holder” (Millipore) con ayuda de una bomba de vacío y se conservó a 4°C hasta el momento de su utilización.

Se empleó el mismo medio para el aislamiento, inducción y para el cultivo posterior. Por este motivo la composición del medio de cultivo consta de una elevada proporción de sacarosa, cuyo objetivo es asegurar un adecuado aporte de carbono durante todo el tiempo, sin necesidad de renovar el medio.

3.2.2 Correlación entre el tamaño de las yemas florales y su fase de desarrollo

Se recogieron yemas florales de diferentes partes de la planta, procedentes de inflorescencias con al menos una flor abierta.

Los botones florales recogidos se clasificaron en 4 grupos según su tamaño, desde 2,5 mm a 4 mm (en intervalos de 0,5), midiendo de forma estricta desde el receptáculo hasta la punta del botón con la ayuda de un calibre.

A continuación, se realizaron aplastados de los botones florales y se tiñeron con la solución 4'6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Serva), agente que tiñe selectivamente el DNA (Apartado 3.2.3.1).

Tras la visualización de los núcleos en un microscopio óptico de fluorescencia Zeiss 68105, se identificaron las fases de desarrollo correspondientes a cada caso y se estableció una relación entre el tamaño del botón floral y su fase desarrollo.

3.2.3 Aislamiento de microsporas y puesta en cultivo

Para realizar el cultivo, se seleccionaron las yemas florales de 3,2 – 3,4 mm de longitud, previamente identificadas como las portadoras de un mayor contenido en microsporas en su etapa vacuolada y polen bicelular joven, justo tras su primera mitosis, ya que éstos son los estadios más sensibles a la inducción a embriogénesis por choque térmico.

El aislamiento se realizó en una campana de flujo laminar, utilizando en todo momento material previamente esterilizado.

Las yemas florales seleccionadas se introdujeron en un colador de té, el cual se sumergió en una solución de hipoclorito sódico al 2% durante 25 min en agitación. A continuación, se realizaron 4 lavados de 5 min cada uno con agua estéril previamente enfriada a 4°C, para eliminar los restos de lejía.

Después de la esterilización, las yemas se pasaron a un mortero de porcelana estéril preenfriado. Se añadió 5 ml de medio NLN-13 y se machacó para extraer las microsporas.

El homogeneizado obtenido, se filtró a través de una malla de nylon con un tamaño de poro de 50 μm y se recogió en un tubo de 15 ml estéril (Falcon). A continuación, tanto el mortero como la malla, se lavaron con 5 ml de medio para intentar recoger todo el material restante. A partir de este momento, la suspensión celular se mantuvo a 4°C constantemente.

El filtrado, se centrifugó durante 3 min a 4°C a una velocidad de 1100 rpm en una centrífuga Eppendorf 5702RH.

Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 10 ml de medio fresco. Este paso se repitió tres veces más para eliminar los restos de tejidos somáticos.

Tras el último lavado, la suspensión celular se resuspendió en 10 ml de medio.

Se tomaron 10 μl de muestra y se dispuso sobre una placa de contaje (cámara de Neubauer) previamente limpiada con etanol 70%.

Tras su recuento en el microscopio óptico Leitz Laborlux 12, se añadió el volumen necesario para obtener una densidad celular de 10000 msp/ml, que es la dilución óptima de cultivo.

Aproximadamente 4 ml del volumen final obtenido, se destinó para su cultivo en un tipo de placas especiales, “ μ -Dish 35 mm, high” (Ibidi), caracterizadas por ser de un material plástico de gran calidad óptica, tener una capacidad de 2 ml y una altura de 12 mm, lo que permite su uso para microscopía. Finalmente, el resto del volumen se distribuyó en placas Petri de 10 cm estériles (Falcon) y se sellaron con parafilm.

Las placas se mantuvieron en oscuridad en estufa a 32°C hasta que se observaron los primeros embriones globulares. En este momento, los cultivos se pasaron a una cámara de 25°C acompañados de agitación en un agitador orbital (Elmi Skyline Shaker DOS-20L) a 60 rpm, manteniendo las condiciones de oscuridad.

3.2.4 Seguimiento del cultivo

Durante los primeros días tras la puesta en cultivo, se realizó un seguimiento exhaustivo de la respuesta de las microsporas al estrés inductor.

Por un lado, los cultivos en las placas de Petri, se observaron diariamente bajo la lupa (Eliza Tokyo Optical Company).

Paralelamente, las placas “ μ -Dish 35 mm, high” (Ibidi) se observaron en el Microscopio Multidimensional Leica AF6000LX, con el fin de documentar el proceso bajo contraste de fase.

Por último, para completar el seguimiento, se tomaron alícuotas de 2 ml, tras el aislamiento de las microsporas y cada 3 días, hasta la aparición de los primeros embriones. A partir de estas alícuotas se realizaron aplastados que se tiñeron con DAPI y se observaron bajo luz UV en un microscopio óptico de fluorescencia Zeiss 68105, para comprobar la correcta evolución de los cultivos.

Al cabo de 20-25 días, se realizó un recuento de los embriones obtenidos por cada placa. El recuento se llevó a cabo colocando la placa sin abrir, sobre un papel cuadriculado y contando el número de embriones maduros (visibles a simple vista). Teniendo en cuenta el número de microsporas inicial, se estimó el porcentaje de embriones obtenido respecto a las microsporas de partida.

3.2.4.1 Tinción con DAPI, para DNA, en aplastados

Se preparó una solución stock 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en agua destilada a partir del producto comercial 4'-6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) (SERVA; Ref. 18860) y se almacenó a 4°C.

La solución de tinción se preparó a partir de la solución stock, a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en agua destilada y Triton X-100 al 1% (v/v), para facilitar la penetración del DAPI en el tejido.

La tinción se llevó a cabo según el protocolo de Vergne y col 1987.

Las alícuotas recogidas se centrifugaron a 1100 rpm durante 3 min a 4°C. A continuación, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en la solución de tinción preparada. Tras su incubación durante 2 -3 h a 4°C y oscuridad, las muestras se centrifugaron de nuevo en las mismas condiciones y se descartó el sobrenadante, dejando un volumen aproximado de 50 μl , que se

dispuso sobre un portaobjetos y se colocó encima un cubreobjetos y se presionó para aplastar la muestra.

3.2.5 Recogida de muestras

Se recogieron muestras del cultivo a diferentes tiempos, para la realización de posteriores estudios de Biología Celular y Molecular.

Los tiempos aproximados de recogida de muestras se reflejan en la tabla 3.2.

Tiempo en cultivo	Fase del cultivo
Inicio	Predominan microsporas en fase de MV
3-4 días	Predominan estructuras multicelulares con exina.
8-10 días	Predominan estructuras multicelulares con la exina
14-16 días	Predominan embriones en fase globular y corazón.
20-22 días	Predominan embriones en fase torpedo.
22-24 días	Predominan embriones en fase cotiledonar.

Tabla 2: Tiempos aproximados de recogida de muestras de los cultivos de microsporas de *B.napus*.

Según el volumen final de cada cultivo, se dividieron las placas preparadas, para recoger material de todas las fases y para ambos tipos de estudios, destinando siempre, un mayor número de éstas a las primeras fases, donde el tamaño de las células es menor.

Cada una de las muestras, se recogieron en tubos de 50 ml (Falcon) y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min a 4°C en una centrífuga Eppendorf 5702RH. Se descartó el sobrenadante hasta dejar un volumen aproximado de 1 ml. A partir de este volumen, se tomaron las muestras para Biología Celular y Molecular.

3.2.5.1 Recogida de muestras para estudios de Biología Molecular

Se pasaron 800 µl, aproximadamente, a un tubo estéril de 1,5 ml (Eppendorf) y se centrifugó de nuevo a 13000 rpm durante 5 min en una centrífuga de mesa (Eppendorf). A continuación, se descartó el sobrenadante por completo y el precipitado se congeló en un baño de nitrógeno líquido.

Finalmente, las muestras recogidas, se almacenaron a -80°C hasta el momento de uso.

3.2.5.2 Recogida de muestras para estudios de Biología Celular

El volumen restante, se pasó a otro tubo de 1,5 ml (Eppendorf) y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min a 4°C. A continuación, se retiró el medio completamente, y se procedió a la fijación del material (apartado 3.3.1.1).

3.2.6 Germinación de embriones y regeneración de plántulas.

Los embriones derivados de microsporas se germinaron siguiendo el protocolo descrito por Prem et al (2008). Se empleó medio MS (Murashige and Skoog, 1964) con sacarosa 2% (p/v) con agar bacteriológico 7 g/l (p/v). Los embriones se colocaron sobre un papel Whatman estéril dentro de una placa Petri estéril y se procedió a su desecación por aire.

Después de la desecación de los embriones derivados de microsporas, se procedió a su germinación a partir de su cultivo a 18°C en condiciones de oscuridad hasta la activación de la radícula y el cotiledón. Transcurridos 20-24 días en estas condiciones, se observó el desarrollo de la radícula. En este momento, los cultivos se transfirieron a 25°C con un fotoperiodo de 16h. Aproximadamente después de una semana, se produce la activación de la clorofila y 3 semanas después, se desarrollaron plántulas con 3-4 hojas.

3.3 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR

3.3.1 Procesamiento de muestras para microscopia óptica

3.3.1.1 Fijación

La fijación de las muestras se llevó a cabo en una solución de paraformaldehído al 4% (p/v) en tampón fosfato salino (PBS) (fosfato-K 20 mM, pH 7,3, NaCl 150 mM) preparado a partir de paraformaldehído en polvo (Merck).

Para su completa disolución, se calentó en un baño, con una temperatura máxima de 60°C, hasta que se observó la solución completamente transparente. Finalmente, se dejó enfriar a 4°C y se almacenó en alícuotas a -20°C.

Las muestras se sumergieron en la solución de paraformaldehído al 4% y se desgasificaron durante unos minutos dentro de un desecador conectado a una bomba de vacío, para facilitar la penetración del fijador.

Por último, se mantuvieron en la solución de fijación durante 18 h a 4°C.

Tras la fijación, las muestras se lavaron tres veces con PBS durante 10 min para eliminar el fijador y se conservaron a 4°C en una solución de paraformaldehído al 0.1% (p/v) en PBS, para evitar que la fijación revirtiese.

De esta forma, las muestras se almacenaron durante semanas.

3.3.1.2 Inclusión en gelatina

Las muestras procedentes de células aisladas se incluyeron en gelatina al 15% (p/v) en tampón PBS para facilitar su manejo en pasos posteriores.

El material, previamente fijado, se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min a 4°C en una centrífuga Eppendorf 5702RH. A continuación, el precipitado obtenido, se resuspendió en un volumen de 100-150 µl de gelatina al 15% en tampón PBS, previamente calentada en baño a 37°C para aumentar su fluidez. Seguidamente, la muestra se centrifugó de nuevo a 3000 rpm a 37°C durante 10 min, e inmediatamente se dejó enfriar en hielo durante unos minutos hasta que solidificó. A continuación, se añadió 50 µl de tampón PBS para evitar que se secase y 50 µl de

paraformaldehído al 4% para endurecer más la gelatina. Finalmente, las muestras se mantuvieron a 4°C durante toda la noche.

Al día siguiente, las muestras se desmoldaron y se eliminó la gelatina sobrante de la parte superior. Mientras que, la gelatina que contenía la muestra, se troceó en pequeños bloques, que se almacenaron en PBS a 4°C.

3.3.1.3 Deshidratación

Tras realizar tres lavados con PBS de 5 min cada uno, se inició el proceso de deshidratación de las muestras mediante la incubación de las mismas en series de acetona de concentración creciente (30%, 50%, 70%, 90% y 100%) (v/v) en PBS, durante 60 min en cada solución. La incubación en la solución de acetona 100% se repitió tres veces.

Todo el proceso de deshidratación de las muestras, se realizó a 4°C.

3.3.1.4 Infiltración

Las muestras deshidratadas se infiltraron en Histo-resin Plus (Technovit 8100), resina de naturaleza hidrofílica, muy útil para estudios generales de microscopía óptica.

Se preparó una solución de infiltración a partir de 10 ml de la solución “Base-Liquid Histo-resin plus” por 0.06 g del producto “activator” en un recipiente de vidrio, de acuerdo con las instrucciones del kit.

Se añadió esta solución a los eppendorf que contenían las muestras y se mantuvo toda la noche a 4°C en agitación en un agitador rotacional (noria).

En el caso de muestras de mayor de tamaño, el tiempo de infiltración se incrementó hasta 2 días a 4°C.

3.3.1.5 Polimerización

Transcurrido el tiempo de la infiltración, se sustituyó la solución de infiltración de las muestras por la solución de inclusión recién preparada a partir de 3 ml de solución de infiltración y 0,16 ml de “Hardener” (endurecedor II), de acuerdo con las instrucciones del kit.

A continuación, se retiró cada una de las muestras de los eppendorf con ayuda de un palillo y se colocaron al fondo de unas cápsulas de gelatina (Agar Scientific, tamaño num.4), a las que previamente se les añadió una gota de solución de inclusión para evitar la formación de burbujas.

Se orientó la muestra de manera que ésta quedase lo más centrada posible y se terminó de rellenar la cápsula con la solución de inclusión. Este procedimiento se llevó a cabo sobre un transiluminador para visualizar mejor la muestra y comprobar su orientación.

Por último, se taparon las cápsulas y se mantuvieron a 4°C durante 24 h.

3.3.1.6 Obtención de cortes semifinos

A partir de los bloques de resina polimerizados, se realizaron cortes semifinos de 1 µm en un ultramicrotomo (LKB Ultratome III) utilizando una cuchilla de vidrio previamente fabricada en un equipo “knifemaker” (LKB Bromma).

Una vez alcanzada la zona de la muestra en el bloque, los cortes se recogieron con ayuda de unas pinzas y se depositaron sobre una gota de agua en un portaobjetos. Tras el secado de los cortes en una placa calefactora, se realizaron las diferentes tinciones citoquímicas necesarias (Apartado 3.3.6) o bien, se procedió directamente al montaje de la preparación, para su observación en contraste de fase.

Para la puesta en definitivo de las preparaciones sobre el portaobjetos, se empleó la resina “Eukitt” (Kindler GmbH & Co).

Finalmente, los cortes se observaron en un microscopio óptico Zeiss 68105 con cámara Leica DFC420C.

3.3.2 Recubrimiento de portaobjetos con APTES

Este proceso se realizó según el protocolo de Rentrop y col., 1986. Para ello, se emplearon portaobjetos multipocillo nuevos, perfectamente lavados con un detergente neutro potente y agua destilada. Una vez secados resguardados del polvo, se procedió a su recubrimiento.

El proceso de recubrimiento se realizó sumergiendo los portaobjetos durante 3 min en la solución 3-Amino-propil-trietoxi-silano (APTES) (Sigma) al 2% (v/v) en acetona pura (Merck), recién preparada. A continuación, los portaobjetos se sumergieron en soluciones de acetona y agua destilada tal y como indica la figura 3.1.

Finalmente, los portaobjetos se dejaron secar y se guardaron en cajas protegidos del polvo hasta su utilización.

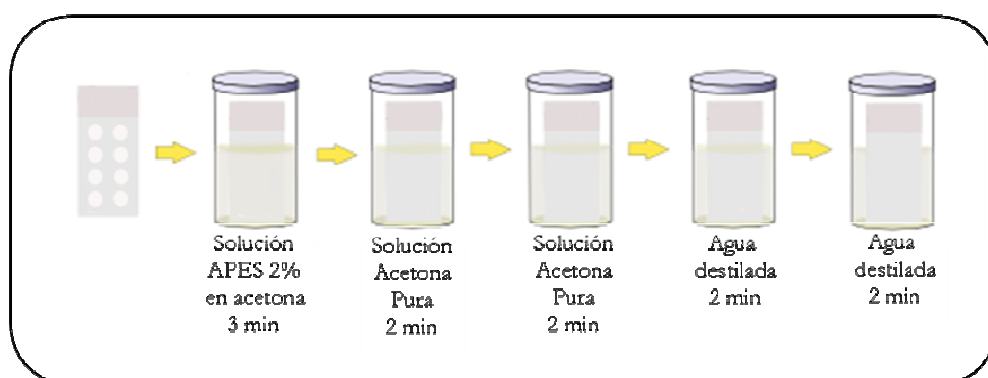


Figura 3.1: Esquema del proceso de recubrimiento de portaobjetos con APTES.

3.3.3 Obtención de cortes en vibratomo

Se obtuvieron secciones de 50 μm de grosor, a partir de muestras previamente fijadas en paraformaldehído al 4% (p/v) en PBS, en un equipo Vibratomo1000 (Formely Lancer).

Tras colocar la cuchilla de acero en la posición correcta y llenar el compartimento del equipo con agua destilada, la muestra se fijó directamente, mediante un pegamento de contacto a un bloque portamuestras, y se colocó sobre la plataforma elevadora del equipo, de manera que tanto la cuchilla de acero, como la muestra quedasen sumergidas en agua en todo momento.

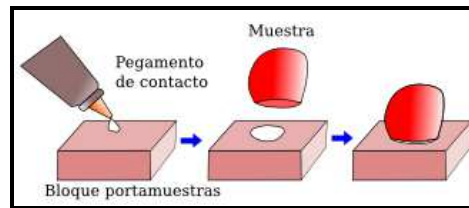


Figura 3.2. Pegado de la muestra al bloque portamuestras.

Se ajustó el grosor y la velocidad de avance deseada y se procedió al avance de la cuchilla sobre la muestra. Al mismo tiempo que la cuchilla avanza sobre la muestra, presenta un movimiento de vibración lateral que facilita el corte y evita arrastrar el tejido.

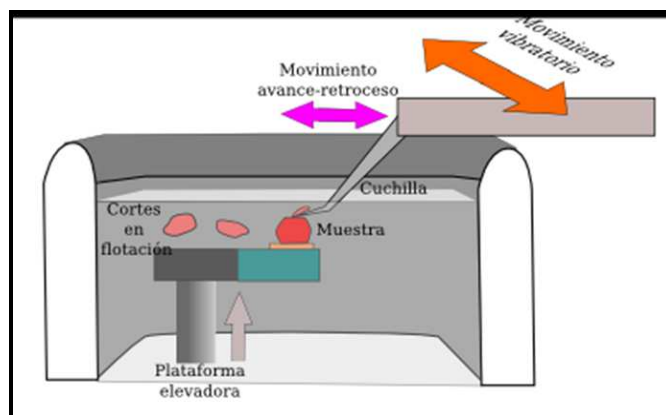


Figura 3.3. Vista lateral de un equipo vibratomo.

Tras obtener los cortes en flotación, éstos se recogieron con ayuda de un pincel para no dañarlos y se depositaron sobre un portaobjetos multipocillo previamente recubierto con 3-APTES (apartado 3.3.2).

Finalmente, los cortes se dejaron secar al aire protegidos del polvo y se almacenaron a -20°C hasta su momento de uso.

3.3.4 Obtención de cortes ultrafinos

3.3.4.1 Tallado

Una vez localizada la zona de interés, tras la observación del corte semifino al microscopio óptico, se delimitó una región trapezoidal de aproximadamente 1mm^2 de área para la posterior obtención de cortes ultrafinos.

Esta operación se realizó de forma manual con la ayuda de una cuchilla de acero.

3.3.4.2 Recubrimiento de rejillas

Las rejillas empleadas para la recolección de los cortes ultrafinos, se recubrieron con una película de Formvar (TAAB) para facilitar su adhesión y estabilidad en la manipulación posterior. Para las detecciones *in situ*, se utilizaron rejillas de níquel de 75 mesh.

Se preparó una solución Formvar 1% (p/v) en cloroformo (Merck), con la que se recubrieron portaobjetos de 76x26 mm nuevos. Para este proceso se empleó un dispositivo especial que consiste en un recipiente cilíndrico de diámetro ligeramente superior a la anchura del portaobjetos, con una llave que permite el paso del líquido a una velocidad constante.

Después de lavar el embudo con cloroformo puro, se rellenó con la solución de Formvar 1% preparada en la que se sumergió el portaobjetos. A continuación, se abrió la llave del dispositivo para permitir el paso de la solución de Formvar.

Tras este proceso, el portaobjetos debe presentar una fina película de Formvar sin desperfectos.

Una vez seco, se procedió a separar la película adherida al porta. Para ello, se realizaron cortes paralelos a los bordes del portaobjetos y se sumergió en posición vertical y muy lentamente, en un recipiente con agua bidestilada. De esta manera, la película transparente de Formvar quedó flotando en la superficie del agua.

Finalmente, las rejillas en la película de Formvar, se recogieron en un papel Whatman nuevo, que se conservó en una placa Petri protegido del polvo.

3.3.4.3 Obtención de cortes ultrafinos

La pieza, una vez tallada, se ajustó al cabezal del ultramicrotomo “Ultracut E” (Reichert) para ser cortada. Se empleó una cuchilla de diamante (Diatome), que consta de una balsa que se llena con agua bidestilada en la que flotan los cortes a medida que se desprenden del filo.

Después de orientar la superficie de corte de forma que quedara paralela al filo de la cuchilla, se seleccionó un espesor de corte de 80-90 nm y se aproximó la cuchilla a la pieza. Para muestras embebidas en Lowicryl, se emplearon velocidades de corte de 1 mm/s, ajustando el selector de la velocidad de retroceso a 2mm/s. Las secciones obtenidas se seleccionaron por su espesor, indicado por el color de interferencia que presentan, siendo las secciones óptimas aquellas de color plateado, las cuales se recogieron sobre la cara mate de rejillas recubiertas.

3.3.4.4 Tinción de cortes ultrafinos con acetato de uranilo y citrato de plomo.

- Preparación de la solución de acetato de uranilo:

Se preparó una solución de acetato de uranilo (Merck) al 5% (p/v) en agua destilada, se filtró y se almacenó a 4°C protegida de la luz para evitar la formación de precipitados. En el momento de uso, se centrifugó a máxima revolución durante 5 min, para evitar la posible presencia de cristales.

- Preparación de la solución de citrato de plomo:

Se preparó una solución de citrato de plomo según el método de Reynolds (Reynolds, 1963) a partir de dos soluciones stock de nitrato de plomo 1M y citrato trisódico 1M, y de una solución de NaOH 1M, preparada en el momento, con agua recién hervida a fin de evaporar la mayor cantidad posible de gases disueltos en ella.

Se añadió 3 ml de la solución stock de nitrato de plomo 1M a 16 ml de agua destilada recién hervida. A continuación, se agitó la mezcla y se añadió 2 ml de la solución stock de citrato trisódico 1M, formándose un precipitado denso. Se agitó hasta la completa disolución del precipitado y se añadió 4 ml de la solución de

NaOH 1M poco a poco, y en agitación continua, hasta que la solución se tornó completamente cristalina.

Por último, se añadió un chorro de parafina líquida a la solución resultante para mantenerla aislada del contacto con el aire.

Esta solución puede mantenerse a temperatura ambiente.

- Tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo

Las rejillas con los cortes de Lowicryl se hicieron flotar durante 25 min sobre gotas de acetato de uranilo de aproximadamente 10 μ l, dispuestas sobre una lámina de Parafilm, protegidas de la luz. Transcurrido este tiempo, las rejillas se lavaron durante 1 min con abundante agua bidestilada, mediante el empleo de un frasco lavador. Se dejaron secar en estufa a 37°C durante al menos 10 min. A continuación, los cortes se tiñeron con citrato de plomo durante 5 seg. El citrato de plomo se recogió con una pipeta Pasteur de punta larga con la que se atravesó la capa de parafina del tubo que contenía la solución de citrato de plomo. Tras romper la punta para eliminar los restos de parafina, se depositó la gota de la solución de tinción sobre una lámina de Parafilm colocada dentro de una placa Petri con varias pastillas de NaOH para evitar la precipitación del plomo.

Finalmente, las rejillas se lavaron y secaron de la misma forma que tras la tinción con acetato de uranilo.

3.3.5 Criotécnicas

3.3.5.1 Crioinclusión en Lowicryl K4M tras deshidratación por PLT

Lowicryl K4M es una resina hidrofílica de naturaleza acrílica, de forma que la superficie del corte ultrafino que se obtiene es muy rugosa, dejando un mayor número de epítomos accesibles para la reacción con anticuerpos.

Esta resina necesita irradiación ultravioleta (UV) y ausencia de oxígeno, para su polimerización a -30°C.

La deshidratación mediante el método PLT (Progressive Low Temperature) , la infiltración y la posterior polimerización, se realizaron en el sistema AFS (Leica,

Viena) que permitió el procesado completo de la muestra bajo condiciones de temperatura y tiempo programables y controlables en todo el momento.

El método PLT consiste en una disminución de forma progresiva y controlada de la temperatura de la muestra, hasta alcanzar la temperatura de -30°C , necesaria para la polimerización del Lowicryl, lo cual conlleva una mejora de la ultraestructura al mismo tiempo que se preserva la reactividad antigénica de la muestra, frente al procesado normal para la inclusión en Lowicryl.

3.3.5.1.1 Fijación

La fijación se llevó a cabo en una solución de paraformaldehído 4% (p/v) en tampón PBS. (Ver apartado 3.3.1.1)

3.3.5.1.2 Inclusión en gelatina.

Las muestras de microsporas aisladas se embebieron en gelatina al 15% (p/v) en tampón PBS, de forma análoga a la descrita en el apartado 3.3.1.2.

3.3.5.1.3 Deshidratación por el método PLT

Antes de comenzar con el proceso de PLT, se llenó el tanque del equipo AFS con nitrógeno líquido y se esperó a que éste alcanzase la temperatura de 0°C . Se prepararon los contenedores de las muestras con las cápsulas de plástico especiales para AFS (13mm de diámetro y 18mm de altura) caracterizadas por tener una serie de perforaciones en su base que permiten el intercambio de fluidos entre su interior y el recipiente que las contiene, donde se añadieron las diferentes mezclas.

A continuación, las muestras se lavaron con tampón PBS (3 lavados de 10 min cada uno) y se introdujeron en el fondo de las cápsulas, donde permanecieron durante todo el proceso deshidratación, infiltración e incluso polimerización.

La deshidratación se llevó a cabo mediante la incubación con soluciones de metanol de concentración creciente (30, 50, 70, 100%) (v/v) preparadas en agua. El proceso comenzó a 0°C y finalizó a -30°C , mediante una sucesión de rampas de descenso de temperaturas y mesetas en las que la muestra se deshidrató.

Los tiempos y temperaturas de deshidratación se detallan en la tabla 3.

	Temperatura	Tiempo
Metanol 30%	0 °C	30 min
Metanol 50%	-15 °C	30 min
Metanol 70%	-30 °C	30 min
Metanol 100%	-30 °C	30 min
Metanol 100%	-30 °C	30 min
Metanol 100%	-30 °C	30 min

Tabla 3. Protocolo de deshidratación

3.3.5.1.4 Infiltración

Las muestras deshidratadas, se infiltraron en la resina Lowicryl K4M (TAAB). Esta resina se preparó a partir de tres componentes que se mezclaron en la siguiente proporción: 2,7gr de crosslinker, 17,3gr de monómero B y 0,1gr de iniciador (benzoín etileter). Esta mezcla se preparó en campana de extracción con protección de guantes y mascarilla, ya que los vapores de Lowicryl son muy tóxicos y el contacto con la piel puede provocar alergia a largo plazo.

La infiltración también se llevó a cabo en el sistema AFS, bajo una temperatura controlada y constante en todo momento, con las combinaciones indicadas en la tabla 4.

	Temperatura	Tiempo
Metanol 100% : Lowicryl (1:1)	-30 °C	60 min
Metanol 100% : Lowicryl (1:2)	-30 °C	60 min
Lowicryl K4M	-30 °C	60 min
Lowicryl K4M	-30 °C	18 h
Lowicryl K4M	-30 °C	24 h

Tabla 4. Protocolo de infiltración.

3.3.5.1.5 Encapsulado y polimerización

Para el encapsulado, las muestras en las cápsulas perforadas se introdujeron a su vez en otras cápsulas convencionales de gelatina (Agar Scientific, tamaño num.4),

para evitar la pérdida de resina durante las primeras horas del proceso de polimerización. Tras orientar correctamente las muestras, las cápsulas se rellenaron completamente con resina Lowicryl recién preparada. Finalmente, las cápsulas se mantuvieron tapadas y en recipientes en los que la base de las cápsulas estuvo en contacto con etanol 96°, para favorecer la disipación del calor producido por la reacción exotérmica de polimerización.

El proceso se inició a -30°C y tras un incremento lento y progresivo de la temperatura, se finalizó a 22°C (Tabla 5). La polimerización se completó después de 92 h, durante las cuales se conectó la lámpara del equipo AFS para el suministro de la luz UV necesaria para la correcta polimerización.

Temperatura Inicio	Temperatura Final	Tiempo (h)
-30 °C	-30 °C	62 h
-30 °C	22°C	6 h
22 °C	22°C	24 h

Tabla 5. Protocolo de polimerización.

3.3.5.2 Obtención de criocortes

3.3.5.2.1 Crioprotección en sacarosa

Se partió de muestras fijadas en paraformaldehído al 4% (p/v) en PBS y en los casos necesarios, preincluidas en gelatina al 15% (p/v) en PBS (Apartado 3.3.1) y troceadas en bloques de aproximadamente 1 mm de lado.

Tras realizar tres lavados en tampón PBS de 10 min cada uno, se procedió a la crioprotección de las muestras mediante su incubación en soluciones de sacarosa de concentraciones crecientes, empezando por una concentración de sacarosa 0,1M hasta llegar a una concentración máxima de 2,3 M, tal y como se describe en la tabla 6.

Sacarosa (M)	Tiempo (min)
Sacarosa 0,1 M	60
Sacarosa 0,5 M	60
Sacarosa 1 M	60
Sacarosa 1,5 M	60
Sacarosa 2 M	60
Sacarosa 2,3 M	60

Tabla 6. Protocolo de crioprotección.

Las incubaciones en sacarosa 2 y 2,3 M se realizaron en agitación en un agitador rotacional para facilitar la penetración del crioprotector.

Todos los pasos se realizaron a 4°C.

Al finalizar la proceso, las muestras bien crioprotegidas, aparecieron hundidas en el fondo del tubo.

3.3.5.2.2 Criofijación por inmersión en propano líquido

La criofijación supone una congelación muy rápida de la muestra biológica de forma que se paralice la dinámica y el metabolismo celular, fijando las estructuras a través de un agente físico, como es el frío. En una buena criofijación, el agua debe congelarse en estado amorfo, es decir, debe “vitrificar”, nunca cristalizar, para ello, la velocidad de congelación debe ser muy rápida (miles de grados centígrados por segundo).

El propano líquido presenta importantes ventajas como agente criogénico, por tratarse de un gas con un punto de fusión muy bajo y una alta conductividad y capacidad térmica, lo cual se traduce en un menor tiempo de vitrificación de la muestra introducida, y por lo tanto una mejor preservación de la estructura de la muestra.

La criofijación se llevó a cabo en la unidad Reichert KF80 (Cambridge Instruments), mediante el uso de propano líquido a una temperatura de -170°C, mantenida mediante nitrógeno líquido. Las muestras crioprotegidas se colocaron en la cabeza de un clavo ("pin"), con un poco de sacarosa 2,3 M, para favorecer su

adherencia, y se orientaron de forma correcta bajo la lupa del equipo. El clavo se colocó en el disparador de la unidad KF80, que a su vez se colocó encima del depósito de propano. A continuación, se disparó el clavo con la muestra a gran velocidad dentro del recipiente de propano líquido, con lo que la muestra quedó fijada instantáneamente. Los "pins" con las muestras, tras desmontarlos del disparador, se conservaron en un "deward" en nitrógeno líquido a -196°C hasta el momento de uso.

3.3.5.2.3 Obtención de los criocortes semifinos

La obtención de criocortes semifinos se llevó a cabo en un ultramicrotomo Ultracut E (Reichert) al que previamente se le acopló una criocámara FC 4.

La unidad FC 4 se conectó con 30 min de antelación para que tanto cámara como brazo y cuchilla estuvieran estabilizados a -75°C en el momento de comenzar a cortar.

Se emplearon cuchillas de vidrio especialmente seleccionadas para criocortes, fabricadas en un equipo "knifemaker" (LKB). Los pins con las muestras previamente criofijadas y conservadas en nitrógeno líquido, se ajustaron al cabezal de la criocámara. Se aproximó manualmente la cuchilla a la pieza y una vez alcanzado el tejido, se cambió a modo de avance automático. Se seleccionó un espesor de $1\ \mu\text{m}$, una velocidad de corte de 1mm/s y el selector de velocidad de retroceso se ajustó al 3, para evitar al máximo el calentamiento de la muestra. La calidad de los cortes obtenidos se evaluó por su transparencia, rechazándose los de aspecto opaco y blanquecino.

Tras obtener varios criocortes, éstos se recogieron mediante un asa metálica con una gota de sacarosa 2,3 M. Esta operación se realizó rápidamente para evitar la congelación de la sacarosa. Los cortes recogidos, se depositaron en portaobjetos multipocillo (ICN) previamente recubiertos con APTES tal y como se explicó en el apartado 3.3.2.

Finalmente, los portaobjetos preparados se introdujeron en placas de Petri, selladas con Parafilm y se conservaron a -20°C para favorecer la adhesión de los cortes, hasta el momento de uso.

3.3.5.2.4 Obtención de criocortes en criostato

El criostato (Leica CM 1800) permitió la obtención de secciones de 20 a 50 μm , aproximadamente de muestras previamente fijadas en paraformaldehído al 4% (p/v) y crioprotegidas en sacarosa (Apartado 3.3.5.2.1).

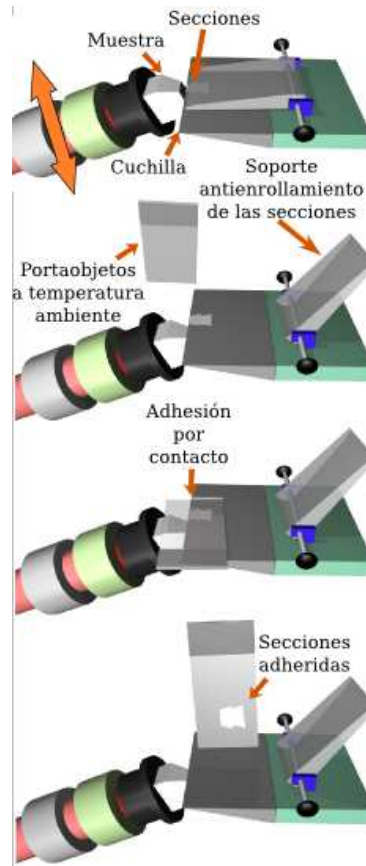
Antes de proceder al corte en criostato, la muestra se encastró en bloques de OCT (*“Optimal Cutting Temperature”*) medio que contiene entre otros, alcohol polivinílico 12,24 % (v/v) y polietilen-glicol 4,26 % (v/v) y que solidifica cuando se congela.

Para preparar estos bloques, se hicieron moldes con nieve carbónica sobre papel de aluminio, a los que se les añadió OCT y a continuación, la muestra se introdujo en el molde cuando el OCT empezó a congelarse, para poder así orientarla y evitar que se hundiese.

Finalmente, la muestra quedó en un bloque sólido encastrado, pero no incluido, que facilitó su manipulación. Los bloques preparados se almacenaron a -20°C hasta el momento de uso.

El corte se llevó a cabo a -28°C , gracias a la cámara refrigerada que posee el criostato. Se seleccionó el espesor de corte deseado, se colocó el bloque en el soporte portamuestras del criostato y se inició el proceso de corte.

Las secciones que se van obteniendo se adhieren por contacto a un portaobjetos. (Figura 3.4). A continuación, se eliminó el OCT de los cortes con agua y se depositaron sobre un porta multipocillo previamente recubierto con 3-APTES (Apartado 3.3.2). Finalmente, los cortes se conservaron a -20°C durante al menos una noche, para favorecer la permeabilización y su conservación hasta su utilización.



3.4. Criostato. Recogida de cortes obtenidos.

3.3.6 Técnicas citoquímicas

3.3.6.1 Tinciones citoquímicas para microscopía óptica

Estas citoquímicas se realizaron sobre cortes semifinos de $1\mu\text{m}$ de Histoiresin Plus y Lowicryl K4M.

3.3.6.1.1 Citoquímica con Azul de Toluidina

Los cortes semifinos obtenidos se tiñeron con una solución de Azul de Toluidina al 0,075% (p/v) en agua destilada conservada a temperatura ambiente.

El proceso de tinción, se llevó a cabo mediante la incubación de los cortes con una gota de la solución previamente filtrada, durante 1 min para los cortes de Histoiresin y 5 min para los de Lowicryl.

Transcurrido este tiempo, se realizaron varios lavados con agua destilada para retirar el exceso de colorante y se dejaron secar protegidos del polvo. Finalmente, una vez que los cortes estuvieron completamente secos, se procedió a su montaje de forma permanente con “Eukitt” (Kindler GmbH & Co) y se observó en campo claro, en un microscopio óptico Carl Zeiss 68105 acoplado a una cámara Digital Leica DFC 420C.

3.3.6.1.2 Citoquímica para almidón

Para la detección del almidón, se utilizó la citoquímica del yodo/ yoduro potásico (I_2KI). Este reactivo tiñe al acumularse el yodo en el eje de la molécula de almidón. Los depósitos de almidón presentan una coloración azul o negra si las moléculas son grandes y roja o púrpura si el polímero es pequeño, indicando su reciente formación.

La solución de tinción I_2KI se preparó a partir de 2 gr de KI y 0,2 gr de I en 100 ml de agua destilada. A continuación se filtró y se conservó a temperatura ambiente.

El proceso de tinción se realizó mediante la incubación durante 10 min de una gota de la solución final sobre los cortes de Historesin y Lowicryl. A continuación, se realizaron varios lavados con agua destilada y tras el secado de los cortes se realizó el montaje de la preparación con “Eukitt” y se observó en campo claro, en un microscopio óptico Carl Zeiss 68105 acoplado a una cámara Digital Leica DFC 420C.

3.3.6.1.3 Citoquímica con DAPI

4',6'-diamina-2-phenylindole es un colorante fluorescente que tiñe específicamente el DNA, de manera que permite la visualización de los núcleos.

El proceso de tinción se llevó a cabo, mediante la incubación de los cortes preparados con la solución de tinción de DAPI (Apartado 3.2.4.1) durante 5 min en oscuridad. Seguidamente las preparaciones se montaron de forma semipermanente, con un medio de montaje miscible en agua, “Mowiol[®]4-88” (Sigma-Aldrich) y se observaron bajo luz UV en un microscopio óptico de

fluorescencia Zeiss Axioplan acoplado a una cámara CCD Digital Leica DFC 350 FX.

3.3.6.1.4 Citoquímica con Calcofluor White

Calcoflúor White es un fluorocromo que se une a la celulosa presente en las paredes celulares. Se excita al recibir luz de 372 nm de longitud de onda y emite fluorescencia azul.

Se preparó una solución stock de Calcofluor White a una concentración de 3,5 mg/ml en agua destilada y pH 10-11. Esta solución se filtró y se conservó a -20°C protegida de la luz. La solución de tinción se preparó a partir de una dilución 1:100 de la solución stock anterior, en tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5. La solución de tinción se almacenó a 4°C, igualmente protegida de la luz.

Los cortes obtenidos se incubaron con la solución de tinción durante 20 min en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se lavaron varias veces con agua destilada y tras secarse completamente, se procedió al montaje con “Eukitt”.

Finalmente, las preparaciones se observaron bajo luz UV en un microscopio óptico de fluorescencia, Zeiss Axioplan acoplado a una cámara CCD Digital Leica DFC 350 FX.

3.3.6.2 Citoquímicas ultraestructurales

Estas técnicas se llevaron a cabo en muestras fijadas en paraformaldehído 4% e incluidas en Lowicryl K4M, para mejorar el contraste de las estructuras nucleares en ensayos de inmunomarcados con oro.

3.3.6.2.1 Método de Metilación-Acetilación (MA) para ácidos nucleicos

(Testillano y col. 1995a)

Esta citoquímica se realizó en bloque, es decir, antes de la inclusión de las muestras en Lowicryl K4M. Se partió de muestras fijadas en paraformaldehído 4% y deshidratadas según los procedimientos descritos en el apartado 3.3.5.1.3.

Las muestras se trataron con una mezcla de anhídrido acético (5:1; v/v) durante una noche a temperatura ambiente. La solución de anhídrido acético (Merck) se conserva a 4°C y sellado con Parafilm, por ser altamente higroscópico, pero se debe sacar de la nevera unas horas antes de su uso para que se atempere. A continuación, se realizaron tres lavados a 4°C, de 30 min cada uno, con metanol al 100%. A partir de aquí, se continuó con el protocolo de procesado por PLT en el último paso de incubación con metanol al 100% a -30°C, para su posterior inclusión en Lowicryl K4M (Apartado 3.3.5.1.3).

Finalmente, los cortes se observaron en microscopio electrónico Jeol 1200 a 80 kV.

3.3.6.2.2 Tinción regresiva de EDTA para RNPs (Benhard 1969a)

Se preparó una solución stock 0.2 M de la sal disódica del ácido etilendiamino tetracético (EDTA, Normapur, Prolabo) en agua y se ajustó el pH a 7, lenta y cuidadosamente. Al alcanzar el pH 7, la solución debe quedar completamente cristalina. Esta solución es estable durante varios meses a temperatura ambiente. La solución de tinción se empleó diluida a 0,02 M.

Las rejillas con los cortes de Lowicryl previamente teñidas con acetato de uranilo 5% y secadas en estufa a 37°C, se depositaron durante 30 s sobre gotas de la de la solución de trabajo de EDTA, previamente dispuestas sobre una lámina de Parafilm.

A continuación, las rejillas se lavaron con abundante agua destilada y se dejaron secar en estufa 37°C.

Finalmente, los cortes se observaron en microscopio electrónico de transmisión Jeol 1200 a 80 kV.

3.3.7 Detección de muerte celular con Azul de Evans

Azul de Evans es un colorante impermeable, que sólo penetra en las células que tienen dañada la membrana, de manera que se emplea como marcador de muerte celular.

El proceso de tinción se llevó a cabo a partir de una solución de "Evan's blue" al 0,25 % (p/v) en agua destilada, según el método descrito por Romero-Puertas (Romero-Puertas, et al., 2004) y col., (2004a). Las muestras se incubaron con la solución preparada durante 5 h a 4°C. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min en una centrífuga de mesa y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en agua destilada y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones. Este paso de lavado, se repitió hasta que se observó de una coloración transparente.

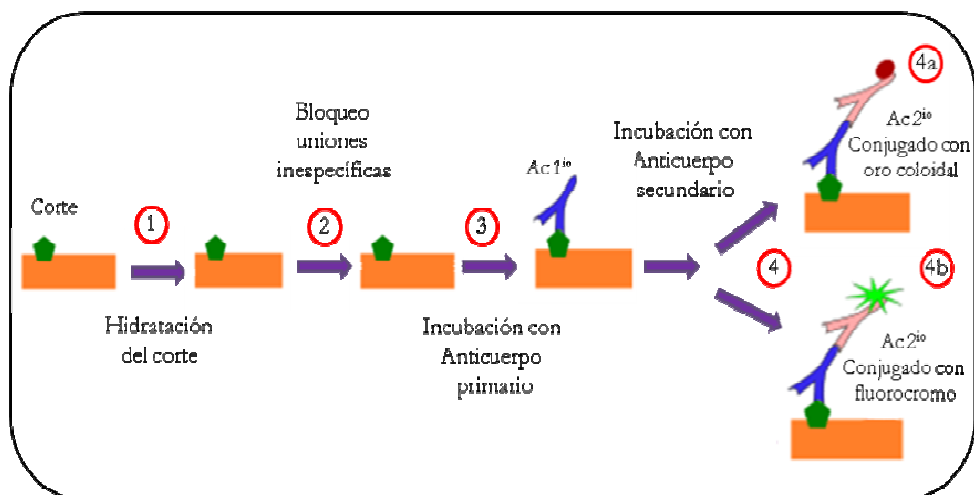
Tras el último lavado, el sedimento se resuspendió en 50 µl de agua destilada y se añadió sobre un portaobjetos. Tras colocar el cubreobjetos sobre la preparación, se observó en campo claro, en un microscopio óptico Carl Zeiss 68105 acoplado a una cámara Digital Leica DFC 420C.

3.4 INMUNOCITOQUÍMICAS

3.4.1 Inmunocitoquímicas a nivel de microscopia óptica

Todas las inmunocitoquímicas se realizaron sobre cortes de diferente grosor, depositados sobre portaobjetos multipocillo previamente recubiertos con APTES para asegurar la adhesión de los cortes durante todo el experimento (Apartado 3.3.2)

Se llevó a cabo, siguiendo los pasos que se detalla en la figura 3.5.



3.5. Esquema general de la reacción inmunocitoquímica

3.4.1.1 Inmunomarcado con oro coloidal y amplificación con plata

Para este tipo de inmunocitoquímicas se emplearon los anticuerpos anti-JIM5 y anti-JIM7 frente a pectinas no esterificadas y pectinas altamente esterificadas respectivamente (Tabla 7).

Anticuerpo	Tipo	Características inmunológicas	Antígeno	Dilución	Referencia
JIM5	Rata	Monoclonal	Pectinas esterificadas	Puro	Knox J.P, 1997
JIM7	Rata	Monoclonal	Pectinas no esterificadas	Puro	Knox J.P, 1997

Tabla 7. Condiciones de los Anticuerpos primarios para M.O.

Las muestras se lavaron tres veces con PBS, durante 5 min cada vez y a continuación se incubaron con albúmina de suero bovino (BSA) al 5 % (p/v) durante 5 min, para bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo. Seguidamente, se incubaron en una cámara húmeda, durante 60 min con los anticuerpos primarios (Tabla 7). Tras tres lavados con BSA al 1%, de 5 min cada uno, los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario Anti-Rata- IgG marcado

con oro de 10 nm y diluido 1/25 en PBS, durante 45 min en cámara húmeda. Tras realizar tres lavados de 5 min con PBS, se procedió al revelado de la reacción.

La amplificación de la señal se llevó a cabo con un kit de amplificación con plata (British BioCell, Cardiff, UK) incubando los cortes con una mezcla a partes iguales de los dos componentes del kit. La reacción se siguió en el microscopio óptico bajo campo claro y se paró con agua en el momento de observar la formación de un precipitado denso sobre el tejido.

Finalmente, una vez que los cortes estuvieron completamente secos, se procedió al montaje con Eukitt, de forma permanente.

Los controles se realizaron bajo las mismas condiciones, sustituyendo el primer anticuerpo por PBS.

Las preparaciones se observaron en un microscopio Zeiss Axioplan con objetivos de contraste de fase y campo claro.

3.4.1.2 Inmunofluorescencia.

Las inmunofluorescencias se realizaron sobre secciones obtenidas por los diferentes métodos de corte explicados en los apartados anteriores. Según los requerimientos de cada momento.

Se empleó el mismo protocolo general en todos los casos, incluyendo modificaciones específicas según el tipo de corte.

Los anticuerpos primarios empleados se muestran en la tabla 8.

Anticuerpo	Tipo	Características inmunológicas	Antígeno	Dilución	Referencia
Anti-RNA	ratón	Monoclonal	RNA total celular	puro	Eilat D et al. 1991
Anti-5mdC	ratón	Monoclonal	5mdC	1/50	Eurogentec
JIM 5	rata	Monoclonal	Pectinas no esterificadas	puro	Knox J.P, 1997
JIM7	rata	Monoclonal	Pectinas esterificadas	puro	Knox J.P, 1997
Anti-caspasa 3	conejo	Monoclonal	Caspasa 3 activa	1/5	Cell signalling

Tabla 8. Anticuerpos primarios empleados en citoquímicas para MO.

Los anticuerpos secundarios empleados en todos los casos fueron Alexa 488 (Invitrogen) frente a diferentes especies, según la naturaleza de los anticuerpos primarios. Las condiciones de incubación de los anticuerpos secundarios se reflejan en la tabla 9.

Anticuerpo	Dilución	Tiempo	Temperatura	Referencia
Alexa 488 Anti-ratón	1/25	1h	Ta	Invitrogen
Alexa 488 Anti-rata	1/25	1h	Ta	Invitrogen
Alexa 488 Anti-conejo	1/25	1h	Ta	Invitrogen

Tabla 9. Anticuerpos secundarios empleados en inmunofluorescencias para MO.

1. Inmunofluorescencia sobre cortes semifinos de Historesin:

Las muestras se lavaron tres veces con PBS, durante 5 min cada vez y a continuación se incubaron con albúmina de suero bovino (BSA) al 5 % (p/v) en tampón PBS, durante 5 min, para bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo. Seguidamente, se incubaron en una cámara húmeda, durante 60 min con los anticuerpos primarios (Tabla 8). Tras tres lavados con BSA al 1%, de 5 min cada uno, los cortes se incubaron durante 45 min, con el anticuerpo secundario apropiado, en cada caso, protegidos de la luz. Tras realizar tres lavados de 5 min con PBS, los cortes se incubaron con la solución de trabajo de DAPI durante 5 min. Finalmente, se lavaron 3 veces de 5 min con agua destilada y se montó con “Mowiol[®]4-88” para su observación de en el Microscopio Laser Confocal espectral (CLSM) Leica TCS SP5.

Todo el proceso se realizó a TA. Las condiciones de incubación de los anticuerpos primarios se reflejan en la tabla 8.

2. Inmunofluorescencia sobre criocortes semifinos

La inmunofluorescencia se realizó sobre criocortes semifinos de 1 μ m almacenados a -20°C adheridos a portaobjetos recubiertos con APTES (Apartado 3.3.2.)

En este caso, los portaobjetos con las muestras se sacaron unos minutos antes de comenzar el proceso para que se atemperasen.

A continuación, se lavaron intensamente con agua destilada, para eliminar completamente los restos de sacarosa 2,3 M.

La reacción de inmunofluorescencia se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito para cortes semifinos de Historesin, sustituyendo la solución de bloqueo convencional, BSA al 5%, por un agente bloqueante más poderoso como es el suero fetal bovino (FCS) al 10% (p/v) en tampón PBS. Así mismo, las diluciones de los anticuerpos primarios se realizaron en FCS al 5%, en vez de BSA al 1%.

3. Inmunofluorescencia sobre cortes de vibratomo y cortes de criostato

Los cortes obtenidos en vibratomo y criostato son de 30-50 μm de grosor, por lo que se permeabilizaron para facilitar la penetración del anticuerpo.

La permeabilización consistió en someter a la muestra a un proceso de deshidratación-rehidratación, seguido de incubaciones con enzimas de digestión de determinados componentes de la pared celular tal. La deshidratación se consiguió mediante la incubación de 5 min en soluciones de metanol de concentración creciente (30, 50, 70 y 100%) (v/v) preparadas en agua destilada. A continuación, se procedió a la rehidratación de la muestra mediante incubaciones de 5min en soluciones de metanol de concentración decreciente (100, 70, 50, 30%) Tras lavar con PBS durante 5 min, las muestras se incubaron con celulasa al 2% (p/v) en PBS, durante 40-60 min en cámara húmeda, para evitar su evaporación.

Transcurrido este tiempo, se realizaron tres lavados con PBS de 5 min cada uno y se continuó con el protocolo de la inmunocitoquímica convencional (Apartado 3.4.1).

Es importante destacar que todas las incubaciones con anticuerpos se realizaron en cámara húmeda para evitar su evaporación.

A partir de la incubación con el anticuerpo secundario, los siguientes pasos transcurrieron en oscuridad.

Los controles se realizaron bajo las mismas condiciones, sustituyendo el anticuerpo primario por PBS, excepto en el caso de los anticuerpos anti-5mdC y anti-caspasa 3, en los cuales, los controles negativos se realizaron empleando un péptido bloqueante del anticuerpo.

Finalmente, las preparaciones se montaron de forma semipermanente con “Mowiol® 4-88”, para su observación de en el Microscopio Laser Confocal espectral (CLSM) Leica TCS SP5.

3.4.2 Inmunomarcado con oro coloidal e hibridación *in situ* para microscopía electrónica.

Para los estudios de transcripción y muerte celular programada se emplearon una serie de anticuerpos específicos cedidos por el laboratorio del Dr. Marco Biggiogera (Tabla 10).

Anticuerpo	Tipo	Características inmunológicas	Antígeno	Dilución	Referencia
Anti-RNasa A	Conejo	Policlonal	Proteína RNasa A	1/200	Chemicon
Anti-Híbrido	Conejo	Policlonal	Híbridos DNA:RNA	1/200	Testillano et al., 1994
Anti-CstF	Pollo	Policlonal	Factor de estimulación del corte	1/400	CardinaleC et al., 2007

Tabla 10. Anticuerpos primarios empleados en inmunomarcados para MET.

La inmunolocalización se realizó sobre cortes ultrafinos de Lowicryl K4M, recogidos en rejillas de níquel de 75 mesh. La reacción se llevó a cabo flotando las rejillas sucesivamente en gotas de las diferentes soluciones utilizadas, sobre una lámina de Parafilm dispuesta en una caja perfectamente limpia.

Se comenzó con una incubación de 3 min con "Normal Goat Serum"(NGS) al 1% (p/v) en tampón PBS, para bloquear las uniones inespecíficas.

A continuación, se procedió a la incubación de los cortes ultrafinos con los anticuerpos primarios (Tabla 10) durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda para evitar su evaporación. Las diluciones de los anticuerpos se realizaron en una solución de BSA 0.1% (p/v) Tween 0,05% (p/v) en PBS.

Transcurrido este tiempo, se realizaron dos lavados de 5 min cada uno, con tampón PBS-Tween, seguido de otros dos lavados de 5 min con PBS.

A continuación, las rejillas se flotaron sobre gotas de NGS al 1% durante 3 min y se procedió a su incubación con los anticuerpos secundarios correspondientes (Tabla 11) durante 30 min en cámara húmeda y a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios se diluyeron en tampón PBS.

Anticuerpo	Dilución	Tiempo	Temperatura	Referencia
IgG Anti-pollo	1/20	30 min	Ta	Gold-AffiPure Donkey Anti-Chicken. (Jackson Inmuno Research)
IgG Anti-conejo	1/10	30 min	Ta	Gold-AffiPure Goat Anti-Rabbit. (Jackson Inmuno Research)

Tabla 11. Anticuerpos secundarios conjugados con oro coloidal de 12 nm

Finalizada la incubación con los anticuerpos secundarios, se hicieron dos lavados de 5 min con PBS, seguidos de dos lavados de 5 min con agua destilada.

Tras dejar secar las rejillas completamente se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo (Apartado 3.3.4.4).

Finalmente, se observaron en microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM900 a 80kV.

En todos los casos los inmunomarcados con oro se combinaron con la citoquímica MA realizada en bloque (Apartado 3.3.6.2.1). Así como, ocasionalmente, también se combinaron con la tinción regresiva de EDTA (Apartado 3.3.6.2.2).

3.4.2.1 Análisis cuantitativo del marcado ultraestructural

Se determinó la densidad de partículas de oro por μm^2 sobre cada uno de los compartimentos de estudio así como fuera de estos, como referencia del ruido de fondo de la reacción.

El muestreo se realizó para cada una de las etapas del desarrollo gametofítico, sobre un número mínimo de fotografías tomadas al azar a lo largo de distintos cortes de cada rejilla. El número mínimo de fotografías se determinó mediante el “Test de la media progresiva” (Williams, 1977) tomando unos límites de confianza del 5%.

Se contó el número de partículas de oro presentes en cada una de las zona de estudio, y se midió el área conteniente utilizando una plantilla cuadrículada compuesta por 165 cuadrados de 15 mm de lado, con lo que se calculó la densidad de las partículas media para cada etapa y se compararon una a una frente a los valores obtenidos para anteras en fase de microspora joven mediante una prueba de la “t de Student” para un nivel significación máximo de 0,05.

La conversión de los puntos de cuadrículas en áreas (μm^2), los cálculos de las densidades de partículas y densidades medias para cada etapa, los test de la media progresiva, las pruebas de la “t de Student” y las representaciones graficas se realizaron sobre una hoja de cálculo Microsoft Excel 2007.

Se determinó la densidad de partículas de oro por μm^2 sobre citoplasma, núcleo, y en conjunto sobre vacuolas, paredes, vesículas y depósitos de almidón, tomando éste último como referencia del ruido de fondo de la reacción.

3.5 CUANTIFICACIÓN DEL PORCENTAJE DE METILACIÓN GLOBAL DEL DNA GENÓMICO

3.5.1 Preparación del material vegetal

Para este ensayo se emplearon muestras de anteras de *Nicotiana tabacum* y *Brassica napus*, microsporas aisladas de anteras de ambas especies y muestras de cultivo de microsporas de *B. napus* a diferentes tiempos. Así mismo, también se empleó como sistema control del ensayo, meristemos de *Allium cepa*, procedentes de raíces tratadas con una solución salina (NaCl 500 mM) durante 3 h y meristemos de raíces sin tratar (Apartado 3.1.3)

Para los extractos de anteras, se diseccionaron yemas florales de tamaños correspondientes a anteras en fase de microspora joven (2 mm), anteras en fase de microspora vacuolada (3,4 mm) y anteras en fase de polen bicelular maduro (4 mm). Se extrajeron las anteras y tras ser lavadas con PBS, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron en microtubos Eppendorf (1,5 ml) a -80°C hasta el momento de uso.

El aislamiento de microsporas se realizó a partir de anteras de cada una de las fases mencionadas, según el protocolo descrito en el apartado 3.2.3. Tras realizar el último lavado, se descartó el sobrenadante y se congelaron en un baño de nitrógeno líquido. Finalmente, se almacenaron a -80°C.

Las muestras de cultivos de polen se obtuvieron tal y como se explicó en el apartado 3.2.5.

3.5.2 Extracción del DNA genómico

El aislamiento de DNA genómico se llevó a cabo mediante el empleo del kit “DNeasy Plant Minikit” de la casa comercial Qiagen.

En cada caso, se partió de 100 mg de peso de material previamente congelado y se realizaron tres o más repeticiones por experimento.

Antes de proceder al aislamiento, el material vegetal se homogenizó en mortero de porcelana con nitrógeno líquido. El homogenizado obtenido se pesó y se continuó el proceso tal y como indican las instrucciones de la casa comercial.

En todos los casos, se evaluó la concentración y la pureza del DNA aislado.

3.5.3 Evaluación del DNA genómico

La concentración del DNA se evaluó espectrofotométricamente en Nanodrop ND-1000 a partir de 1µl de muestra del DNA extraído, asumiendo que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 µg/ml de DNA.

La pureza del DNA se determinó mediante el cociente de las lecturas a 260 y 280 nm, sabiendo que el valor óptimo es 1,8 y observando el perfil de la gráfica obtenida del barrido de absorbancia entre 220 y 320 nm, para conocer si hay otros factores que estén interfiriendo, sabiendo que la curva óptima presenta un pico a 260 nm con forma de campana.

Por otro lado, para certificar la calidad del DNA extraído y descartar la presencia de RNA, también se realizó un análisis mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa 1,4 % (p/v) y 0,5 µg/ml de bromuro de etidio en tampón de electroforesis TAE 1x (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) indistintamente.

A las diferentes muestras de DNA, se les añadió un volumen 1/5 de tampón de carga (SDS 0,1%, azul de bromofenol 0,005%, glicerol 5%) y se cargaron en los pocillos del gel.

Generalmente la electroforesis se llevó a cabo en una cubeta horizontal con tampón de electroforesis TAE 1x, aplicando un voltaje de 50-100 V.

3.5.4 Concentración del DNA extraído

El tipo de material de trabajo, normalmente proporciona un bajo rendimiento en la extracción de DNA genómico, por lo que fue necesario concentrar el DNA

obtenido tras el aislamiento con el fin de obtener muestras con una concentración adecuada para la cuantificación del porcentaje de metilación.

La concentración del DNA se realizó en un equipo de secador de vacío (Speed-Vac, Savant).

Este proceso se llevó a cabo con las tapas de los tubos abiertas y seleccionando la opción de alta temperatura, con el objetivo de acelerar el proceso de evaporación, preservando mejor la calidad del DNA extraído y evitando su pérdida.

A continuación, las muestras se resuspendieron en 5 μ l agua desionizada.

Por último, se evaluó de nuevo la concentración y la pureza del DNA concentrado (Apartado 3.5.3)

Las muestras se conservaron a 4°C hasta su momento de uso.

3.5.5 Hidrólisis del DNA genómico

Una vez realizada dicha evaluación, se inició la hidrólisis del DNA genómico.

Las muestras se incubaron a 37°C durante 5 min y a continuación, se desnaturalizaron mediante una incubación a 100°C durante 4 min, seguido de un rápido enfriamiento en hielo.

A continuación, se añadió 2,5 μ l de nucleasa P1 (200 U/ml en 30 mM $C_2H_3O_2Na$, Sigma) y 1,25 μ l de $ZnSO_4$ (10mM), se mezcló bien y se incubó a 37°C durante 16h.

Por último, se añadió 2,5 μ l de tampón Tris (0,5M pH 8,3) y 0,5 μ l de fosfatasa alcalina (100 U/ml en 2,5 M $(NH_4)_2SO_4$, Sigma) se mezcló bien y se incubó a 37°C durante 2h.

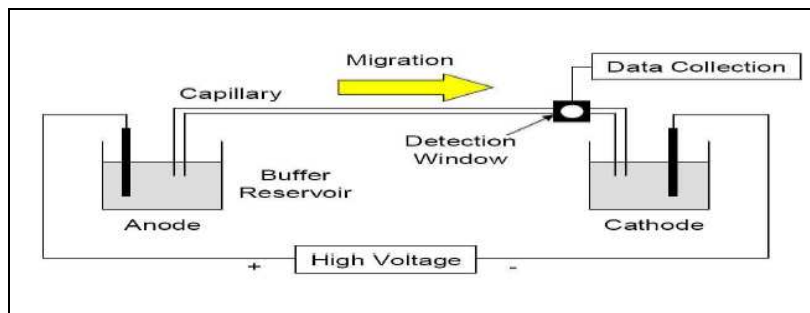
Transcurrido este tiempo, las muestras se guardaron a 4°C hasta su momento de uso.

3.5.6 Electroforesis capilar de alta resolución

El procedimiento empleado, está basado en el método descrito por (Fraga, et al., 2002) con las modificaciones de Hasbún et al., 2008.

El aprendizaje de esta técnica y su aplicación en anteras de flores, se llevó a cabo en el laboratorio de Fisiología vegetal de los Profesores Roberto Rodríguez y M^a Jesús Cañal del Departamento de Biología de Organismos y Sistemas de la Universidad de Oviedo, pioneros en el desarrollo de esta técnica en plantas. Posteriormente, se puso a punto esta técnica en cultivos de microsporas aisladas en el laboratorio del Dr. Alejandro Cifuentes en el Instituto de Fermentaciones Industriales del CSIC.

Los equipos empleados en cada caso fueron: “Capillary Ion analyzer Waters Chromatography” en el caso del Departamento de Biología de Organismos y Sistemas de la Universidad de Oviedo y “Beckman P/ACE 2100” controlado por un software propio (Beckman Instruments Inc. Fullerton, USA) en el caso del Instituto de Fermentaciones Industriales del CSIC.



3.6. Esquema sistema electroforesis capilar

3.5.6.1 Preparación del capilar.

Se utilizó un capilar de sílica fundida sin recubrimiento de 60 cm x 75 μm de dimensiones, con una longitud efectiva de 57cm.

Previamente, se marcó la zona del capilar que iba a ser irradiada por la lámpara UV y en ese punto, se eliminó la capa de sílica que rodea el capilar, en una zona de 1cm aproximadamente de longitud, construyendo así una especie de ventana que permite visualizar lo que ocurre a través del capilar.

Para crear esta ventana, se calentó la zona de interés, con ayuda de un mechero con mucho cuidado para eliminar solo la capa de sílica sin dañar el capilar.

Una vez preparado el capilar, se colocó adecuadamente en el casete y el conjunto a su vez, se colocó en el detector del equipo de manera que la ventana realizada, coincidiese con la zona de irradiación de la lámpara y que los extremos del capilar queden sumergidos en el tampón correspondiente, ya que el capilar debe estar siempre húmedo.

3.5.6.2 Preparación de las soluciones necesarias.

- Tampón de separación:

Como tampón de separación, se empleó bicarbonato sódico 48mM, SDS 60mM.

Para su preparación, se mezcló 0.402g de bicarbonato sódico en 100ml de agua destilada. Se ajustó el pH a 9.6 con NaOH. Por último, se añadió 2.1gr de SDS y se calentó a 70°C hasta su completa disolución. Una vez enfriado, se filtró a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,45 μm , se desgasificó y se guardó a temperatura ambiente protegido de la luz.

Esta solución puede emplearse durante 3- 4 semanas aproximadamente.

Solución NaOH 1M: Una vez preparada, se filtró a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,45 μm , se desgasificó y se guardó a temperatura ambiente.

El agua desionizada empleada debe ser siempre nueva y filtrada para evitar problemas de obstrucción del capilar.

3.5.6.3 Activación del capilar.

Una vez colocado el capilar en la posición correcta, se procedió a su activación.

Para ello, se pasó por el capilar una disolución de NaOH 1M durante 30 min (en casos de capilares nuevos) ó 10 min (en los casos de capilares reutilizados) mediante una presión de 20 psi.

A continuación, se pasó agua desionizada nueva durante 5 min mediante la misma presión.

3.5.6.4 Protocolo de lavado de los capilares

Tras arrancar el equipo, entre inyecciones y al finalizar las medidas del día, el capilar se lavó con agua desionizada durante 5 min seguido de un lavado adicional con tampón de separación durante 5 min más.

Todos los lavados se hicieron con una presión de 20 psi.

3.5.6.5 Inyección, separación y detección.

Las inyecciones se realizaron en el extremo catódico por inyección hidrostática durante 30 seg a una presión de 20 psi.

Las separaciones se llevaron a cabo a 22°C con un voltaje constante de 17kV y un tiempo de análisis de 12 min en la mayoría de los casos; alternativamente, se empleó un voltaje de 12kV y un tiempo de análisis de 20 min, en aquellos casos en los que los picos no se separaron correctamente a 17kV.

Finalmente, la detección se realizó en el extremo anódico a 254 nm.

Para certificar la reproducibilidad de los resultados, al inicio de cada día de medición, se analizaron los deoxirribonucleósidos estándares preparados a una concentración 5 mM en agua desionizada: 2'-deoxicitidina (dC), 2'-deoxiadenosina (dA), 2'-deoxitimidina (dT), 2'-deoxiguanosina (dG) y 5-metil-2'-deoxicitidina (5-mdC) (Sigma Aldrich) de forma independiente, así como una mezcla de todos ellos a la misma concentración.

Dichos análisis se repitieron hasta obtener dos cuantificaciones con tiempos de retención idénticos para cada estándar.

3.5.6.6 Análisis de los datos.

Cada muestra se analizó por duplicado, realizándose al menos 3 réplicas analíticas en cada uno de los casos.

El estado de metilación se cuantificó mediante el cálculo del porcentaje relativo de 5-metil-2'-deoxicitidina de la siguiente manera:

$$\% \text{ 5-mdC} = \frac{\text{área de 5-mdC} \times 100}{\text{área 5-mdC} + \text{área dC}}$$

3.6 “IMMUNOBLOT”

3.6.1 Extracción de proteínas totales

3.6.1.1 Preparación del material vegetal

Para este ensayo se emplearon muestras de anteras de *Brassica napus* y muestras procedentes de cultivos de microsporas de *B. napus* a tiempo cero y a los 4 días del inicio del cultivo.

Las muestras se recogieron y se congelaron en nitrógeno líquido de la misma forma que se explicó en el apartado 3.5.1.

3.6.1.2 Preparación del tampón de homogenización

Se preparó una solución stock de tampón de homogenización 5x (100 mM Tris pH 8.0, 10% SDS (p/v), 5% β-mercaptoetanol (v/v), 1 mM PMSF).

Esta solución se almacenó a temperatura ambiente para evitar la precipitación del SDS. En el momento de uso, se diluyó con agua estéril 1:5 (v/v), y se añadió la cantidad correspondiente del inhibidor de proteasas, PMSF.

3.6.1.3 Extracción de proteínas totales.

En cada caso, se partió de 25 mg de material previamente congelado y almacenado a -80°C. Las muestras se homogeneizaron en mortero de porcelana con nitrógeno líquido, hasta que quedaron pulverizadas. En ese momento, se añadió tampón de homogenización hasta la saturación de la papilla resultante.

Una vez que el homogenizado se descongeló, se pasó a un tubo de 1,5 ml (Eppendorf) con la tapa agujereada y se hirvió durante 3 min. Transcurrido este tiempo, se dejó enfriar al aire durante 30 min y a continuación, cada tubo se centrifugó en una centrífuga de mesa Eppendorf a 10.000 rpm durante 15 min.

El sobrenadante obtenido es el extracto crudo de proteínas, que se almacenó a -20°C hasta el momento de uso.

3.6.1.4 Determinación de la concentración de proteínas totales

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976) empleando albúmina de suero bovino (BSA) como patrón de calibración. Las muestras se prepararon en un volumen de 1 ml al que se le adicionaron 980 µl de una solución de Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay Reagent). Transcurridos 5 min, se procedió a la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm frente a un blanco preparado con el tampón de homogenización empleado.

3.6.2 Separación de proteínas por electroforesis en geles de Poliacrilamida en Condiciones Desnaturalizantes (PAGE-SDS)

3.6.2.1 Preparación de las soluciones stock

- Tampón de separación 4x (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8)
- Tampón de concentración 4x (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8)
- SDS al 10%
- Glicerol al 50% (v/v) en agua destilada
- Persulfato amónico al 10% (p/v) (preparado en el momento de uso)

- Tampón de carga 2x (Tris-HCl 0,125M pH 6,8, SDS 4%, glicerol 20%)
- Tampón de electroforesis con SDS (Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3, glicina 0,192 M y SDS al 0,1 % (p/v))
- Tampón de electroforesis sin SDS (Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3, glicina 0,192 M)

Para el TEMED y la acrilamida al 30%, se emplearon reactivos comerciales ya preparados.

Todas las soluciones se almacenaron a 4°C, excepto la solución de SDS al 10%, que se almacenó a temperatura ambiente.

Se siguió básicamente la técnica descrita por Laemmli (1970) utilizando un equipo “Mini-Protean III” de Bio-Rad.

Se prepararon geles de poliacrilamida 12 % (p/v) de 7,5 x 8 cm y 0,75 mm de grosor, con un gel concentrador de poliacrilamida al 4 % (p/v).

	Gel de separación al 12%	Gel de concentración al 4%
Acrilamida al 30%	3,7 ml	0,5 ml
Tampón de separación 4x	2,3 ml	-----
Tampón de concentración 4x	-----	1 ml
Glicerol al 50%	0,9 ml	-----
SDS al 10%	90 µl	40 µl
Agua destilada estéril	2,1 ml	2,46 ml
Persulfato amónico al 10%	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl

Tabla 12. Composición de los geles de poliacrilamida

Una vez polimerizados, los geles se pasaron a la cubeta de electroforesis. El compartimento interior de la cubeta se llenó con tampón de electroforesis Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3, con glicina 0,192 M y SDS al 0,1 % (p/v), mientras que el compartimento exterior, se llenó con el mismo tampón de electroforesis sin SDS, Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3, con glicina 0,192 M.

Las muestras para la electroforesis se prepararon en tampón Tris-HCl 0,063 M, pH 6,8, conteniendo SDS al 2 % (p/v), glicerol al 10 % (v/v) y azul de bromofenol al 0,006 % (p/v), y DTT 10 mM, y se calentaron a 95°C durante 5 min.

Seguidamente, las muestras se cargaron en los geles y se aplicó un voltaje de 100 V para el paso del frente por el gel de concentración y de 200 V para el resto de la carrera, con una intensidad de corriente siempre en exceso.

Se utilizaron marcadores de masas moleculares entre 10 y 250 kDa (Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards, Bio-Rad).

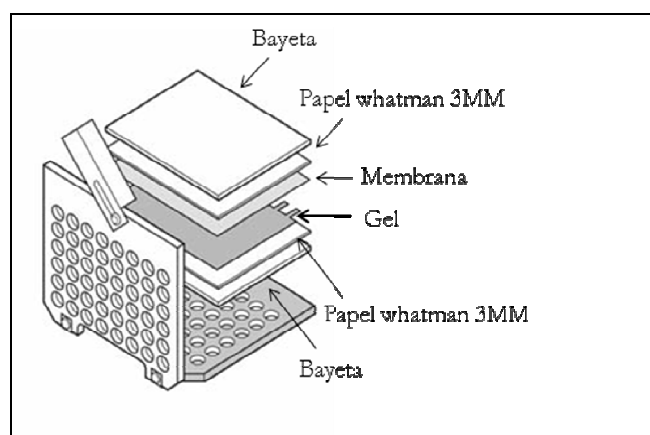
Finalmente, cuando se observó que el frente alcanzó el final del gel, se procedió a cortar la corriente.

3.6.3 Transferencia de proteínas e inmunodetección (Técnica de Western Blot)

3.6.3.1 Transferencia de Proteínas a la membrana

Los geles obtenidos por PAGE-SDS se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF) de Millipore, mediante un sistema de transferencia húmeda “Mini Trans Blot Cell” de la casa comercial Bio-Rad, empleando como tampón de transferencia Tris-HCl 25mM, glicina 192mM, metanol 20% (v/v), pH 8,3.

Tras eliminar la parte del gel concentrador, se equilibraron gel y membrana y se confeccionó un sándwich tal y como se muestra en la figura 3.7.



3.7. Representación esquemática de la preparación del sistema de transferencia.

Todos los componentes del sándwich se humedecieron previamente en tampón transferencia.

El proceso se llevó a cabo a 100 V, manteniendo en exceso la intensidad de corriente, durante 1 h y 30 min a temperatura ambiente.

La eficiencia de la transferencia se comprobó mediante la tinción de la membrana con la solución comercial de Rojo Ponceau (Sigma) para visualizar las proteínas en la membrana y poder así identificar adecuadamente las calles donde han migrado.

Para ello, se sumergió la membrana en el colorante hasta que se observó la aparición de las distintas bandas, resultado de una correcta transferencia.

Este colorante presenta la ventaja de poder eliminarse de la membrana tras sucesivos lavados con agua desionizada, sin interferir en los posteriores pasos de inmunodetección.

3.6.3.2 Inmunodetección de la proteína

Para la detección de la reacción antígeno-anticuerpo en las membranas, se empleó un método de quimioluminiscencia, utilizando luminol, basado en la oxidación del luminol por el complejo peroxidasa de rábano-anti-IgG en presencia de H_2O_2 , formándose un intermediario que se estabiliza mediante la emisión de luz (Thorpe,

et al., 1985). Esta emisión de luz se potencia con la presencia de 4-yodofenol, que actúa como transmisor de radicales de oxígeno al luminol (Rosell y White, 1978).

Tras la transferencia de las proteínas, las membranas se incubaron con metanol al 100 % durante unos segundos y seguidamente se lavaron con agua destilada. Con objeto de bloquear los lugares inespecíficos de unión de las IgGs, la membrana se incubó durante 1h a temperatura ambiente en tampón TBS 5x (Tris-HCl 20 mM, pH 7,8, y NaCl 0,18 M), al que se le adicionó leche en polvo desnatada (Asturiana) al 1,5 % (p/v).

Tras realizar tres lavados con TBS de 10 minutos cada uno, las membranas se incubaron durante 4 h a temperatura ambiente y en agitación suave, con el anticuerpo primario, anti-caspasa 3 (Cell Signaling Technology) en una dilución 1:100 en TBS. A continuación, se realizaron de nuevo 3 lavados con TBS de 10 minutos cada uno y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente y en agitación suave, con el anticuerpo secundario procedente de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano a una concentración 1:5000 en TB.

Todos los lavados e incubaciones de las membranas se llevaron a cabo a temperatura ambiente y agitación suave.

Para el revelado, las membranas se incubaron con el reactivo de quimioluminiscencia “Super Signal West Pico” (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las bandas correspondientes se visualizaron mediante la cámara CCD del equipo “Luminiscent Image Analyzer LAS-3000®” (Fujifilm) con tiempos de exposición variables desde 1 seg hasta 1 min, según la intensidad de la señal obtenida, utilizando el programa “LAS-3000 Lite Pro Chemiluminiscence”.

3.6.4 “Immuno Dot blot”

3.6.4.1 Preparación del material

Este ensayo se llevó a cabo en microsporas aisladas de anteras de *Brassica napus* en fases correspondientes a microspora vacuolada y polen maduro, así como en todas las etapas del cultivo de microsporas de la misma especie.

La obtención del material se realizó de la forma habitual, explicada previamente en el apartado 3.5.1.

3.6.4.2 Preparación del tampón de homogenización

En este caso, se empleó un tampón de homogenización especial, apropiado para favorecer a extracción de proteínas de membrana.

Se preparó una solución de tampón de homogenización: 25 mM Tris-HCl pH 7,2, 50 mM ácido trans-1,2-diaminociclohexano-N, N, N'N'-tetracético (CDTA) y 25 mM ditiotritol. Esta solución se almacenó a temperatura ambiente.

3.6.4.3 Extracción de proteínas

Se partió de 25 mg de material previamente congelado y almacenado a -80°C.

Las muestras se homogeneizaron en mortero de porcelana con nitrógeno líquido, hasta que quedaron pulverizadas. En ese momento, se añadió un volumen aproximado de 50 µl de tampón de homogenización, hasta la saturación de la papilla resultante.

Una vez que el homogenizado se descongeló, se pasó a un tubo Eppendorf y se centrifugó en una centrífuga de mesa Eppendorf a 7000 rpm a 4°C durante 10 min.

El sobrenadante resultante de la centrifugación es el extracto crudo de proteínas, que se almacenó a -20°C hasta el momento de uso.

La concentración de proteínas del extracto, se determinó de la misma forma que se explicó en el apartado 3.6.1.4.

En este caso, se ajustaron las concentraciones de todos los extractos a una concentración de proteína de 1mg/ml.

3.6.4.4 Ensayo “Dot blot”

Una vez ajustadas las concentraciones de cada extracto, se aplicó en membranas de nitrocelulosa (Millipore) un volumen de 10 µl de cada uno de los sobrenadantes ajustados y se dejó secar durante 1 h aproximadamente.

A continuación, para verificar que se cargó la misma cantidad de proteínas de cada una de las muestras en las membranas, se realizó una tinción reversible con el colorante Rojo Ponceau de la forma descrita en el apartado 3.6.2.3.

Después de digitalizar la imagen con un escáner Hewlett Packard 6100C, se eliminó el colorante con varios lavados con agua desionizada y se procedió a la incubación de las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación suave, en tampón TBS 5x (Tris-HCl 20 mM, pH 7,8, y NaCl 0,18 M), al que se le adicionó leche en polvo desnatada (Asturiana) al 1,5 % (p/v).

Tras realizar tres lavados con TBS de 10 minutos cada uno, se llevó a cabo la incubación de las membranas con los anticuerpos primarios JIM5 y JIM7 en relación 1:100 en solución de bloqueo durante toda la noche a temperatura ambiente y agitación suave.

Transcurrido este tiempo, se realizaron de nuevo tres lavados con TBS de 10 minutos cada uno y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario anti-rata conjugado con fosfatasa alcalina en una dilución 1:1000 en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación suave.

Tras realizar tres últimos lavados de 10 minutos con TBS, las membranas se equilibraron con tampón de detección (Tris-HCl, NaCl 0,1M, pH 9,5) durante 2-3 minutos y finalmente, se procedió al revelado, mediante la incubación de las membranas con los sustratos NBT/BCIP de acuerdo con las instrucciones del fabricante “NBT/BCIP ready-to-Use Tablets” (Roche).

La reacción se detuvo mediante varios lavados con agua desionizada, en el momento que se observó la aparición de un fino precipitado marrón-azulado sobre la membrana en las zonas donde están las proteínas en cuestión.

Por último, las membranas se dejaron secar y se digitalizaron en un escáner Hewlett Packard 6100C.

3.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CASPASA 3

La actividad caspasa 3 se determinó mediante un ensayo colorimétrico con el kit comercial “Caspase 3 Assay kit, Colorimetric” (Sigma).

Este ensayo se basa en la detección espectrofotométrica del cromóforo p-nitroanilina (pNA) liberado tras la proteólisis del sustrato sintético específico de la enzima caspasa 3, Acetil-Asp-Glu-Vaal-Asp p-Nitroanilina (Ac-DEVD-pNA).

pNA presenta un máximo de absorción a 405 nm, de manera que la concentración de pNA liberada a partir del sustrato se puede calcular a través de la interpolación de los valores de absorbancia a 405nm obtenidos, en la recta de calibrado preparada previamente con las soluciones de pNA a diferentes concentraciones.

3.7.1 Preparación del material

Para este ensayo se emplearon muestras de anteras de *Nicotiana tabacum* y *Brassica napus*, así como muestras recogidas de cultivos de microsporas de *Brassica napus* a tiempo cero y a los 4 y 8 días del inicio del cultivo.

Así mismo, también se empleó como sistema control del ensayo, meristemos de *Allium cepa*, procedentes de raíces tratadas con una solución salina (NaCl 500 mM) durante 3 h y meristemos de raíces sin tratar (Apartado 3.1.3).

Todas las muestras se recogieron y congelaron en un baño de nitrógeno líquido según el procedimiento descrito en el apartado 3.5.1

3.7.2 Extracción de proteínas

En cada caso, se partió en cada caso de 25 mg de material previamente congelado y almacenado a -80°C .

La extracción de proteínas se llevó a cabo con el tampón de lisis 1x provisto en el kit (50 mM HEPES, pH 7.4, 5 mM, CHAPS, 5 mM DTT) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de proteínas se determinó mediante la técnica de Bradford, tal como se explicó en el apartado 3.6.1.4.

3.7.3 Ensayo de actividad caspasa 3

La reacción enzimática se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos (Falcon) en el tampón de ensayo 1x (20 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM, EDTA, 0.1% CHAPS, 5 mM DTT) provisto en el kit, con un volumen final de reacción de 100 μl , siguiendo las indicaciones del fabricante (ver tabla 14)

Se preparó una serie de soluciones de pNA de concentraciones comprendidas en un rango de 10-200 μM a partir del stock de pNA “p-Nitroaniline Standard”, provisto en el kit, para construir una recta de calibrado en la que interpolar los valores de A_{405} obtenidos en cada una de las muestras¹ (Tabla 13).

μM p-Nitroanilina	μmol p-Nitroanilina
10	0,001
20	0,002
50	0,005
100	0,01
200	0,02

Tabla 13. Soluciones para la construcción de la recta de calibrado.

Para determinar la especificidad del sustrato, cada muestra se analizó, además, en presencia de un inhibidor específico de la enzima caspasa 3, “Ac-DEVD-CHO Inhibitor” también provisto en el kit.

Igualmente, también se incluyó un control negativo de la reacción empleando la enzima caspasa 3 del kit y su sustrato en presencia del inhibidor de la enzima y además un control positivo en ausencia de inhibidor, tal y como se indica en la tabla 14.

Por último, en cada ensayo se incluyó un blanco para establecer el nivel de absorbancia basal en las muestras, con los mismos constituyentes que el resto de las muestras salvo el extracto de proteínas.

Tubo	Extracto	Caspasa 3 (5 µg/µl)	1x Tampón de ensayo	Inhibidor (200µg/µl)	Sustrato (2 mM)
Blanco	---	---	90 µl	---	10 µl
Extracto	5 µl	---	85 µl	---	10 µl
Extracto+inhibidor	5 µl	---	75 µl	10 µl	10 µl
Control +	---	5 µl	85 µl	---	10 µl
Control+Inhibidor	---	5 µl	75 µl	10 µl	10 µl

Tabla 14. Esquema del ensayo de actividad caspasa 3 para un volumen de reacción 100 µl

La mezcla de reacción, se incubó a 37°C durante 3 h, en ausencia de luz y a continuación, se midió la absorbancia a 405 nm en un equipo lector de placas Varioscan 377.

3.7.4 Análisis de los datos.

Para verificar la reproducibilidad de los resultados, cada ensayo se repitió tres veces y cada muestra se analizó por triplicado en cada uno de ellos.

Se construyó la curva de calibrado con los valores de A_{405} obtenidos para cada una de las concentraciones de pNA conocidas empleadas.

A continuación, se interpoló en la recta las medias de los valores de A_{405} obtenidas en cada caso.

Finalmente, se calculó la actividad caspasa 3 como μmol de pNA liberado por minuto y por volumen de extracto de proteínas empleado, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad, } \mu\text{mol pNA/min/ml} = \frac{\mu\text{mol pNA} \times d}{t \times v}$$

Siendo: v: el volumen de muestra empleado en ml; d: el factor de dilución y t: el tiempo de reacción en min.

3.8 HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

Para estudiar de la distribución celular de los mensajeros correspondientes a las diferentes proteínas estudiadas en esta Tesis, se llevó a cabo la hibridación *in situ* de los mismos en diferentes muestras vegetales utilizando el método descrito por Massonneau y col., (2005).

3.8.1 Extracción de RNA total

El aislamiento de RNA se llevó a cabo mediante diferentes métodos, en función del tipo de muestra.

3.8.1.1 Extracción de RNA total mediante el empleo de kits comerciales.

Se emplearon dos tipos de kits comerciales de la casa comercial Qiagen, en función de la cantidad de material de partida disponible. En aquellos casos en los que el material de partida era muy limitante, como las primeras etapas de los cultivos de microsporas de *Brassica napus*, se empleó el “RNeasy Plant Microkit” (Qiagen), mientras que en el caso de anteras y otras etapas del cultivo menos limitantes, se empleó el “RNeasy Plant Minikit” (Qiagen).

En ambos casos, se siguieron las instrucciones del fabricante.

3.8.1.2 Extracción de RNA total mediante el reactivo comercial Trizol.

En el caso del aislamiento de RNA en embriones maduros cigóticos y procedentes de embriogénesis de polen, se empleó un método alternativo, debido a que su alto contenido en fenoles y polisacáridos impedía obtener una buena eficiencia con los métodos anteriores.

El método alternativo fue el reactivo comercial Trizol (GIBCOBRL, Life Technologies), compuesto por una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina (Chomczynski y Sacchi, 1987). El material vegetal se homogeneizó en un mortero con nitrógeno líquido. Se pesó el polvo obtenido y se añadió 1 ml del reactivo comercial por cada 100 mg de tejido. Tras una incubación de 5 min a temperatura ambiente, se añadió 0,2 ml de cloroformo por cada ml de Trizol y se agitó por inversión durante 15 s y se incubaron nuevamente 5 min a temperatura ambiente. Tras centrifugar a 12.000 g durante 15 min a 4°C, al sobrenadante, que contenía el RNA, se le añadió 0,5 ml de isopropanol por ml de Trizol y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, se centrifugó a 12.000 g durante 10 min a 4°C y el precipitado, conteniendo el RNA, se lavó con 1 ml de etanol al 75% (v/v), se centrifugó de nuevo a 12.000 g durante 5 min y el precipitado se secó al aire. Por último, el RNA precipitado se resuspendió en agua DEPC (dietilpirocarbonato) libre de ribonucleasas.

3.8.1.3 Evaluación del RNA extraído

La cuantificación del RNA se realizó espectrofotométricamente en Nanodrop ND-1000 a partir de 1µl de muestra del RNA extraído, asumiendo que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 µg/ml de RNA.

La pureza del DNA se determinó mediante el cociente de las lecturas a 260 y 280 nm, sabiendo que el valor óptimo es 2,1y observando el perfil de la gráfica obtenida del barrido de absorbancia entre 220 y 320 nm, para conocer si hay otros factores que estén interfiriendo, sabiendo que la curva óptima presenta un pico a 260 nm con forma de campana.

Por otro lado, para certificar la pureza del RNA extraído, también se realizó un análisis mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa al 1 % (p/v) y 0,5 µg/ml de bromuro de etidio en tampón de electroforesis TAE 1x (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM).

A las diferentes muestras de RNA, se les añadió un volumen 1/5 de tampón de carga (SDS 0,1%, azul de bromofenol 0,005%, glicerol 5%) y se cargaron en los pocillos del gel.

Generalmente la electroforesis se llevó a cabo en una cubeta horizontal con tampón de electroforesis TAE 1x, aplicando un voltaje de 50-100 V.

3.8.2 Síntesis y marcado de la sonda

3.8.2.1 Transcripción inversa

La obtención de los cDNAs se realizó a partir del RNA total aislado de los diferentes tipos de muestras, según los protocolos descritos en el apartado anterior.

En todos los casos, se partió de 1 µg de RNA al que se añadió oligo-dT 40 µg/ml y dNTPs 1mM. Se incubó a 65°C durante 5 min seguido de una rápida incubación en hielo. Posteriormente, se adicionó inhibidor de ribonucleasas 40U/µl, tampón de la enzima “First strand buffer 5x” y DTT 0,1 M. Esta mezcla se incubó a 42°C durante 2 min y a continuación, se añadió 200 U/µl de la enzima “Superscript Reverse Transcriptase” (Invitrogen), en un volumen final de reacción de 25 µl. La reacción se incubó a 42°C durante 50 min y seguidamente se inactivó mediante una incubación a 70°C durante 15 min.

Finalmente, las muestras de cDNAs obtenidas se almacenaron a -20°C hasta su momento de uso.

3.8.2.2 Diseño y síntesis de oligonucleótidos para la obtención de cDNAs

Para la obtención de estos cDNAs, se identificaron las secuencias correspondientes a los genes de interés en las especies de estudio y en su defecto

se identificaron dichas secuencias en especies con cierto grado de identidad a través de la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). En este último caso, se hizo un alineamiento tipo *clustal* entre dichas secuencias, utilizando el programa OMIGA2 (Oxford Molecular), para localizar zonas conservadas interespecíficas. Así, se diseñaron cebadores de 20 pares de bases, cuya síntesis se llevó a cabo en la empresa ROCHE.

La secuencia de los oligonucleótidos diseñados, se muestran en la tabla 15.

cDNA	F-Oligonucleótido 5'-3'	R-oligonucleótido 3'-5'
<i>NtMET-1</i>	TGCAGCAATGGATGAGAACG	ACAGTAAGCGAACGGAATGG
<i>BnMET-1</i>	GGCAGACGTTCCAACCTACT	AAGGTGCACCGTATTGAGTA
<i>BnPME</i>	GGAGCGTCGTTGATGGATGG	GTAACCTCGTTCGCCTGACC

Tabla 15. Secuencia de cebadores utilizados para la clonación parcial de cDNAs

3.8.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción de amplificación se llevó a cabo en tubos de 0,2 ml en un volumen final de reacción de 25 μ l; la mezcla de PCR contenía 50-100 ng de cDNA, 10 μ l de una mezcla de dNTPs 10mM (dATP, dTTP, dCTP y dGTP), 1 μ l de cada cebador (10 μ M), 2,5 μ l de tampón de amplificación 10x “HotMaster™ Taq con Mg²⁺” (Eppendorf) y 0,25 μ l de la enzima “Hot Master Taq polimerasa” (5U/ μ l)(Eppendorf). Los programas de PCR utilizados fueron diversos, cambiando la temperatura de alineamiento, los tiempos de extensión y alineamiento, en función de los requerimientos de los cebadores y de la longitud del fragmento de cDNA amplificado. La temperatura de alineamiento se calculó según el porcentaje de bases AT-GC de los cebadores (N° de bases AT x 2°C + N° de bases GC x 4°C) y teniendo en cuenta que, teóricamente, se requiere un minuto de alineamiento por Kb de DNA amplificado.

Para la realización de la PCR se utilizó un termociclador Eppendorf.

3.8.2.4 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Una vez realizadas las amplificaciones necesarias, se realizó una electroforesis en geles de agarosa del 0,8 al 2 % (p/v), en función del tamaño del amplificado. (Sambrook y Russel (2001))

Los geles se prepararon en tampón de electroforesis TAE 1x (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1mM) indistintamente y Bromuro de Etidio (BrEt) a una concentración 0,5 µg/ml.

Como marcador de DNA se empleó “O´GeneRuler™ 100bp Plus DNA ladder, ready to use” (Fermentas).

La electroforesis se llevó cabo en una cubeta de electroforesis horizontal con TAE 1x aplicando un voltaje de 50-100V con una fuente de alimentación “EPS 500/400” (Apparatus Corporation).

Finalmente, las bandas se visualizaron con luz UV empleando el sistema Gel Doc™ 1000 system (Bio-Ra Laboratories).

3.8.2.5 Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa

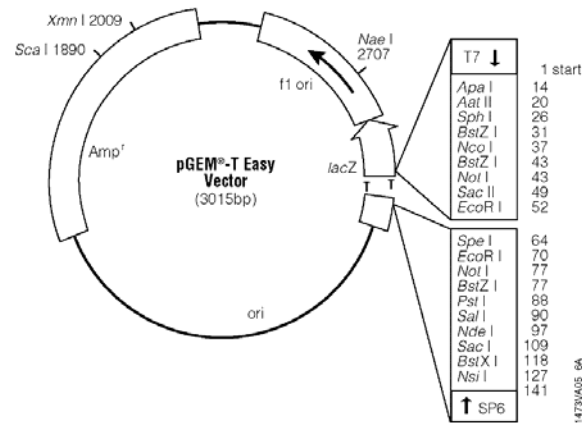
Finalizada la electroforesis, se procedió a cortar las bandas de interés con la ayuda de un escarpelo. Para extraer el cDNA de la agarosa se utilizó el kit comercial “QIAquick® Gel Extraction” (Qiagen). Este sistema, se fundamenta en la extracción y purificación del DNA a través de la disolución de la agarosa y la absorción de los ácidos nucleicos a partículas de sílice en presencia de una alta concentración de sales. El DNA purificado se eluyó de la resina con H₂O ultrapura y estéril.

3.8.2.6 Clonación en el vector pGEM®-T Easy

Tras la purificación de los fragmentos de DNA, se procedió a su ligación en el vector de clonación pGEM-T® Easy de Promega.

Este vector linearizado consta de varias timidinas añadidas en su extremo 3´terminal. Estas timidinas se unen al inserto y mejora enormemente la eficiencia de la ligación del producto de PCR en los plásmidos, ya que previene la

recircularización del vector. Además, este vector también se caracteriza por tener un sitio de clonación flanqueado por los promotores de RNA polimerasa T7 y SP6 y un gen de resistencia a Ampicilina, características muy útiles en la selección de plásmidos recombinantes (Fig.3.8).



3.8. Mapa del vector pGEM-T® Easy de Promega

Para optimizar las reacciones, se empleó una relación estequiométrica vector: inserto de 1:3. Se emplearon 50 ng de plásmido, el fragmento de cDNA, 3 U de la enzima T4 ligasa (Promega) y el correspondiente tampón comercial, en un volumen final de 10 μ l, siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

La reacción de ligación se llevó a cabo durante 1 h a temperatura ambiente.

3.8.2.7 Transformación de bacterias competentes

Las bacterias se transformaron mediante choque térmico, según el método descrito por Lucotte y Baneyx (1993). Las bacterias competentes *E. Coli* JM109 (Promega), conservadas a -80°C , se descongelaron en hielo, se les añadió entre 1-50 ng del plásmido de interés por cada 100 μ l de células competentes y se incubaron 10 min a 4°C . Posteriormente, las bacterias se sometieron a un choque térmico consistente en un calentamiento de las muestras a 42°C durante 45-50 s, y posterior baño de hielo durante 2 min. Seguidamente se añadió 0,9 ml de medio LB precalentado a 37°C y se incubaron durante 1 h a 37°C en un agitador orbital (New Brunswick

Scientific Innova 4340) a 200 rpm. Una vez alcanzada una densidad óptica adecuada a 600 nm (0,4-0,6), se sembró 100 µl de cada tubo, en placas de Petri con medio LB y ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Al día siguiente, se obtuvo un crecimiento con varias colonias aisladas en cada placa.

3.8.2.8 Análisis de los plásmidos recombinantes

Aunque, teóricamente, las colonias crecidas en estas condiciones han de tener el plásmido con el inserto, pueden darse casos de falsos negativos por la ligación de dos vectores. Por este motivo, antes de purificar el plásmido recombinante se seleccionaron varias colonias aisladas y se chequearon mediante PCR en colonia con los cebadores del vector que flanquean el lugar de inserción del fragmento de DNA (SP6 y T7) y mediante digestión enzimática con las enzimas de restricción correspondientes.

3.8.2.9 Aislamiento de DNA de los plásmidos recombinantes

Una vez seleccionados los positivos reales, a partir de la colonia seleccionada se inocularon tubos de ensayo con 3 ml de LB líquido y ampicilina (100 µg/ml), que se mantuvieron en un agitador orbital a 190 rpm y 37°C hasta que alcanzaron una densidad óptica de 0,6 a 600 nm (12-16 h).

A partir de estos cultivos se inició el aislamiento del DNA plasmídico (Miniprep) utilizando el kit comercial “Wizard Plus SV Minipreps, DNA Purification Systems” (Promega).

Con el fin de romper las células, extraer y aislar el cDNA, los 3 ml de cultivo se centrifugaron a 10.000 g durante 3 min para precipitar las bacterias. El precipitado celular se resuspendió en 250 µl de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), con EDTA 10 mM y RNAsa A (100 µg/ml). A continuación se añadieron 250 µl de solución de lisis (NaOH 0,2 M, SDS 1%) y se incubó durante 1-5 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se adicionó 10 µl de una solución alcalina con proteasas (conteniendo entre otros, 25-50 % subtilisina, 20-25 % de propano-1,2-diol, 1-5 % tetraborato de disodio anhidro) para inactivar endonucleasas y degradar proteínas,

y 350 µl de solución de neutralización (hidrocloruro de guanidina 4,09 M, acetato potásico 0,759 M, acético glacial 2,12 M, pH 2,4), después de incubar 5 min se centrifugó a 14.000 g durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a una columna suministrada por Promega que contenía una resina a la que se unía el DNA, después se centrifugó a 14.000 g durante 1 min y posteriormente, se añadieron 750 µl de solución de lavado (etanol 60 %, acetato potásico 60 mM, Tris-HCl 8,3 mM, EDTA 0,04 mM) y se realizó una centrifugación igual a la anterior. El paso anterior se repitió con 250 µl de solución de lavado y se centrifugó en las mismas condiciones durante 2 min. Por último, se eluyó el DNA de la columna añadiendo 50 µl de agua y centrifugando a 14.000 g durante 1 min.

Finalmente, se comprobó la concentración y la pureza del DNA extraído tal y como se explicó en el apartado 3.5.3. Las muestras se conservaron a -20°C.

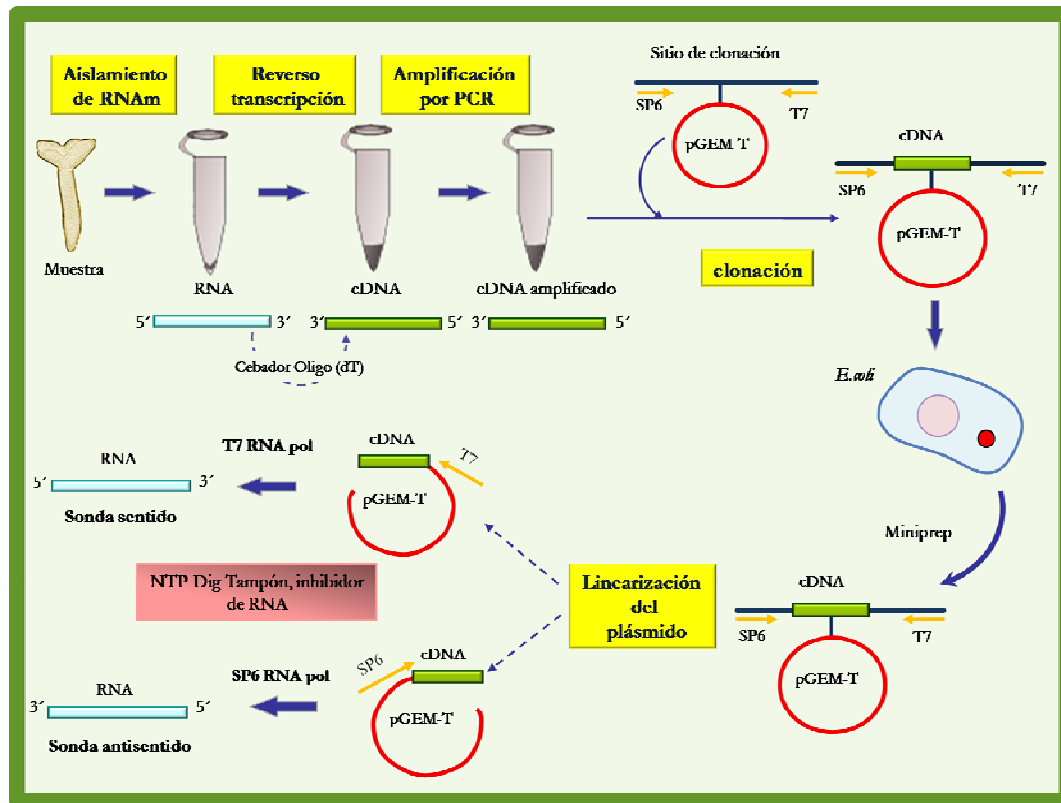
3.8.2.10 Linearización de los plásmidos recombinantes

A continuación, se linearizó el vector con las enzimas de restricción apropiadas. Para ello, se tuvo en cuenta que para realizar este tipo de estudios de hibridación *in situ*, se necesita una sonda sentido, como control negativo, y otra antisentido, que será la que hibridará al mensajero complementario. Por lo que se necesitó obtener el vector linearizado en ambos sentidos, lo cual se consiguió mediante restricción del vector en el fragmento SP6, en un caso, y en el fragmento T7 en el caso contrario (Fig.3.9).

3.8.2.11 Obtención de la sonda RNA marcada con digoxigenina

Para la obtención de la sonda, se utilizó el DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) de Roche.

Una vez linearizado el vector en ambos sentidos, se obtuvieron las sondas sentido y antisentido marcadas con digoxigenina, mediante la acción de una RNA polimerasa, que retrotranscribe el cDNA insertado en el vector, en RNA marcado con digoxigenina, utilizando para ello nucleótidos trifosfato marcados con digoxigenina. Este proceso se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante.



3.9. Obtención de la sonda RNA marcada con digoxigenina.

Por último, se determinó el rendimiento del marcaje de la sonda de RNA con digoxigenina así como su concentración óptima de uso para la hibridación. Para ello, se prepararon una serie de diluciones de la sonda obtenida en tampón de dilución de RNA (H2O-DEPC: 20xSSC: Formaldehído, 5:3: 2) (20xSSC: NaCl 3M, Citrato sódico 300mM pH 7) asumiendo que la sonda se obtuvo a una concentración de 10 ng/ μ l. (Tabla 16).

A continuación, se aplicaron 5 μ l de cada una de las diluciones, en orden decreciente, en una membrana de nylon (Hybond N, Amershan) cargada positivamente. Los RNAs se fijaron a la membrana por exposición a luz ultravioleta durante 30 min a 120°C.

Tubo	RNA (μ l)		Tampón dilución	Dilución	Concentración final
1	---		---	---	10 ng/ μ l
2	2	1	18	1:10	1 ng/ μ l
3	2	2	198	1:100	10 pg/ μ l
4	15	3	35	1:3,3	3 pg/ μ l
5	5	3	45	1:10	1 pg/ μ l
6	5	4	45	1:10	0,3 pg/ μ l
7	5	5	45	1:10	0,1 pg/ μ l
8	5	6	45	1:10	0,03 pg/ μ l
9	5	7	45	1:10	0,01 pg/ μ l
10	0	---	50	---	0

Tabla 16. Diluciones seriadas de la sonda obtenida en tampón de dilución de RNA.

El proceso de detección se realizó siguiendo los pasos descritos en el kit “NBT/BCIP ready-to-Use Tablets” (Roche) (Apartado 3.6.3.4.).

Finalmente, se comparó la intensidad de color de las manchas de cada una de las diluciones empleadas y se aproximó así la concentración de sonda a emplear en el experimento de hibridación *in situ*.

3.8.3 Preparación de las muestras

La técnica de hibridación *in situ* se llevó a cabo en diferentes tipos de muestras obtenidas mediante distintos procesamientos: criocortes semifinos, cortes de criostato y cortes de vibratomo.

En todos los casos, los cortes se recogieron sobre portas multipocillo recubiertos con APTES (Apartado 3.3.2).

3.8.4 Pretratamiento de las muestras

A excepción de los criocortes semifinos, los cortes preparados para hibridación *in situ* se deshidrataron y rehidrataron mediante la incubación de los mismos en series crecientes y decrecientes de metanol (30%, 50%, 70%, 100%, 70%, 50%, 30%) preparado en PBS, durante 5 min en cada solución. Para digerir parcialmente las

paredes celulares, y favorecer la penetración del anticuerpo, las muestras se incubaron durante 60 min con celulasa al 2 % (p/v). Tras cada tratamiento las muestras se lavaron con PBS y con agua durante 5 min. Las muestras se deshidrataron de nuevo mediante incubación de los cortes con concentraciones crecientes de metanol (30%, 50%, 70%, 100%) y se dejaron secar totalmente a temperatura ambiente.

3.8.5 Hibridación

Las sondas sentido y antisentido, previamente sintetizadas, se diluyeron entre 1/20 y 1/50 en tampón de hibridación (formamida 50 % (v/v), NaCl 300 mM, Tris 100 mM, EDTA 10 mM, sulfato de dextrano 10%, solución de Denhart 1x y tRNA (20mg/ml)). A cada muestra se añadió 20 µl de sonda, se taparon los pocillos con una tira de parafina y se incubaron durante toda la noche a 50°C, en una cámara húmeda. Una vez terminado el proceso de hibridación, se lavaron las muestras 4 veces con SSC 4x (NaCl 0,6 M; citrato sódico 0,06 M) durante 2 min, 4 veces con SSC 2x, durante 2 min y 2 veces con SSC dilución 1x a 50°C durante 15 min, en el caso de criocortes semifinos, se sustituyó el último lavado con SSC 1x por SSC 0,1x.

3.8.6 Detección de los híbridos por inmunofluorescencia

Las muestras hibridadas con la sonda se lavaron con BSA al 5 % (p/v) durante 5 min, para bloquear uniones inespecíficas del anticuerpo. Posteriormente, se incubaron durante 90 min con el anticuerpo Mouse Anti-digoxigenina (Boehringer Mannheim) diluido 1/5000 en BSA al 1% (p/v). Tras tres lavados de 5 min cada uno, con BSA al 1%, se incubó durante 45 min con el anticuerpo Anti-Mouse IgG-Alexa 488 (Invitrogen) diluido 1/25 en PBS. Nuevamente se lavaron las muestras tres veces con PBS y se incubaron con DAPI durante 5 min, para marcar los núcleos y comprobar que la sonda no está detectando ácidos nucleicos del

núcleo. Por último, tras lavar las muestras con PBS se montaron con “Mowiol[®] 4-88”, y se observaron al microscopio láser confocal, Leica TCS SP5.

3.9 RT-PCR SEMICUANTITATIVA

3.9.1 Transcripción inversa

La obtención de los cDNAs se realizó a partir del RNA total aislado de los diferentes tipos de muestras, según los protocolos descritos en el apartado 3.8.2.1.

3.9.2 Diseño y síntesis de oligonucleótidos para la obtención de cDNAs

Los cebadores utilizados, así como la temperatura de alineamiento, el número de acceso y el tamaño del fragmento amplificado, se especifican en la tabla 15.

3.9.3 RT-PCR Semicuantitativa

El método utilizado para la PCR semicuantitativa fue el descrito por Marone y col., (2001). Esta técnica permite comparar la cantidad de mRNA entre muestras distintas, ya que la reacción se detiene en la fase exponencial de amplificación, donde la cantidad de DNA amplificado es directamente proporcional a la cantidad de cDNA inicial de la muestra. Además es imprescindible el uso de un gen control, cuya expresión sea constitutiva y no varíe entre las distintas situaciones, para normalizar la intensidad de las bandas con respecto a ese control. En este estudio se utilizó la actina-II de cebada como gen control, tanto para *Nicotiana tabacum* como para *Brassica napus*.

Una vez obtenido el cDNA de las diferentes muestras a comparar en cada estudio, se cuantificó y se realizó distintas diluciones del mismo para asegurar que se partía de la misma concentración de cDNA en cada una de las muestras. Mediante una PCR normal preparando mezclas comunes de reacción para minimizar el error de experimentación, se seleccionó el número de ciclos correspondientes para cada uno de los genes ensayados así como para el control, realizando amplificaciones de

los mismos a 25, 28, 30 y 33 ciclos, con el fin de seleccionar un ciclo de amplificación correspondiente a la fase exponencial de la misma.

Por último, una vez ajustadas las concentraciones de cDNA inicial y los ciclos de amplificación (entre 28-30 en todos los casos), se realizaron las PCR correspondientes según el protocolo descrito anteriormente (Apartado 3.8.2.3).

1º Etapa	Desnaturalización inicial	94°C	2 min
2º Etapa 28-30 ciclos	Desnaturalización	94 °C	40seg
	Hibridación	50 °C	1min
	Extensión	65 °C	2 min
3º Etapa	Extensión final	65 °C	10 min

Tabla 17. Programa general de PCR empleado en los estudios de RT-PCR.

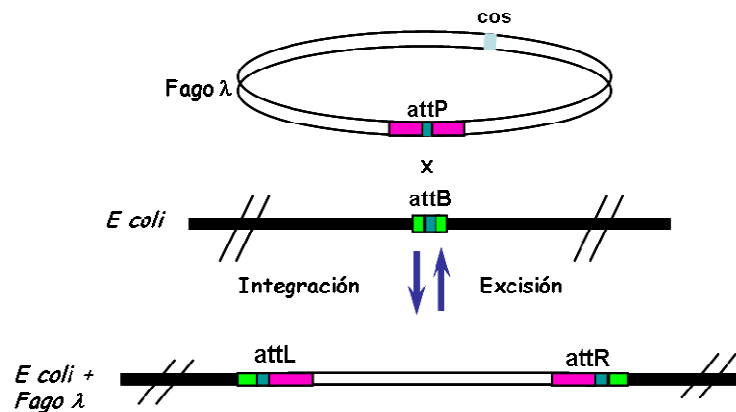
3.10 ESTUDIOS DE LOCALIZACIÓN MEDIANTE TECNOLOGÍA GFP

Se han realizado estudios de localización de la proteína pectinmetilesterasa mediante transformación transitoria de plantas de *Nicotiana tabacum*.

La obtención de la construcción de la proteína de fusión, se llevó a cabo mediante la tecnología Gateway® (Invitrogen).

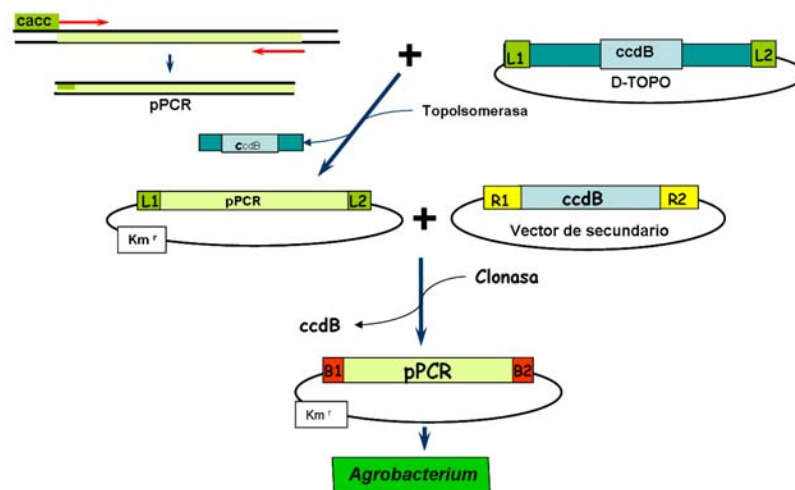
La tecnología Gateway está basada en el sistema de recombinación específica del Fago Lambda mediante el cual éste se integra en el cromosoma de *E. coli*. El fago Lambda incorpora su genoma en el de *E. coli* mediante un proceso de lisogénesis, que consiste básicamente en una recombinación específica entre secuencias de DNA. Estas secuencias específicas se denominan sitios att, y contienen dominios de unión para proteínas de recombinación. El proceso de recombinación tenía lugar entre los sitio attP (del fago) y attB (de *E. coli*) en presencia de 2 proteínas de recombinación, la integrasa (Int) y el factor IHF (Integration Host Factor). Cuando tiene lugar la recombinación, el genoma del fago queda integrado en el genoma de *E. coli* y al mismo tiempo se reconfiguran los sitios att, dando lugar a

dos sitios att nuevos, el attR y el attL. Mediante la recombinación de estos dos nuevos sitios att, y en presencia de las dos proteínas de recombinación y una excisionasa (Xis), el fago es liberado del genoma de *E. coli*, recircularizándose el ciclo lítico y regenerándose los sitios attB y attP (Landy y col., 1989) (Fig.3.10).



3.10. Esquema de recombinação específica del fago λ en *E. coli* (Live Technologies™)

Mediante este sistema de recombinación homóloga de sitios att, el gen de interés, previamente clonado en el vector D-TOPO, según se ha descrito en el apartado, queda introducido en el vector secundario (Fig.3.11).



3.11. Clonación mediante tecnología Gateway. (Gateway® Technology)

3.10.1 Obtención del producto de PCR *BnPME*.

3.10.1.1 Diseño de los oligonucleótidos.

Los cebadores se diseñaron a partir de la secuencia del gen completo, *BnPME*, obtenida de la base de datos NCBI (Nº. acceso: AY036606) (Fig.3.12.).

```

5'- ATGTCTCAAATTTTCATGTTCTTGGTCACCCCTTAGCTTCTTCTCCATATTGTCATCTCCTTCTCTCGCCGCA
GGACCTCAGGCCACAGGAAACGCCACGTCCCCATCAAATGTATGTCGCTACGCACCGGATCCATCTTACTGTAGATCAGT
TCTCCCAAACAGCCCGGAGATGTTTACTCCTACGGTCGTTTCTCTCTCAGACGGTCCATCTCACGTGCCAGGCGGTTCA
TCTCAATGATCGACTATCAACTAAACCGAAAGGCAAAGTGGATGCTAAATCCACCTTGCGGGCACTCGAAGACTGCAAAA
TTCTTAGCCAGCCTTACTATAGACTTCTCTCTTAGTAGCTCACAGACCGTAGATGCCACCAAACGCTGTCCGTTTCGAG
GGCTGACGATGTTCATACTTTCCTAAGTGTGCGATCACCACGAACAGACTTGCCTTGAAGGACTTAAATCCACGGCATC
TGAAAATGGTCTCTCTGGTGATCTTTACAACGATACAAAACCTATGGGGTCTCTCTTGCCTCTTTTCCAAAGGTTGGG
TGCCAAAAGGAAAAGATCGAGGCCGTTTGGAAACCAGAAGCCAGCTTCAAAAAGTTTCCGGCTTCCGTAACGGTAGA
TTACCGTTAAAGATGACGGAAAGGACGCGTGCCGTTTACAACACCGTGACTAGGTCTGGGAGAAAGCTTCTCCAAACTGG
AGTAGACGCTGTTACAGTACAGGATATCGTGACGGTGAATCAGAACGGGACGGGAAACTTCACGACTATAAACGAAAGCT
GTAGCTGCCCGCCTAATAAAAACGACGGTAGTAACGGTATTCTTCTTGATCTACGTAACGGCGGGATTGTACGAGGAATA
CGTGGAGATTCCGAAGTACAAGAGGTATGTGATGATGATCGGTGACGGCATTAAACAACTGTTATCACCGGAAACCGGA
GCGTCGTTGATGGATGGACCACCTTCAAGTCCGCCACATTTATTCTAACAGGTCCTAACTTTATTGGCGTGAACATAACA
ATCCGCAACACGGCAGGACCAACCAAGGGTCAAGCCGTCGCATTGAGGAGCGGTGGAGACTTCTCTGTATTCTATAGTTG
TAGTTTTCGAAGCCTATCAAGATACCTTATATACGCATTCTCTCAGACAGTTCTATCGTGAATGTGATGTTTATGGTACGG
TTGACTTTATATTCGGCAATGCTGCAGTGGTGTACAAAAGTGAATTTGTATCCACGTCAGCCTCGTCAAGGTCAGGCG
AACGAGGTTACAGCTCAAGGTCGTACCGACCCGAACAGAACTGGAAGTGTGTTACATGGGTGTACAATAAGACCCGC
GGATGATTTGGCTTCGAGCAACTATACAGTAAAACTTATCTTGGTCCGCCGTGGAAGGAATATTCGAGAACCCTTGTTA
TGACAGCTTACATAGACGGGTTTCTTGACCCGACTGGTGGAAACGCATGGTCTGGAAATTCGCATTGAGCACACTTTAC
TATGCGGAATACAATAACACAGGACCTGGTCTAGCACGACAAACAGAGTCACTTGGCCAGGTTATCATGTCATTAACGC
TACTGATGCTTCAAATTCACCGTCACCAATTTTCTTGTGGCGAAGGTTGGATCGGACAAACCGGGTGCCTTTCTGGTGG
GTGGAATGATTGCATAA-3'
    
```

3.12. Secuencia del gen *BnPME* (Nº acceso AY036606)

El diseño del oligonucleótido directo (5'-3') se realizó a partir de las 20 bases del extremo N-terminal de la secuencia de la proteína de interés, incluyendo el codón de iniciación. No obstante, al emplearse la tecnología Gateway, fue necesario añadir una secuencia de 4 bases, CACC, en el extremo 5' del cebador, necesaria para la correcta inserción en el vector de clonación (Tabla 17).

	Secuencias 5'-3'	Codon STOP	NºBases
F-Oligonucleótido	CACCATgTCTCAAATTTTCATgTTCTTg	NO	28
R1-Oligonucleótido	CGTGGGTGGAATGATTGCA	NO	19

Tabla 18. Secuencia de oligonucleótidos empleados

Por otro lado, se diseñó un oligonucleótido reverso a partir de las 20 bases del extremo C-terminal de la secuencia de la proteína de interés sin incluir el codón stop 5'TAA'3 (Tabla 17).

3.10.1.2 PCR Touchdown

Debido a la mala calidad de los cebadores diseñados, se tuvo que recurrir a un tipo especial de PCR, PCR Touchdown (Nature Protocols 3, 1452 - 1456 (2008)) para incrementar la especificidad y la sensibilidad de la amplificación.

La PCR touchdown, se basa en el empleo de una temperatura de hibridación decreciente en 1°C en cada ciclo, hasta alcanzar una temperatura, que se mantiene en los últimos ciclos.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en tubos de 0,2 ml en un volumen final de reacción de 50 µl; la mezcla de PCR contenía 50-100 ng de cDNA, 10 µl de una mezcla de dNTPs 10mM (dATP, dTTP, dCTP y dGTP), 1 µl de cada cebador (10µM), 5 µl de tampón de amplificación 10x "High Fidelity" (Invitrogen), 1µl de MgSO₄ (50mM)(Invitrogen) y 0,2 µl de la enzima "Taq DNA Polimerase High Fidelity Platinum" (5U/µl (Invitrogen)).

La PCR se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf.

En la tabla 18, se detalla el programa de PCR touchdown empleado .

1º Fase:

1º Etapa	Desnaturalización inicial	98°C	3 min
2º Etapa 15 ciclos	Desnaturalización	98 °C	30seg
	Hibridación	65-50°C*	45seg
	Extensión	72 °C	2 min

*Tª Hibridación desciende 1°C en cada ciclo, hasta un total de 15 ciclos

2º Fase:

1º Etapa 20 ciclos	Desnaturalización	98 °C	30 seg
	Hibridación	65 °C	45 seg
	Extensión	72 °C	2 min
2º Etapa	Extensión final	72 °C	10 min

Tabla 19. Programa de PCR touchdown empleado.

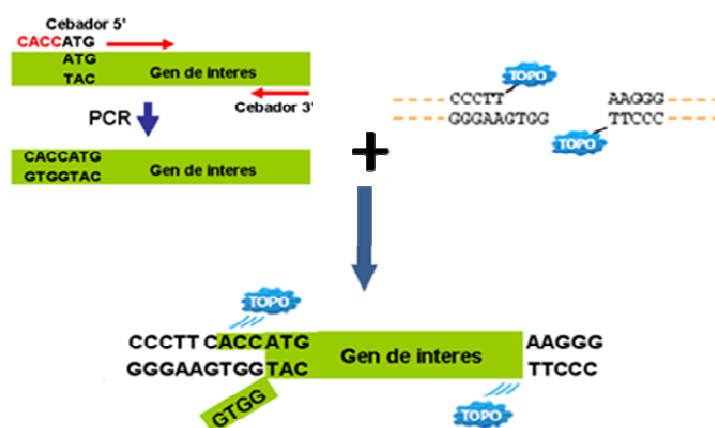
Finalizada la PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Apartado 3.8.2.4). Y se procedió a cortar la banda correspondiente al gen *BnPME*, con el kit comercial “QIAquick® Gel Extraction” (Qiagen) (Apartado 3.8.2.5).

3.10.1.3 Clonación en el vector pENTR™/D-TOPO®

Tras la purificación del gen *BnPME*, se procedió a su ligación en el vector de clonación pENTR™/D-TOPO® de Invitrogen. A esta reacción se la conoce como “Topo cloning reaction”.

Este vector se caracteriza por contener una secuencia de 4 bases, GTGG, que se va a unir específicamente con la secuencia CACC, añadida en el extremo 5´ del cebador directo; de manera que el producto de PCR, entra en el vector con la orientación correcta con una eficacia del 90%. (Figura 3.13)

Además, este vector también consta de un gen de resistencia a Kanamicina, que permitió su selección posterior.



3.13. Mecanismo de clonación en el pENTR™/D-TOPO® de Invitrogen (Gateway® technology)

Para optimizar las reacciones, se empleó una relación estequiométrica vector: inserto de 1:2.

Se emplearon 20 ng de plásmido, el fragmento de cDNA, y 1 µl de solución salina, en un volumen final de 6 µl, siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

La mezcla se incubó durante 5 min a temperatura ambiente, quedando así el fragmento introducido y correctamente orientado en el vector (Figura 3.13).

3.10.1.4 Transformación de bacterias competentes

En este caso, se emplearon las células competentes *E. coli*, One shot® Match™ T1^R, incluidas en el kit “pENTR™ Directional TOPO® Cloning kit” (Invitrogen).

Al igual que en el apartado 3.8.2.7, las bacterias se transformaron mediante choque térmico, según el método descrito por Lucotte y Baneux (1993).

Se empleó 2 µl de la ligación anterior por cada vial de bacterias, de 50 µl. Se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.8.2.7.

Finalmente, se sembró 100 µl de cada tubo en placas Petri con medio LB y kanamicina (50 µg/ml) y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Al día siguiente, se obtuvo un crecimiento con un gran número de colonias bien aisladas en cada placa.

Al igual que en el apartado 3.8.2.8, a continuación se procedió al análisis de las colonias crecidas. Dicho análisis, se realizó mediante PCR en colonia utilizando los cebadores que flanquean al gen *BnPME*, empleados para la obtención del fragmento clonado (Tabla 17).

Una vez seleccionadas las colonias positivas, se realizaron cultivos en tubos de ensayo de LB líquido y kanamicina (50 µg/ml) como se explicó en el apartado 3.8.2.9.

3.10.1.5 Aislamiento del DNA plasmídico

A partir de estos cultivos se realizó el aislamiento del DNA plasmídico (Miniprep) mediante el empleo del kit comercial “Wizard Plus SV Minipreps, DNA Purification Systems” (Promega) (Apartado 3.8.2.9).

Finalizado el aislamiento, se comprobó la concentración y la pureza del DNA extraído tal y como se explicó en el apartado 3.5.3. Las muestras se conservaron a -20°C.

3.10.1.6 Secuenciación de los clones

Una vez chequeado el DNA plasmídico obtenido, antes de mandar a secuenciar la construcción, se realizaron nuevas pruebas para confirmar la presencia del fragmento clonado en el DNA plasmídico purificado.

Esta comprobación se llevó a cabo de dos formas posibles:

3.10.1.6.1 Comprobación del inserto mediante digestión simple:

Mediante una digestión simple con la enzima de restricción Ksp I (Sac II) (Roche Applied Science) empleando 5 µl de la muestra de DNA plasmídico obtenido, 5 µl de tampón L y 20 µl de enzima Ksp I para un volumen final de 50 µl, según el protocolo de la casa comercial. A continuación, la mezcla se incubó a 37°C durante 2-3 h.

Transcurrido este tiempo, el resultado de la digestión se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Apartado 3.8.2.4).

3.10.1.6.2 Comprobación del inserto mediante PCR:

También se realizaron varias pruebas de PCR empleando diferentes parejas de cebadores para asegurar el resultado.

<i>Nombre</i>	<i>Cebador directo (5'-3')</i>	<i>Cebador inverso (5'-3')</i>	<i>Tamaño (pb)</i>
PAREJA 1	GGAGCGTCGTTGATGGATGG	AGGCGAACGAGGTTAC	327
PAREJA 2	GGAGCGTCGTTGATGGATGG	CGTGGGTGGAATGATTGCA	738
PAREJA 3	CACCATGTCTCAAATTTTCATGTTCTTG	AGGCGAACGAGGTTAC	1289

Tabla 20. Parejas de oligonucleótidos empleadas para la comprobación del inserto.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en tubos de 0,2 ml en un volumen final de reacción de 25 µl; la mezcla de PCR contenía 50-100 ng de cDNA, 10 µl de una mezcla de dNTPs 10mM (dATP, dTTP, dCTP y dGTP), 1 µl de cada cebador (10µM), 2,5 µl de tampón de amplificación 10x “HotMaster™ Taq con Mg²⁺” (Eppendorf) y 0,25 µl de la enzima “Hot Master Taq polimerasa” (5U/µl)(Eppendorf).

La PCR se llevó a cabo utilizando el programa detallado en la (Tabla 19).

1º Etapa	Desnaturalización inicial	94°C	2 min
2º Etapa 40 ciclos	Desnaturalización	94 °C	40seg
	Hibridación	50 °C	1min
	Extensión	65 °C	2 min
3º Etapa	Extensión final	65 °C	10 min

Tabla 21. Programa de PCR empleado.

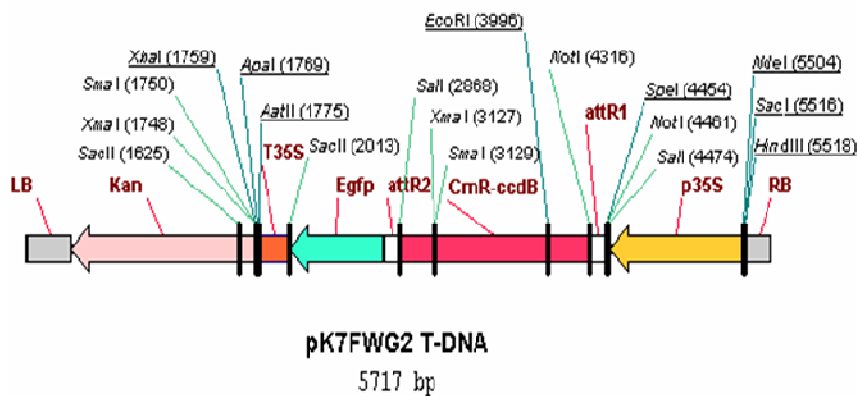
Una vez identificados los clones correctos, se procedió a la secuenciación de los mismos, en el servicio de secuenciación Secugen, para confirmar que el gen de interés se había clonado con la correcta orientación. Para ello, se empleó la pareja

de cebadores M13 directo y reverso, incluida en el kit “pENTR™ Directional TOPO® Cloning kit” (Invitrogen)

3.10.1.7 Clonación en el vector de destino

Una vez recibido el informe de secuenciación de la construcción y comprobar que todo era correcto, se procedió a la clonación de dicha construcción en el vector destino pF7KWG2 T-DNA (Fig.3.14).

Este vector está diseñado de tal forma, que el fragmento clonado en TOPO, entra por recombinación homóloga en el extremo 5' del gen de la proteína verde fluorescente (GFP) insertada en el plásmido, de forma que cuando se inserte en el genoma de la planta y se transcriba y traduzca con la maquinaria de la misma, se expresará una proteína verde fluorescente que irá a la localización propia de la proteína PME.



3.14. Vector utilizado para proteínas de fusión con GFP

Se empleó una relación estequiométrica 2: 1 PME-TOPO: vector destino en un volumen de 8 µl. A continuación, se añadió 2 µl de la enzima “LR clonasa II” (Invitrogen) previamente descongelada en hielo. Después de mezclar bien la reacción, se incubó durante 1-2 h a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo, se añadió 2 µg de la solución de proteinasa K incluida en el kit. Por último, la mezcla de incubó a 37°C durante 10 min.



3.15. Obtención del vector de expresión (Gateway® technology)

A continuación, se procedió a la transformación de *E.coli* con el resultado de la ligación.

Se siguió el protocolo de transformación descrito en el apartado 3.8.2.7 empleando 1 µl del resultado de la ligación.

Finalizada la transformación, se sembraron 20 µl de cada transformación en placas Petri de LB y Estreptomicina (50 µg/ml).

Tras una noche de crecimiento a 37°C, aparecieron varias colonias aisladas. Se seleccionaron 5 colonias y se procedió al chequeo del inserto mediante PCR en colonia.

3.10.1.8 Aislamiento del DNA plasmídico

Las colonias positivas, se ponen cultivo en LB líquido y estreptomicina (50 µg/ml) y se incubó a 37°C en agitación durante toda la noche.

A partir de cada colonia positiva seleccionada, se inoculó tubos de ensayo con 3 ml de LB líquido y estreptomicina (50 µg/ml), y se mantuvieron en agitación a 190 rpm y 37°C hasta que alcanzaron una densidad óptica de 0,6 a 600 nm (12-16 h).

A partir de estos cultivos se inició el aislamiento del DNA plasmídico (Miniprep) utilizando un protocolo basado en el empleo de 3 tampones diferentes, más adecuado para el aislamiento de DNA plasmídico de gran tamaño, que el kit de Promega empleado en los casos anteriores.

Los cultivos líquidos crecidos durante toda la noche, se centrifugaron a 13000 rpm a 4°C durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se añadió 250 µl del tampón 1 (EDTA 1mM, Tris 50mM pH 8.0) y 2,5 µl RNasa A. La mezcla se agitó en vórtex y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación, se

añadió 250 µl del tampón 2 (NaOH 0,2N, SDS 1%) y se mezcló suavemente mediante inversión del tubo varias veces. Se incubó 5 min a temperatura ambiente y se añadió 350 µl de tampón 3 (Acetato potásico 3M, ácido acético 1,8M, pH 5,5). De nuevo, se mezcló por inversión del tubo y se incubó durante 10 min en hielo.

Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a máxima velocidad durante 10 min, a 4°C. Se tomó 750 µl del sobrenadante y se puso en un tubo eppendorf 1,5ml. Se añadió 750 µl de isopropanol y se mezcló bien. A continuación, se centrifugó a 14000 rpm durante 30 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se centrifugó de nuevo a 14000rpm durante 10min.

Tras descartar el sobrenadante, las muestras se mantuvieron a 37°C durante 10 min. Por último, se añadió 50 µl de agua destilada estéril.

Se analizó la concentración y pureza del DNA extraído del modo descrito en el apartado 3.5.3.

Una vez chequeado el DNA plasmídico obtenido, antes de proceder al siguiente paso, se realizaron nuevas pruebas para confirmar la presencia del fragmento clonado en el DNA plasmídico purificado. Esta comprobación se llevó a cabo de la misma forma que se explicó en el apartado 3.10.1.6.2

3.10.2 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Los vectores secundarios se transformaron en células de la cepa GV3100 de *Agrobacterium tumefaciens*.

La transformación se llevó a cabo con 2-10 µg de DNA plasmídico que se mezcló con 200 µl de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*. La mezcla se incubó en un baño con nitrógeno líquido durante 5 min seguido de una incubación a 37°C durante 5 min más. A continuación, se añadió 1 ml de LB y se incubó a 28°C en agitación, durante 2-6 h.

Las células de *Agrobacterium* transformadas, se sembraron en placas de Petri de LB sólido con rifampicina (50 µg/ml), estreptomycin (50 µg/ml) y espectinomicina (100 µg/ml) y se incubaron a 28°C durante 48-72 h, aproximadamente.

Se seleccionaron varias colonias al azar y se comprobaron los positivos mediante PCR en colonia, utilizando los cebadores específicos de los genes introducidos en el plásmido.

A continuación, se procedió al aislamiento del DNA plasmídico de las colonias positivas, mediante el protocolo descrito en el apartado 3.10.1.8.

Después de evaluar la concentración y la pureza del DNA extraído, se procedió a la comprobación del inserto mediante PCR de la misma forma descrita en el apartado 3.10.1.6.2.

3.10.3 Transformación transitoria de plantas de *Nicotiana tabacum* mediante agroinfiltración.

La transformación de las plantas de *Nicotiana tabacum* se realizó mediante la técnica de agroinfiltración. Las plantas se utilizaron para transformación cuando presentaban aproximadamente 1 mes de edad. El *Agrobacterium* transformado se cultivó en 10 ml de LB conteniendo los antibióticos correspondientes a 28°C hasta la saturación.

Una vez crecido el cultivo, se separaron las células centrifugando a 3500 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 5 ml de tampón de inducción (MgCl₂ 10mM, MES 10mM pH 5,6 y acetosiringona 150 µM). Se incubó durante 2 -3 h a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo, se midió la densidad óptica a 600 nm, que debía estar entre 0,1-0,2. En los cultivos con densidad óptica mayor a la deseada, se prepararon diluciones con tampón de dilución (MgCl₂ 1M, MES 1M pH 5,6) hasta ajustarlos a la densidad óptima adecuada.

Por último, se llevó a cabo la infiltración del tejido por el envés de la hoja utilizando una jeringuilla de 1 ml sin aguja y mediante presión sobre el dedo, como lo describe Scofield et al. 1996.

Una vez realizada la transformación, las plantas se cubrieron con una película transparente para mantener la humedad y se mantuvieron en las cámaras de crecimiento habituales.

3.10.4 Análisis confocal de las plantas transformadas

Transcurridas 48-72 h de la transformación, se cortó con ayuda de un bisturí, un área de 1 cm², aproximadamente, de la zona de la hoja previamente infiltrada. Se dispuso en un portaobjetos y se montó empleando como medio de montaje glicerol: PBS (1:1).

Finalmente, la preparación, se observó en el microscopio láser de confocal (Leica TCS SP5).

REFERENCIAS DE LIBROS NO ENCONTRADAS CON ENDNOTE

Williams 1977

Rosell DF, White EH (1978) *Methods Enzymol* **57**: 409

BIBLIOGRAFÍA MATERIAL Y METODOS

- Bradford, M. M. 'Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding', *Analytical Biochemistry* **Vol. 72, No. 1-2**, 248-254, 1976.
- Fraga, M. F., E. Uriol, L. B. Diego, M. Berdasco, M. Esteller, M. J. Canal, and R. Rodriguez. 'High-Performance Capillary Electrophoretic Method for the Quantification of 5-Methyl 2'-Deoxycytidine in Genomic Dna: Application to Plant, Animal and Human Cancer Tissues', *Electrophoresis* **Vol. 23, No. 11**, 1677-1681, 2002.
- Laemmli, U. K. 'Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4', *Nature* **Vol. 227, No. 5259**, 680-&, 1970.
- Rentrop, M., B. Knapp, H. Winter, and J. Schweizer. 'Differential Localization of Distinct Keratin Messenger Rna-Species in Mouse Tongue Epithelium by Insitu Hybridization with Specific Cdna Probes', *Journal of Cell Biology* **Vol. 103, No. 6**, 2583-2591, 1986.
- Reynolds, E. S. 'Use of Lead Citrate at High Ph as an Electron-Opaque Stain in Electron Microscopy', *Journal of Cell Biology* **Vol. 17, No. 1**, 208-&, 1963.
- Romero-Puertas, M. C., M. Rodriguez-Serrano, F. J. Corpas, M. Gomez, L. A. Del Rio, and L. M. Sandalio. 'Cadmium-Induced Subcellular Accumulation of O-2(-) and H2o2 in Pea Leaves', *Plant Cell and Environment* **Vol. 27, No. 9**, 1122-1134, 2004.
- Thorpe, G. H. G., L. J. Kricka, S. B. Moseley, and T. P. Whitehead. 'Phenols as Enhancers of the Chemi-Luminescent Horseradish-Peroxidase Luminol

Hydrogen-Peroxide Reaction - Application in Luminescence-Monitored Enzyme Immunoassays', *Clinical Chemistry* **Vol. 31, No. 8**, 1335-1341, 1985.

4 RESULTADOS

4.1 DESARROLLO *IN VITRO* Y CARACTERIZACIÓN CELULAR DE LA REPROGRAMACIÓN DE LA MICROSPORA A EMBRIOGÉNESIS

La embriogénesis de polen mediante el cultivo de microsporas aisladas, proceso que permite el desarrollo de líneas homocigotas completas a partir de parentales heterocigotos en mucho menos tiempo que mediante técnicas de mejora genética tradicional. Esto implica la reprogramación de la microspora, hacia una ruta de desarrollo diferente y el inicio de procesos de proliferación y diferenciación que culminan con la formación del embrión y la regeneración de plantas haploides y doble haploides.

4.1.1 Etapas principales del desarrollo *in vitro* de embriogénesis del polen en *Brassica napus*

La colza se considera un sistema modelo para el estudio de embriogénesis a partir del cultivo de microsporas. Tras el aislamiento de las microsporas en la etapa de mayor respuesta a embriogénesis (etapa de microspora vacuolada) y su puesta en cultivo (Apartado 3.2.3), se somete a un estrés térmico a 32°C acompañado de oscuridad. Tras el estrés inductor, algunas microsporas en cultivo cambian su programa de desarrollo hacia la ruta embriogénica.

En la figura 4.1, se muestra un esquema de los principales acontecimientos del cultivo de microsporas de esta especie.

Tras 3 ó 4 días del inicio del cultivo, algunas microsporas dividen de forma simétrica, dando lugar a dos células semejantes en tamaño y organización estructural (Fig. 4.3-B), lo que supone el inicio de la ruta embriogénica o esporofítica. A partir de este momento, cada célula comienza a dividirse simétricamente, con interfases cortas, que propician la aparición de estructuras multicelulares o proembriones rodeados en esta primera fase, por la cubierta especial del polen, la exina.

Figura 4.1. Representación esquemática de las principales etapas del desarrollo embriogénico de microsporas de *Brassica napus* en sistemas de inducción a 32°C, respecto al tiempo de aparición.

Transcurridos 6 ó 7 días del inicio del cultivo, se observan estructuras embriogénicas más avanzadas, caracterizadas por un mayor tamaño debido a su mayor número de células, en las que ya se ha producido la rotura de la exina por las zonas de las aperturas, permitiendo de esta manera un crecimiento más rápido del embrión (Fig.4.3-C). El cultivo no es totalmente sincrónico, por lo que también se observan estructuras cuya tasa de división es inferior y todavía no pasan de 3 células (Fig.4.2-B).

Figura 4.2. Cultivo de microsporas de *Brassica napus*.

Imágenes tomadas en microscopio multidimensional *in vivo*. A: Vista panorámica a día 0 del cultivo. B: Vista panorámica a día 10 del inicio del cultivo. Barras: 50µm.

A partir de 12-14 días del inicio del cultivo, se pueden observar los primeros embriones globulares (Fig.4.3-D). En este momento, el cultivo se transfiere a 25°C, en oscuridad y agitación, condiciones que favorecen el desarrollo posterior del embrión.

Figura 4.3. Etapas principales del desarrollo embriogénico a partir de microsporas de *Brassica napus L.*

Imágenes en contraste de fase, tomadas en microscopio multidimensional *in vivo*. A: microspora vacuolada después del aislamiento; B: proembrión de dos células rodeado de la exina; C: proembrión con exina rota; D: embrión globular; E: embrión corazón; F: embrión torpedo; G: imagen panorámica de una placa con embriones cotiledonares; H: embrión cotiledonar maduro. Barras: A: 10µm; B,C: 20µm; D,E,F: 50µm.

En pocos días más de desarrollo, el embrión adopta una morfología típica de corazón (Fig.4.3-E).

Aproximadamente a los 16-20 días desde el inicio del cultivo, el embrión comienza a elongarse, al tiempo que se desarrollan los cotiledones, apareciendo los embriones tipo torpedo (Fig.4.3-F).

Finalmente, entre los 20-25 días desde el inicio del cultivo, los embriones aumentan de tamaño y maduran hasta el estadio denominado cotiledonar (Fig.4.3-H).

4.1.2 Germinación de embriones y regeneración y aclimatación de las plantas derivadas de microsporas

4.1.2.1 Germinación de embriones

Los embriones derivados de microsporas, en estado cotiledonar maduro, se germinaron a 18°C y oscuridad, en placas de Petri estériles tal y como se explicó en el apartado 3.2.6. Transcurridos 20-24 días en estas condiciones, se observó el desarrollo de la radícula y una coloración amarillenta en los cotiledones (Fig.4.4-A). En este momento, los cultivos se transfirieron a 25°C con un fotoperiodo de 16h. Aproximadamente una semana después, se produjo la activación de la clorofila y 3 semanas más adelante, se desarrollaron plántulas *in vitro* con 3-4 hojas (Fig. 4.4-B).

4.1.2.2 Aclimatación de las plantas regeneradas *in vitro*

Las plántulas de 3-4 hojas obtenidas, se sub-cultivaron en tubos de cultivo con medio de germinación (Apartado 3.26) y se incubaron a 25°C con un fotoperiodo de 16h. Transcurridos 21 días de cultivo en estas condiciones, se observó un desarrollo foliar más avanzado, con plántulas de 8-10 hojas. En este momento, estos cultivos se transfirieron a frascos de cristal estériles conteniendo una proporción medio MS sin sacarosa y tierra al 50% (Apartado 3.26) y se incubaron a 25°C con un fotoperiodo de 16h para conseguir la aclimatación de las plántulas de unas condiciones heterotróficas a unas condiciones autotróficas (Fig.4.4.-C).

Figura 4.4. Conversión de embriones derivados de microsporas a plantas.

A,B,C: etapas consecutivas de la germinación de embriones. A: embriones desecados al aire a los tras 20d de incubación a 18°C. B: Activación de la clorofila y pigmentación de los

cotiledones del embrión como respuesta a la exposición a la luz (10-12d). C: Plántulas con 2-3 hojas tras de 21-28d a 25°C con un fotoperiodo de 16h. D,E,F,G: Etapas consecutivas durante el crecimiento y transferencia a condiciones fotoautotróficas. D: Elongación de plántulas y desarrollo en medio MS; E: Transferencia de las plántulas a frascos de cristal con tierra para su aclimatación. F: Planta regenerada transferida al invernadero. G: Floración y crecimiento avanzado de una planta DH espontánea adulta.

Tras 21-30 días en estas condiciones, se produjo la elongación del nuevo tallo, acompañado de la multiplicación de las hojas (15-20 hojas) y el crecimiento de la raíz, visible a través de la parte basal del frasco de cristal (Fig.4.4-D). Estas plántulas fotoautótrofas se transfirieron a tiestos de plástico con tierra y se crecieron en cámaras de crecimiento en las mismas condiciones descritas para las plantas donadoras en el apartado 3.1.2 (Fig.4.4-E, F). Después de 1 semana, las plantas se trasladaron al invernadero, empleando de nuevo las mismas condiciones descritas para las plantas donadoras (Fig.4.4- G).

4.1.3 Nuevo sistema de inducción a embriogénesis de microsporas de *Brassica napus* mediante estrés a 18°C

En esta Tesis, se ha identificado un nuevo sistema de inducción de embriogénesis, alternativo al sistema descrito en el apartado 3.2, considerado como la ruta convencional del desarrollo embriogénico del polen de *Brassica napus* inducido mediante estrés a 32°C.

Este nuevo sistema de inducción a embriogénesis consiste en someter a las microsporas vacuoladas aisladas puestas en cultivo a un estrés térmico de 18°C, en lugar de 32°C.

Las principales diferencias observadas en ambos sistemas de embriogénesis, son los tiempos de desarrollo (más lentos en el sistema de 18°C) y la arquitectura celular observada en términos de formación de estructuras multicelulares derivadas de microsporas (aparición de estructuras tipo suspensor en el sistema de 18°C).

El proceso de selección de microsporas en la fase de mayor respuesta, su aislamiento y puesta en cultivo, se realizó tal y como se describió en el apartado 3.2.3.

Posteriormente, las microsporas vacuoladas aisladas y puestas en cultivo, se sometieron a un estrés térmico a 18°C y oscuridad.

En la figura 4.5, se muestra un esquema de los principales acontecimientos que tienen lugar en este nuevo sistema de embriogénesis de microsporas.

Figura 4.5. Representación esquemática de las principales etapas del desarrollo embriogénico de microsporas de *Brassica napus* en sistemas de inducción a 18°C, respecto al tiempo de aparición.

Durante los primeros 6-7 días del cultivo, predominan estructuras ovaladas con 3 núcleos, análogas al polen tricelular maduro de esta especie, indicando que una parte de la población de microsporas sigue un desarrollo gametofítico *in vitro* en esos primeros días a 18°C (datos no mostrados). Sin embargo, transcurridos 9-11 días desde la puesta en cultivo, se observaron las primeras divisiones celulares simétricas, indicativos del inicio del proceso de embriogénesis (Fig.4.6-B). Siguiendo a estas divisiones simétricas iniciales, a los 13-15 días, la proliferación celular continuó mediante dos tipos de desarrollo diferentes. La mayoría de las microsporas con divisiones embriogénicas, siguen un desarrollo que denominamos tipo filamentoso (Fig.4.5) al formar estructuras alargadas. Sin embargo, se observó que algunas células también seguían un desarrollo no filamentoso (datos no mostrados), similar al descrito para el sistema de inducción a 32°C (Fig.4.5).

Transcurridos 21-24 días desde el inicio del cultivo, se observaron proembriones filamentosos y no filamentosos de mayor tamaño (Fig.4.6-C, D, E); la estructura filamentosa era similar al suspensor de los embriones cigóticos (Fig.4.6-F). Cuando aparecieron los primeros embriones globulares observados a simple vista, los cultivos se transfirieron a 25°C en oscuridad y agitación.

En las etapas sucesivas la mayoría de los embriones observados poseían una estructura similar, caracterizada por una cabeza globular y un suspensor filamentoso (Fig.4.6-G). El desarrollo de numerosas estructuras con suspensor supone una diferencia importante con respecto al sistema de embriogénesis a 32°C, en el que no aparecen.

Se observó que el crecimiento y desarrollo del suspensor se inicia en las etapas de embrión globular temprano y se mantiene hasta las fases de embrión corazón tardío (Fig.4.6-H, I). A continuación, el desarrollo continúa con la aparición de embriones torpedo, la mayoría ya sin suspensor, (datos no mostrados). Finalmente, transcurridos 35-40 días desde el inicio del cultivo, se forman los embriones cotiledonares maduros, con las mismas características morfológicas que los obtenidos mediante el sistema de inducción a embriogénesis a 32°C (datos no mostrados).

Figura 4.6. Principales etapas de la ruta embriogénica con desarrollo de una estructura tipo suspensor a partir del tratamiento de estrés inductor a 18°C.

A-G: Imágenes en contraste de fase de preparaciones con DAPI en aplastado para la visualización de los núcleos. A: célula de mayor tamaño con exina rota; B,C: proembriones de dos células con restos remanentes de la exina adheridos a una de las células (13-15d); D,E: proembrión de 3 y 7 células con estructura similar al suspensor (17-19d). F: proembriones con 4 -6 células en la parte del embrión propiamente dicho. G: proembrión con 6-8 células en la estructura similar al suspensor, con la exina adherida al extremo terminal (21-24d). Barras: A-F: 20µm; G: 40µm; H,I: 100µm.

4.1.4 Marcadores celulares de las distintas etapas de embriogénesis del polen en *Brassica napus*

Con objeto de caracterizar las principales etapas del desarrollo embriogénico de *Brassica napus* frente al desarrollo gametofítico, se llevó a cabo la monitorización de los cambios que tienen lugar en ambos programas de desarrollo mediante diferentes citoquímicas e inmunocitoquímicas para diferentes componentes celulares y su análisis en el microscopio óptico de fluorescencia y confocal.

4.1.4.1 Cambios a nivel de núcleo y citoplasma durante el desarrollo

Para estudiar los cambios a nivel de núcleo y citoplasma que tienen lugar durante el desarrollo gametofítico y embriogénico del polen, se realizaron citoquímicas con: a) azul de toluidina (Apartado 3.3.6.1.1) para tinción general, b) DAPI (Apartado 3.3.6.1.3) para teñir específicamente núcleos, c) I₂KI (Apartado 3.3.6.1.2) para almidón, c) Calcofluor White para componentes celulósicos de la pared celular (Apartado 3.3.6.1.4) y d) inmunolocalización de RNA total el anticuerpo D44

(Apartado 3.4.1.2), sobre cortes semifinos de Lowicryl K4M, para cada una de las etapas del estudio.

Para la monitorización de la ruta gametofítica *in vivo*, se seleccionaron anteras correspondientes a las fases de microspora joven, microspora vacuolada y polen maduro.

Tras la liberación de la tétrada, la microspora joven se caracteriza por su pequeño tamaño y por poseer un gran núcleo central rodeado de un citoplasma denso y con escasas vacuolas pequeño tamaño (Fig.4.7-A). En esta fase, la microspora es muy activa transcripcionalmente, por lo que posee un alto contenido en ribosomas en el citoplasma y ausencia de almidón, tal y como se observa en las figuras 4.7-B y C respectivamente.

Según avanza el desarrollo, la microspora aumenta su tamaño y desarrolla una gran vacuola, que ocupa la mayor parte del citoplasma y empuja lateralmente el núcleo a una posición periférica en la célula (Fig.4.7-D). La tinción con DAPI muestra un patrón de cromatina descondensada, con algunas masas de heterocromatina. La inmunofluorescencia con anti-RNA en esta fase muestra una intensa señal citoplásmica (Fig.4.7-F), indicativo de una abundante población ribosómica. Por otro lado, la citoquímica con I₂KI revela ausencia de almidón en esta fase (Fig.4.7-E).

Después de la primera división mitótica del polen, se forma el grano de polen, constituido por dos células diferentes, la célula vegetativa, que ocupa la mayor parte del volumen del grano de polen y la célula generativa, de pequeño tamaño (Fig.4.7-G).

Figura 4.7. Desarrollo gametofítico *in vivo* de *Brassica napus*.

A-C: Microspora joven; D-F: Microspora vacuolada; G-I: Polen bicelular. A-G: Citoquímica con azul de toluidina para visualizar la estructura general. B-H: Citoquímica para almidón. C-I: Inmunofluorescencia con anti-RNA y tinción con DAPI. Barras: 10µm

La tinción con DAPI muestra claramente esta asimetría, que además también se refleja en el patrón de cromatina de ambos núcleos. El núcleo vegetativo presenta una cromatina más descondensada, similar a la de la microspora, mientras que el núcleo de la célula generativa, posee un patrón de cromatina muy condensado, que

aparece con una intensa señal fluorescente. El citoplasma de la célula vegetativa, muestra pequeñas vacuolas (Fig.4.7-G), así como una intensa señal de inmunofluorescencia con anti-RNA (Fig.4.7-I). En esta fase, ya se observan grandes depósitos de almidón por todo el citoplasma, reveladas como depósitos densos por la citoquímica del I₂KI (Fig.4.7-H).

Los controles negativos realizados eliminando el anticuerpo primario, anti-RNA D44, no mostraron marcado significativo (datos no mostrados).

Por otro lado, también se llevó a cabo la monitorización de las principales etapas de la ruta embriogénica del polen de *Brassica napus* mediante un análisis análogo al realizado para el desarrollo gametofítico (Fig.4.8).

Las microsporas reprogramadas, inician la ruta embriogénica con una división simétrica que da lugar a dos células con núcleos de tamaño, forma y organización cromatínica similares, al contrario de lo que ocurre en el polen bicelular originado en la ruta gametofítica (Fig.4.8-E). En estas estructuras embriogénicas, los núcleos quedan centrados en sus respectivas células y se forma una pared celular entre las dos células hijas. El citoplasma aparece denso, con numerosas vacuolas y sin depósitos de almidón (Fig.4.8-F). La inmunofluorescencia con anti-RNA revela un intenso marcado citoplásmico en estas estructuras de 2 células proembrionarias (Fig.4.8-G).

Según avanza el desarrollo embriogénico, se producen más divisiones que dan lugar a estructuras multicelulares o proembriones de mayor tamaño, todavía rodeadas de la exina (Fig.4.8-I). El número de vacuolas en el citoplasma de estas células ha disminuido y se observan algunos depósitos de almidón dispersos (Fig.4.8-J). La inmunofluorescencia con anti-RNA muestra una señal citoplásmica muy intensa, indicativo de una gran población ribosómica (Fig.4.8-K).

Figura 4.8. Primeras etapas del desarrollo embriogénico *in vitro* a partir de microsporas aisladas de *Brassica napus* sometidas a un tratamiento de estrés inductor a 32°C.

Microspora vacuolada después del aislamiento; E-H: Proembrión de dos células; I-L: Proembrión de varias células todavía rodeado de la cubierta de la exina; M-O: Proembrión de

varias células con la exina rota; P-S: proembrión multicelular sin exina; A-P: Citoquímica con azul de toluidina para visualizar la estructura general; B-Q: Citoquímica para almidón. C-R: Inmunofluorescencia con anti-RNA y tinción con DAPI. D-S: Imagen de DIC. Barras A-O: 10 μ m; P-S: 20 μ m.

Figura 4.9. Etapas avanzadas del desarrollo embriogénico *in vitro* a partir de microsporas aisladas de *Brassica napus* sometidas a un tratamiento de estrés inductor a 32°C.

A-C: Embrión globular; D-F; embrión corazón tardío; G-J: Embrión torpedo. I: Aumento de la parte cotiledonar de un embrión torpedo; J: Aumento de la parte radicular de un embrión torpedo. A-G: Citoquímica con azul de toluidina para visualizar la estructura general; B-H: Citoquímica para almidón. C-J: Inmunofluorescencia con anti-RNA y tinción con DAPI. Barras A-C: 20 μ m; D-H: 50 μ m.

En fases más avanzadas del desarrollo, las estructuras embriogénicas continúan dividiéndose y aumentando su tamaño, de manera que se produce la rotura de la exina (Fig.4.8-M). En estos proembriones, se observa un mayor número de depósitos de almidón, así como una intensa señal citoplásmica en la inmunofluorescencia con anti-RNA (Figs.4.8-N, Ñ).

A partir de la rotura de la exina, los proembriones presentan una morfología esférica y un número de células variable según su estadio, generalmente en el orden de decenas (Fig.4.8-P). El depósito de almidón en el citoplasma incrementa y poseen una elevada población ribosómica (Figs.4.8-Q, R). Comienza un crecimiento rápido del proembrión, hasta llegar a la fase de embrión globular (Fig.4.9-A).

En las siguientes fases de desarrollo, aparecen embriones globulares y corazón donde se pueden diferenciar dos tipos celulares (Figs 4.9-A, B). En el interior, una zona de proliferación, formada por pequeñas células poligonales con un gran núcleo central y citoplasma rico en RNA y un menor número de depósitos de almidón y vacuolas y la zona exterior formada por células más diferenciadas caracterizadas por un elevado número de depósitos de almidón y mayores vacuolas (Figs. 4.9-B,C,E y F).

En los embriones torpedo, de morfología elongada, se puede observar de forma más patente (Fig.4.9-G). Las zonas de diferenciación, caracterizadas por citoplasmas con numerosas vacuolas y depósitos de almidón, mientras que las células de las zonas de proliferación poseen citoplasmas más densos y con menor acúmulo de almidón situadas en las zonas meristemáticas del embrión (Fig. 4.9-H). La

inmunofluorescencia con anti-RNA muestra una intensa señal citoplásmica en todas las células del embrión (Fig. 4.9-I,J).

Finalmente, los embriones maduran en el estadio denominado cotiledonar, y se observa su diferenciación tisular (Fig.4.10). Comienzan a aparecer en los extremos del embrión, el meristemo apical, entre los dos cotiledones y el meristemo radicular, en el extremo opuesto (ambos más densos en tinciones con azul de toluidina) (Fig.4.10-A).

Figura 4.10. Embrión cotiledonar derivado de microsporas de *Brassica napus* sometidas a un tratamiento de estrés inductor a 32°C.

A-C: Panorámica de embrión cotiledonar; D-F: Aumento de la parte cotiledonar del embrión; G-I: Aumento de la parte radicular del embrión. A,D,G: Citoquímica con azul de toluidina; B,E,H: Citoquímica de almidón; C,F,I: Inmunofluorescencia con anti-RNA y tinción con DAPI.

Las células de las zonas no meristemáticas desarrollan grandes vacuolas quedando el núcleo y el resto de orgánulos citoplásmicos en una estrecha banda periférica (Fig.4.10-D). Al igual que en el embrión torpedo, las zonas más diferenciadas (periféricas), muestran un mayor acúmulo de gránulos de almidón, mientras que las zonas de proliferación contienen un menor contenido de almidón. Este patrón, se observa tanto en la parte cotiledonar como en la parte radicular del embrión maduro (Figs.4.10-B,E,H). La inmunofluorescencia con anti-RNA muestra una intensa señal citoplásmica en todas las células del embrión (Figs.4.10-F,I).

4.1.4.2 Cambios a nivel de pared celular durante el desarrollo

Las modificaciones en los componentes de la pared celular y en los residuos de pectinas tienen un papel importante en la iniciación de la respuesta de la microspora en relación al destino celular y al desarrollo.

Se han realizado citoquímicas con Calcofluor White para el estudio de los componentes celulósicos de la pared celular, sobre cortes semifinos de Historesin Plus en las principales etapas del desarrollo gametofítico (anteras en fase de

microspora joven, microspora vacuolada y polen maduro) y las primeras fases del desarrollo embriogénico de *Brassica napus*.

Durante el desarrollo gametofítico *in vivo*, en las fases de microspora joven y microspora vacuolada, la tinción con Calcofluor White muestra una señal de fluorescencia específica en las paredes celulares del tejido somático de la antera, mientras que las paredes de la microspora no muestran señal (Fig.4.11-A). Después de la primera mitosis del polen, la pared de la célula generativa recién formada, aparece teñida específicamente con Calcofluor White, como una fina línea fluorescente (Fig.4.11-C). En el polen maduro, no se observa señal fluorescente en la pared celular, excepto en las aperturas (regiones de pared engrosada por donde germina el tubo polínico), que muestran una fluorescencia específica en la parte interna (Fig.4.11-E). Así mismo, tampoco se observó tinción de la capa interna del grano de polen, la intina, en ninguna fase el desarrollo gametofítico (Figs.4.11-A,C,E).

Figura 4.11. Tinción fluorescente con Calcofluor White durante el desarrollo gametofítico de *Brassica napus*:

A,B: Antera en fase de microspora joven; C,D: Antera en fase de microspora vacuolada; E,F: Antera en fase de polen bicelular; B,D,F: las mismas secciones observadas bajo contraste de fase. A,C,E: Citoquímica con Calcofluor White: A: no se observa fluorescencia en la pared de la microspora joven, solo en las paredes de las células somáticas de la antera. C: Señal específica de Calcofluor en la pared recién formada de la célula generativa (flecha). E: Señal específica de Calcofluor en las región de la pared de las aperturas del polen. CW: Calcofluor White; PA: pared de la antera; CF: Contraste de fase.

Figura 4.12. Tinción fluorescente con Calcofluor White durante el desarrollo embriogénico de *Brassica napus*:

A: Vista panorámica de las microsporas tras el aislamiento. B: Vista panorámica de las microsporas en cultivo transcurridos 4 días: solo las microsporas reprogramadas presentan señal fluorescente en sus paredes celulares. C-F: detalles de proembriones derivados de microsporas con paredes teñidas diferencialmente con Calcofluor. Barras: A,B 50µm; C-J: 10µm.

Por otro lado, en el desarrollo embriogénico *in vitro* de la colza, se observa un comportamiento diferencial frente a la tinción de Calcofluor White. En la etapa inicial del cultivo, enriquecida en microsporas en fase de microspora vacuolada, no se

observa ninguna señal fluorescente con esta citoquímica (Fig.4.12-A). Sin embargo, tras 4 ó 5 días en cultivo, se observa una población celular muy heterogénea, compuesta por estructuras que han cambiado su programa de desarrollo hacia una ruta embriogénica, frente a células que no han respondido al estrés inductor. En este caso, se observa que sólo las paredes de las microsporas que han cambiado su ruta y de las estructuras multicelulares derivadas de microsporas muestran una fluorescencia específica con la tinción de Calcofluor apareciendo el resto de las estructuras negativas a esta técnica citoquímica (Fig.4.12-B).

Las microsporas positivas a la tinción con Calcofluor, muestran una intensa fluorescencia en la pared periférica localizada debajo de la exina. Las paredes divisorias internas de estructuras multicelulares también aparecen intensamente teñidas (Fig.4.12-C,B,E). Sin embargo, en proembriones más avanzados en el desarrollo, el marcado de estas paredes es más débil (Fig.4.12-F).

4.1.5 Caracterización celular de las primeras etapas de la embriogénesis del polen en olivo (*Olea europea L*)

La reprogramación de microsporas a embriogénesis conlleva determinados cambios que afectan a la organización estructural y a la actividad celular, que pueden ser considerados como marcadores del proceso de embriogénesis.

En esta Tesis, se realizó la caracterización celular e identificación de marcadores tempranos en otra especie de gran interés económico, el olivo, en la que se ha desarrollado un sistema *in vitro* de microsporas aisladas para inducción a embriogénesis (Bueno et al. 2005).

Con objeto de identificar los cambios celulares que tienen lugar en las microsporas del olivo tras su reprogramación a embriogénesis y en las primeras estructuras multicelulares derivadas de polen que aparecen en los cultivos, se realizó un estudio similar al descrito en *Brassica napus* para identificar la acumulación de almidón, la aparición de divisiones simétricas, formación de nuevas paredes celulares, población

ribosómica y cambios en componentes de la pared celular, estudio que también sirvió como análisis comparativo con los resultados obtenidos en la colza.

Los resultados muestran cambios celulares definidos, algunos de ellos, característicos de proliferación celular, que se pueden considerar como marcadores tempranos del proceso de embriogénesis a partir de la microspora del olivo.

4.1.5.1 Monitorización del desarrollo gametofítico *in vivo* frente al desarrollo embriogénico *in vitro* del polen en olivo

Al igual que en *Brassica napus*, también se llevó a cabo la monitorización de los cambios que tienen lugar en ambos programas del desarrollo del polen de olivo mediante las citoquímicas e inmunocitoquímicas previamente descritas (Apartado 4.1.4.1) sobre cortes semifinos de Historesin Plus.

Para la caracterización de la ruta gametofítica *in vivo*, se seleccionaron anteras correspondientes a las fases de microspora joven, microspora vacuolada y polen bicelular maduro.

Tras la liberación de la tétrada, las microsporas desarrollan una gran vacuola que ocupa la mayor parte del citoplasma y empuja al núcleo a una posición periférica en la célula (Fig.4.13-A). La inmunofluorescencia con anti-RNA en esta fase muestra una intensa señal citoplásmica (Fig.4.13-D), indicativo de una abundante población ribosómica. Después de la primera división mitótica, se forma el grano de polen bicelular (Fig.4.13-B). Inicialmente, la célula generativa se localiza en la periferia de la célula, en contacto con la pared del polen, la exina. Esta célula presenta una cromatina más condensada, tal y como se observa en la tinción con DAPI (Fig.4.13-H). Por otro lado, el núcleo de la célula vegetativa ocupa una posición central y presenta una cromatina más descondensada, que se refleja en una menor fluorescencia en la tinción con DAPI (Fig.4.13-B,H). El citoplasma de la célula vegetativa, muestra pequeñas vacuolas (Fig.4.13-B), así como una intensa señal en la

inmunofluorescencia con anti-RNA (Fig.4.13-B,E). Ambos núcleos están libres de señal fluorescente, excepto los nucleolos.

Figura 4.13. Desarrollo gametofítico *in vivo* de *Olea europaea*.

A,D,G,J: microspora vacuolada; B,E,H,K: polen bicelular joven; C,F,I,L: Polen bicelular maduro. A-C: Citoquímica con azul de toluidina para visualizar la estructura general. D-F: Inmunofluorescencia con anti-RNA. G-I: Citoquímica con DAPI específica para visualizar núcleos. J-L: Citoquímica para almidón. V: vacuola; VN: núcleo vegetativo, G: núcleo generativo; flechas: nucleolo. Barras: 10µm.

Más tarde, en estadios de polen más avanzados en el proceso de maduración, la célula generativa migra al centro del grano de polen (Fig.4.13-C,I) y el citoplasma muestra una abundante población ribosómica (Fig.4.13-C,F).

Los controles de la inmunofluorescencia realizados eliminando el primer anticuerpo, no muestran ninguna señal (datos no mostrados).

La citoquímica de yoduro potásico para almidón, reveló la dinámica de acumulación de almidón durante el desarrollo gametofítico. En la fase de microspora vacuolada, no hay acumulación de almidón (Fig.4.13-J), mientras que en estadios posteriores el acúmulo de almidón en el citoplasma de la célula vegetativa aumenta, indicando una progresiva acumulación de depósitos de almidón durante la maduración del polen (Fig.4.13-K,L).

Para la caracterización celular de la ruta embriogénica del olivo, se recogieron muestras a los tres y seis meses de la puesta en cultivo, ya que en esta especie leñosa los tiempos de desarrollo con mucho más largos (Bueno et al. 2005) y se analizaron mediante aplastados con DAPI (Apartado 3.2.4.1) para evaluar el número de núcleos de las estructuras embriogénicas derivadas de granos de polen. El análisis mediante microscopio confocal reveló estructuras con dos, tres y cuatro núcleos (Fig.4.14) todavía rodeadas por la exina, tal y como se muestra en las imágenes de DIC correspondientes (Fig.4.14-E-H)

Los núcleos de estas microsporas (Fig.4.14-B) son similares en tamaño, forma y grado de condensación cromatínica, lo que sugiere que se formaron a partir de una división simétrica, al contrario de lo que ocurre en el caso del polen bicelular que se

forma a partir de una división asimétrica durante el desarrollo gametofítico (Fig.4.13-H,I). Estas estructuras multicelulares derivadas de polen o proembriones, se encontraron tanto en cultivos de 3 como de 6 meses de antigüedad, indicando una elevada asincronía en la respuesta a embriogénesis de las microsporas.

Figura 4.14. Divisiones nucleares en microsporas en cultivo *in vitro* y formación de estructuras derivadas de microsporas.

A-D: Citoquímica con DPAI, específica para núcleos. E-H: imágenes obtenidas mediante contraste diferencia de Nomarsky mostrando la exina de la microspora. Microsporas con 2, 3 y 4 núcleos con tamaño y grado de condensación cromatínica similar. Barras: 10µm.

Por otro lado, se tomaron muestras de los cultivos *in vitro*, se fijaron y se procesaron para realizar un análisis en microscopía óptica similar al realizado para el desarrollo gametofítico. Las citoquímicas realizadas muestran una población celular en el cultivo muy heterogénea (Fig.4.15-A,D). En las secciones teñidas con azul de toluidina, se observan algunas microsporas muertas (vacías) microsporas con forma irregular junto con otras estructuras de mayor tamaño y una pared celular más contrastada (Fig.4.15-A). Algunas de estas estructuras, presentan paredes internas (Fig.4.15-B) indicativo de que están ocurriendo divisiones celulares durante el cultivo en algunas microsporas y se han formado estructuras multicelulares.

La citoquímica con yoduro potásico, muestra un elevado contenido de almidón en algunas de las microsporas del cultivo (Fig.4.15-D) que poseen elevado número de amiloplastos, que aparecen como puntos citoplásmicos oscuros (Fig.4.15-C) igual que el polen maduro en el desarrollo gametofítico *in vivo*. Sin embargo, otra parte de las microsporas del cultivo, no muestran acumulación de almidón. Se observa que en las estructuras derivadas de microsporas con paredes celulares internas, no hay depósitos de almidón.

Al contrario, la inmunofluorescencia muestra una elevada señal citoplásmica en estas estructuras multicelulares (Fig.4.15-C) indicando una población ribosomal muy elevada, característica de una intensa actividad metabólica.

Figura 4.15. Estructura general, inmunofluorescencia con anti-RNA y depósitos de almidón en microsporas en cultivo.

A,B: Citoquímica con azul de toluidina; C: Inmunofluorescencia con anti-RNA; D,E: Citoquímica para almidón. A: vista panorámica de microsporas en cultivo, donde se observan diferentes estructuras. B: detalle de una microspora con paredes internas que tabican el citoplasma; C: Detalle de inmunofluorescencia con anti-RNA de un proembrión de dos células con gran señal citoplásmica. D: vista panorámica de microsporas en cultivo con presencia y ausencia de depósitos de almidón. E: detalle de microsporas en cultivo con alto contenido en almidón. Barras: A,D: 50µm, B,C,E:10µm.

4.1.5.2 Cambios a nivel de pared celular en las estructuras multicelulares derivadas de microsporas en olivo

Dada la importancia de las modificaciones en los componentes de la pared celular y en los residuos de pectinas en la iniciación de la respuesta celular de la microspora en relación al destino celular y al desarrollo, se realizó un estudio de la composición diferencial de la pared celular de los proembriones derivados de las microsporas mediante citoquímicas con Calcofluor White para componentes celulósicos e inmunocitoquímicas con los anticuerpos monoclonales Jim 7 y Jim 5 (Knox 1997), que reconocen pectinas altamente esterificadas y pectinas no esterificadas, respectivamente.

Figura 4.16. Tinción fluorescente con Calcofluor White durante el desarrollo gametofítico de *Ola europaea*.

A,D: Antera en fase de microspora joven; B,E: Antera en fase de microspora vacuolada; C,F: Antera en fase de polen bicelular; A,B,C: las mismas secciones observadas bajo contraste de fase. D, E; F: Citoquímica con Calcofluor White: D: no se observa fluorescencia en la pared de la microspora joven, solo en las paredes de las células somáticas de la antera. E: Señal específica de Calcofluor en la pared recién formada de la célula generativa (flecha). F: Señal específica de Calcofluor en la región de la pared de las aperturas del polen. Barras: 10µm. CW: Calcofluor White; PA: pared de la antera; CF: Contraste de fase.

En la citoquímica con Calcofluor White, se obtuvieron resultados análogos a los descritos en la colza, tanto en el desarrollo gametofítico del polen como en las primeras etapas del desarrollo embriogénico.

Al inicio del desarrollo gametofítico, en anteras correspondientes a la fase de microspora joven, la solución de Calcofluor White sólo tiñe las paredes de la antera,

sin observarse señal fluorescente en las paredes de las microsporas (Fig.4.16-A,D). Sin embargo, tras la primera mitosis, se observa que la pared de la célula generativa responde positivamente a la tinción con Calcofluor White y aparece como una fina línea fluorescente (Fig.4.16-B,E). Por último, en la fase de polen maduro, la solución de Calcofluor White tiñe específicamente la pared interna (intina) de las aperturas del grano de polen (Fig.4.16-C,F).

Figura 4.17. Tinción fluorescente con Calcofluor White durante el desarrollo embriogénico de *Olea europea*.

A, B: Vista panorámica de las microsporas en cultivo: presencia de microsporas con señal fluorescente en la pared celular, frente a otras que no. Algunas microsporas presentan señal fluorescente en las paredes internas que tabican el citoplasma. C-F: detalles de proembriones derivados de microsporas con paredes teñidas diferencialmente con Calcofluor. Barras: A, B 50µm; C-F: 10µm.

En el desarrollo embriogénico, se observa que sólo presentan señal fluorescente frente a esta tinción, las microsporas que han cambiado su ruta o estructuras multicelulares derivadas de microsporas con paredes internas divisorias, que también responden positivamente a esta tinción (Fig.4.17).

Por otro lado, la inmunocitoquímica realizada con los anticuerpos Jim 5 y Jim 7 en las muestras procedentes de los cultivos de microsporas, muestra un mayor marcado con el anticuerpo Jim 5, tanto en las paredes periféricas debajo de la exina, como en las paredes divisorias interiores (Fig.4.18-A-C), de aquellas estructuras multicelulares derivadas de microsporas, lo que indica que las células de las paredes de las estructuras multicelulares derivadas de microsporas, son ricas en pectinas poco esterificadas. Por otro lado, con el anticuerpo Jim 7, que reconoce pectinas altamente esterificadas no se observa marcaje en estas zonas (Fig.4.18-D), mientras que los controles positivos con el mismo anticuerpo realizados sobre tejido somático de antera, mostraron una alta señal en sus paredes celulares (Fig.4.18-E). Los controles eliminando el primer anticuerpo no proporcionaron marcado en ningún caso (Fig.4.18-F).

Figura 4.18. Inmunolocalización de pectinas esterificadas y no esterificadas con anticuerpos Jim7 y Jim 5 en microsporas en cultivo.

A: Inmunolocalización de pectinas no esterificadas mediante el anticuerpo Jim5 exhibe una reacción positiva en forma de precipitados oscuros sobre las paredes celulares de las microsporas y los proembriones derivados de microsporas con paredes internas que tabican el citoplasma. B, C: detalles de la inmunoreacción con Jim5 en proembriones derivados de microsporas. D: inmunolocalización de pectinas esterificadas mediante el anticuerpo Jim7. E: Control positivo de la inmunoreacción con Jim7 realizado en células somáticas de la pared de la antera. F: Control negativo eliminando el anticuerpo primario. Barras: A,D: 50 μ m, B,C,F,E: 10 μ m.

4.2 MODIFICACIONES EN LOS COMPONENTES DE LA PARED CELULAR DURANTE LA INDUCCIÓN Y DESARROLLO DE LA EMBRIOGÉNESIS DEL POLEN

4.2.1 Cambios en la esterificación de pectinas de la pared celular durante los dos programas de desarrollo del polen

La proporción de pectinas esterificadas y no esterificadas en la pared celular de células vegetales está relacionada con procesos de desarrollo, en relación a proliferación y diferenciación.

En esta Tesis se han analizado los niveles y la distribución de pectinas esterificadas y no esterificadas, mediante “Dot blot” e inmunolocalización con los anticuerpos Jim 7 y Jim 5 como marcadores de pectinas esterificadas y no esterificadas, respectivamente, durante los procesos de desarrollo del polen y su reprogramación a embriogénesis.

Estos estudios se llevaron a cabo en distintas fases del desarrollo gametofítico, así como en los principales puntos del desarrollo embriogénico de microsporas, en cultivos *in vitro*.

Los resultados muestran un patrón de distribución diferencial de pectinas esterificadas y no esterificadas en ambos procesos de desarrollo.

4.2.1.1 Análisis de la presencia de pectinas esterificadas y no esterificadas mediante “immuno dot blot”

Se realizó un “immuno dot blot” con los anticuerpos Jim 7 y Jim 5, que reconocen pectinas esterificadas y no esterificadas, respectivamente, con objeto de detectar diferencias en los niveles de esterificación de las pectinas de la pared celular durante los dos programas desarrollo del polen.

Se analizaron muestras de microsporas aisladas de anteras extraídas de yemas florales en las etapas de microspora vacuolada y polen maduro correspondientes al desarrollo gametofítico, frente a las diferentes etapas del desarrollo embriogénico del polen en *Brassica napus* (etapa de proembrión con y sin exina, embrión globular, torpedo y embrión cotiledonar maduro).

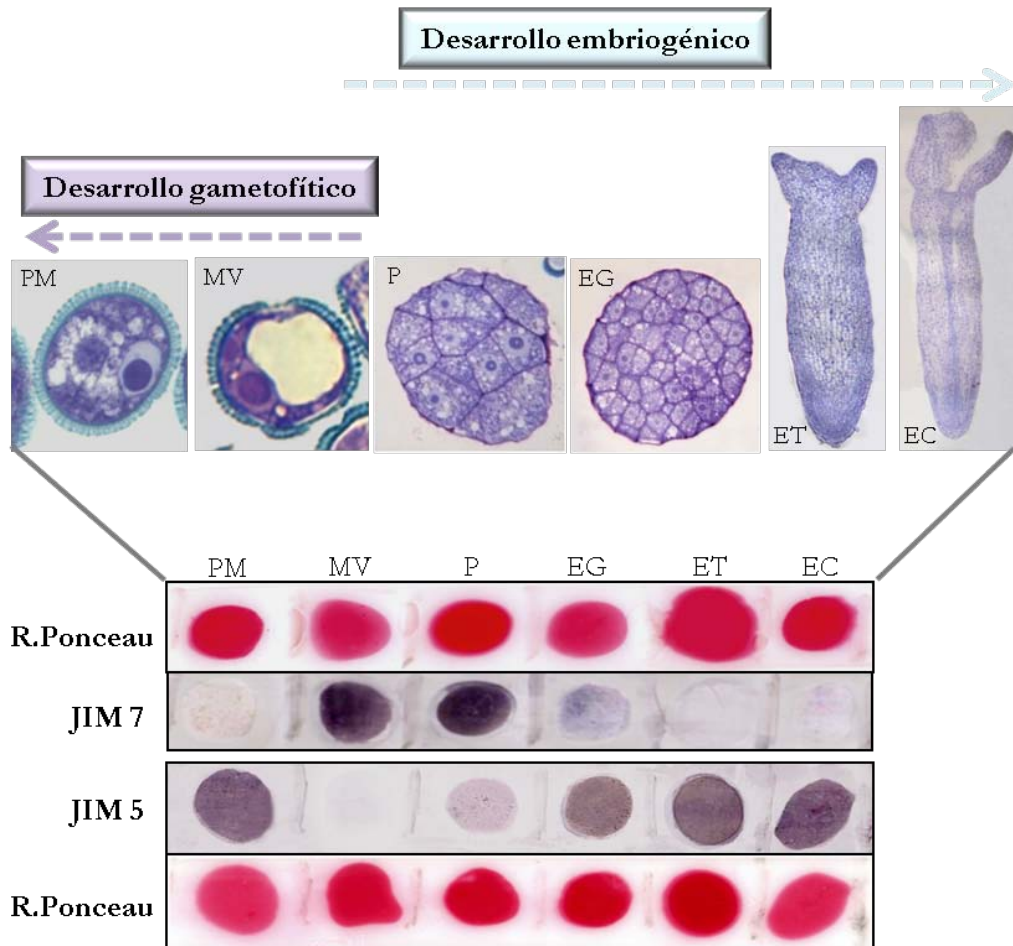


Figura 4.19. Localización de pectinas esterificadas y no esterificadas en las principales etapas del desarrollo gametofítico y embriogénico de *Brassica napus*, mediante Dot blot.

PM: Polen maduro; MV: microspora vacuolada; P: proembrión; EG: embrión globular; ET: embrión torpedo; EC: embrión cotiledonar. Jim7: anticuerpo frente a pectinas altamente esterificadas. Jim5: anticuerpo frente a pectinas no esterificadas. Se empleó la tinción con Rojo Ponceau como control de carga.

Se realizó una tinción con Rojo Ponceau como control de carga de los extractos de proteínas cargados sobre la misma membrana de nitrocelulosa en la que se realizó después el “immuno dot blot” (Apartado 3.6). En la figura 4.19, se observa una intensidad de marcado con Rojo Ponceau similar en todos los casos, lo que indica que no hay diferencias en la cantidad de muestra cargada en la membrana para cada punto analizado.

La fase de microspora vacuolada muestra una señal muy intensa con el anticuerpo Jim 7, mientras que con el anticuerpo Jim 5 no presenta ninguna señal. Por otro lado, en la fase de polen maduro se observa el resultado contrario (Fig.4.19).

En las primeras etapas del desarrollo embriogénico del polen, caracterizadas por ser etapas muy proliferativas, donde predominan estructuras multicelulares que acaban de romper la exina, o están a punto de hacerlo, se observa una intensa señal con el anticuerpo Jim 7, mientras que la señal con el anticuerpo Jim 5 es mucho más débil. Según avanza el desarrollo embriogénico, empiezan a coexistir los procesos de proliferación y diferenciación, de manera que en la etapa correspondiente al embrión globular, se observa una disminución en la señal con el anticuerpo Jim 7 y un aumento en la señal con el anticuerpo Jim 5, siendo predominante la señal detectada con este último (Fig.4.19). A partir de este punto, en las etapas correspondientes al embrión torpedo y cotiledonar el incremento de la proporción de pectinas no esterificadas frente a pectinas esterificadas se hace más notable, de manera que la señal obtenida con el anticuerpo Jim 7 en estas fases es prácticamente inapreciable (Fig.4.19).

4.2.1.2 Inmunolocalización de pectinas esterificadas y no esterificadas

La inmunolocalización de pectinas esterificadas y no esterificadas se realizó mediante el empleo de los anticuerpos Jim 5 y Jim 7 respectivamente, en los mismos puntos del desarrollo gametofítico y embriogénico del apartado anterior, a partir de inmunofluorescencias y posterior análisis en microscopio láser confocal.

El estudio en el desarrollo gametofítico se llevó a cabo sobre criocortes semifinos de anteras correspondientes a las etapas de microspora vacuolada y polen maduro.

Figura 4.20. Inmunofluorescencia con anticuerpos Jim5 y Jim7 durante el desarrollo gametofítico de *Brassica napus* sobre criocortes semifinos.

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la localización de Jim5 y Jim7 marcada con Alexa fluor 488. A,C,E,G: microspora vacuolada; B,D,F,H: polen maduro. A,B,E,F: imágenes obtenidas mediante contraste diferencial de Nomarsky. C,D: Localización de pectinas altamente esterificadas con Jim7. G,H: Localización de pectinas no esterificadas con Jim5. Barras: 10 μ m.

La intina, capa subyacente a la exina, de la microspora vacuolada presenta una intensa señal de inmunofluorescencia con el anticuerpo Jim 7, indicando un alto contenido en pectinas esterificadas (Fig.4.20-C), mientras que muestra ausencia total de señal con el anticuerpo Jim 5 (Fig.4.20-G). Por otro lado, en el polen maduro, se observa el resultado contrario, hay una presencia predominante de pectinas no esterificadas, característico de células en diferenciación (Figs.4.20-D,H). En ambos casos, la señal fluorescente se localiza en la capa de la intina, quedando la exina totalmente libre de marca (Figs.4.20-A,B,E,F).

Por otro lado, la inmunolocalización de pectinas esterificadas y no esterificadas durante el desarrollo embriogénico, se llevó a cabo en muestras correspondientes a las primeras etapas del desarrollo, así como en embriones globulares, torpedo y cotiledonares. Para ello, se emplearon cortes semifinos, de criostato o vibratomo, según los requerimientos en cada caso.

Las paredes celulares en las primeras etapas del desarrollo embriogénico del polen, marcadas principalmente por procesos de proliferación celular, muestran una intensa señal fluorescente con el anticuerpo Jim 7, mientras que no presentan señal con el anticuerpo Jim 5 (Figs.4.20,4.21,4.22 y 4.23). No obstante, según avanza el proceso de embriogénesis y aparecen los primeros embriones globulares, comienzan a acontecer procesos de diferenciación, principalmente en las capas externas, que darán lugar a la protodermis (Figs.4.25-A,B). A partir de este momento, se observa una señal fluorescente diferencial con ambos anticuerpos, localizándose una mayor

presencia de pectinas esterificadas, marcadas con Jim 7, en las zonas internas del embrión, caracterizadas por ser células en proliferación, mientras que hay una mayor presencia de pectinas no esterificadas, marcadas con Jim 5, en las paredes de zonas externas del mismo, asociadas con una mayor diferenciación (Figs.4.25-A,B).

Figura 4.21. Inmunofluorescencia con el anticuerpo Jim7 durante las primeras etapas del desarrollo embriogénico de *Brassica napus* sobre criocortes semifinos.

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la localización de Jim7 marcada con Alexa fluor 488. A,B: microspora vacuolada tras el aislamiento. C,D,E,F: proembrión multicelular rodeado por la exina. A,C,E: imágenes obtenidas mediante contraste diferencial de Nomarsky. B,D,F: Localización de pectinas altamente esterificadas con Jim7. Barras: 10 μm .

Figura 4.22. Inmunofluorescencia con el anticuerpo Jim5 durante las primeras etapas del desarrollo embriogénico de *Brassica napus* sobre criocortes semifinos.

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la localización de Jim5 marcada con Alexa fluor 488. A,B: microspora vacuolada tras el aislamiento. C,D,E,F: proembrión multicelular rodeado por la exina. A,C,E: imágenes obtenidas mediante contraste diferencial de Nomarsky. B,D,F: Localización de pectinas no esterificadas con Jim5. Barras: 10 μm .

Figura 4.23. Inmunofluorescencia con el anticuerpo Jim7 durante etapas más avanzadas del desarrollo embriogénico de *Brassica napus* sobre criocortes semifinos.

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la localización de Jim7 marcada con Alexa fluor 488. A,B,C,D,E,F: proembrión multicelular sin exina. A,B: proembriones multicelulares en los que todavía se observan restos de exina. A,C,E: imágenes obtenidas mediante contraste diferencial de Nomarsky. B,D,F: Localización de pectinas altamente esterificadas con Jim7. Barras: A,B: 10 μm , C,D,E,F: 25 μm .

Figura 4.24. Inmunofluorescencia con el anticuerpo Jim5 durante etapas más avanzadas del desarrollo embriogénico de *Brassica napus* sobre criocortes semifinos.

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la localización de Jim5 marcada con Alexa fluor 488. A,B,C,E,F: proembrión multicelular sin exina. A,B: proembriones multicelulares en los que todavía se observan restos de exina. A,C,E: imágenes obtenidas mediante contraste diferencial de Nomarsky. B,D,F: Localización de pectinas no esterificadas con Jim5. Barras: A,B: 10 μm , C,D,E,F: 25 μm .

Figura 4.25. Inmunofluorescencia con los anticuerpos Jim5 y Jim7 en las etapas de embrión globular y embrión torpedo del desarrollo embriogénico de *Brassica napus* sobre cortes de criostato de 40 μm .

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la localización de Jim5 y Jim7 marcada con Alexa fluor 488. A,B: embrión globular. C,D: embrión torpedo.

A,C: Localización de pectinas altamente esterificadas con Jim7. B,D: Localización de pectinas no esterificadas con Jim7. Barras: A,B: 75 μm . C,D: 50 μm .

Figura 4.26. Inmunofluorescencia con los anticuerpos Jim5 y Jim7 en la etapa de embrión cotiledonar del desarrollo embriogénico de *Brassica napus* sobre cortes de vibratomo de 50 μm (parte cotiledonar).

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la localización de Jim5 y Jim7 marcada con Alexa fluor 488. A,C: imagen panorámica de la parte cotiledonar del embrión. A: localización de pectinas no esterificadas con Jim5. B: detalle de la localización con Jim5. C: Localización de pectinas altamente esterificadas con Jim7. D: detalle de la localización con Jim7.

Figura 4.27. Inmunofluorescencia con los anticuerpos Jim5 y Jim7 en la etapa de embrión cotiledonar del desarrollo embriogénico de *Brassica napus* sobre cortes de vibratomo de 50 μm (parte radicular).

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la localización de Jim5 y Jim7 marcada con Alexa fluor 488. A,C: imagen panorámica de la parte radicular del embrión. A: localización de pectinas no esterificadas con Jim5. B: detalle de la localización con Jim5. C: Localización de pectinas altamente esterificadas con Jim7. D: detalle de la localización con Jim7.

Este fenómeno se observa también en el embrión torpedo y embrión cotiledonar maduro, donde se aprecia una mayor abundancia de pectinas no esterificadas, marcadas con Jim 5, quedando restringida la presencia de pectinas altamente esterificadas, marcadas con Jim 7, exclusivamente a paredes celulares de las zonas de proliferación existentes en estas fases del desarrollo embrionario (Figs.4.25-B,C; 4.26 y 4.27).

4.2.2 Análisis del patrón de expresión de pectinmetilesterasa durante los dos programas de desarrollo del grano de polen

La enzima pectinmetilesterasa (PME), es responsable de la desmetilesterificación de las pectinas presentes en la pared celular. En esta memoria, se han analizado los niveles de expresión de PME mediante RT-PCR semicuantitativa, en etapas específicas del desarrollo del polen y de los cultivos embriogénicos. En paralelo, también se analizó la distribución diferencial de los transcritos de la misma, mediante hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), en las etapas mencionadas.

Los resultados muestran una asociación entre el incremento de los niveles de expresión de *BnPME* y los procesos de diferenciación en el embrión.

4.2.2.1 Análisis del patrón de expresión de PME mediante RT-PCR semicuantitativa

Se realizó un análisis de expresión de PME mediante RT-PCR semicuantitativa, comparando los dos programas de desarrollo del polen. Para ello, se analizaron las etapas de microspora vacuolada y polen maduro, correspondientes al desarrollo gametofítico (a partir de microsporas aisladas de anteras extraídas de yemas florales en las correspondientes fases), frente a diferentes etapas del desarrollo embriogénico del polen de *Brassica napus*. Los cambios en el nivel de expresión de *BnPME*, se determinaron empleando la expresión del gen de la actina, *BnACT-II*, como control constitutivo.

En la figura 4.28, se observa que la expresión de *BnPME* no cambia durante el desarrollo gametofítico del polen (se registran valores normalizados de expresión relativa de 1,03 en la etapa de polen maduro frente a 1,00 en la etapa de microspora vacuolada). Asimismo, dichos niveles también se mantienen invariables durante las primeras etapas de embriogénesis hasta la etapa del embrión globular, momento en el que se aprecia un incremento de los mismos (expresión relativa de 1,5), debido al inicio de procesos de diferenciación. Finalmente, en la etapa de embrión cotiledonar maduro, se observa un incremento más significativo, donde se registran niveles de expresión de *BnPME* con valores relativos de 1,97 (Fig.4.28).

Figura 4.28. Análisis de la expresión relativa de PME durante el desarrollo gametofítico y embriogénico de *Brassica napus*, mediante RT-PCR semicuantitativa.

Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (1%) con bromuro de etidio 1mg/ml. La intensidad de las bandas se cuantificó en el analizador de imágenes con el software *Quantity one* de Bio-Rad. Los resultados se expresan como la razón entre el cDNA y la ACTII utilizada como control interno después de su normalización y expresa el número de veces respecto al control, al que se asigna el valor 1. ACTII: actina II. *BnPME*: Pectinmetilesterasa de *Brassica napus*.

4.2.2.2 Análisis del patrón de expresión de PME mediante FISH

Para este estudio se empleó una sonda RNA sentido y otra antisentido, marcadas con digoxigenina, tal y como se describió en el apartado 3.8.2. El resultado de la hibridación se observó en el microscopio láser confocal.

El estudio de expresión mediante FISH durante el desarrollo gametofítico, se llevó a cabo sobre criocortes semifinos de anteras correspondientes a las etapas de microspora vacuolada y polen maduro.

La hibridación con la sonda antisentido, muestra un bajo nivel de expresión de *BnPME* durante el proceso de maduración del grano de polen de *Brassica napus*. En las dos etapas estudiadas, se observa una baja señal de hibridación, lo que indica una escasa presencia de transcritos en el citoplasma, en ambos puntos del desarrollo (Fig.4.29-C,D), observándose núcleos y vacuolas totalmente negativos.

Por otro lado, la hibridación control con la sonda sentido, no muestra ningún tipo de señal de hibridación y tan sólo se observa la fluorescencia azul correspondiente al DAPI, utilizado como marcador de los núcleos (Fig.4.29-E,F).

Por otro lado, la inmunolocalización de pectinas esterificadas y no esterificadas durante el desarrollo embriogénico, se llevó a cabo en muestras correspondientes a las primeras etapas del desarrollo, así como en embriones globulares, torpedo y cotiledonares. Para ello, se emplearon cortes semifinos, de criostato o vibratomo, según los requerimientos en cada caso.

El análisis en el microscopio láser confocal, muestra que las primeras etapas del desarrollo embriogénico del polen, también poseen bajos niveles de expresión de *BnPME* (Fig.4.30-A). Según avanza el proceso de desarrollo y se produce la rotura de la exina de aquellas estructuras multicelulares de mayor tamaño, se aprecia un incremento en los niveles de expresión génica de esta enzima (Fig.4.30-C,D) revelado por una mayor señal de fluorescencia en el citoplasma. No obstante, el incremento de expresión más significativo se observa tras la aparición de los primeros embriones globulares (Fig.4.31-A). En esta etapa del desarrollo, se aprecia una señal de hibridación muy intensa a nivel citoplásmico, dejando los núcleos libres de marcado, lo que apoya la especificidad de la señal de hibridación (Fig.4.31-C).

Figura 4.29. Localización de transcritos de *BnPME* durante el desarrollo gametofítico de *Brassica napus* mediante hibridación *in situ* sobre criocortes semifinos de anteras.

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la digoxigenina marcada con Alexa fluor 488, utilizada como marcador de la hibridación. A, C, E; microspora vacuolada. B, D, F: polen bicelular maduro. A, B: imágenes obtenidas mediante contraste diferencial de Nomarsky. C, D: hibridación con sonda antisentido. E, F: hibridación con la sonda sentido como control negativo de la hibridación. Barras: 10 μm .

Figura 4.30. Localización de transcritos de *BnPME* durante el desarrollo embriogénico de *Brassica napus*, mediante hibridación *in situ* sobre criocortes semifinos de estructuras multicelulares tempranas derivadas microsporas.

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la digoxigenina marcada con Alexa fluor 488, utilizada como marcador de la hibridación. A, C, E: hibridación con sonda antisentido; B, D, F; imágenes obtenidas mediante contraste diferencial de Nomarsky. A, B; proembrión que acaba de romper la exina; C, D; proembrión más avanzado. E,F; embrión globular joven. D, F. Barras: 20 μm .

Figura 4.31. Localización de transcritos de *BnPME* en embrión globular de *Brassica napus*, mediante hibridación *in situ* sobre cortes en criostato de 40 μm .

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la digoxigenina marcada con Alexa fluor 488, utilizada como marcador de la hibridación. A; imagen panorámica de la hibridación con sonda antisentido. B; imagen panorámica obtenida mediante contraste diferencial de Nomarsky. C; detalle de la señal de hibridación. Barras: A, B: 75 μm , C: 10 μm .

Figura 4.32. Localización de transcritos de *BnPME* en embrión torpedo de *Brassica napus*, mediante hibridación *in situ* sobre cortes en criostato de 40 μm (Parte cotiledonar).

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la digoxigenina marcada con Alexa fluor 488, utilizada como marcador de la hibridación. A; hibridación con sonda antisentido. B; imagen obtenida mediante contraste diferencial de Nomarsky. C; detalle de la señal de hibridación. Barras: A, B: 25 μm .

4.33. Localización de transcritos de *BnPME* en embrión torpedo derivado de microsporas de *Brassica napus*, mediante hibridación *in situ* sobre cortes en criostato de 40 μm (Parte radicular).

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la digoxigenina marcada con Alexa fluor 488, utilizada como marcador de la hibridación. A; hibridación con sonda antisentido. B; imagen obtenida mediante contraste diferencial de Nomarsky. C; detalle de la señal de hibridación. Barras: A, B: 25 μm .

4.34. Localización de transcritos de *BnPME* en embrión cotiledonar derivado de microsporas de *Brassica napus*, mediante hibridación *in situ* sobre cortes en criostato de 40 μm (Parte cotiledonar I).

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la digoxigenina marcada con Alexa fluor 488, utilizada como marcador de la hibridación. A; hibridación con sonda antisentido. B; imagen obtenida mediante contraste diferencial de Nomarsky. C; detalle de la señal de hibridación. Barras: A, B: 50 μm .

4.35. Localización de transcritos de *BnPME* en embrión cotiledonar derivado de microsporas de *Brassica napus*, mediante hibridación *in situ* sobre cortes en criostato de 40 μm (Parte cotiledonar II).

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la digoxigenina marcada con Alexa fluor 488, utilizada como marcador de la hibridación. A; hibridación con sonda antisentido. B; imagen obtenida mediante contraste diferencial de Nomarsky. C; detalle de la señal de hibridación. Barras: A, B: 50 μm .

4.36. Localización de transcritos de *BnPME* en embrión cotiledonar derivado de microsporas de *Brassica napus*, mediante hibridación *in situ* sobre cortes en criostato de 40 μm (Parte radicular).

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la digoxigenina marcada con Alexa fluor 488, utilizada como marcador de la hibridación. A; hibridación con sonda antisentido. B; imagen obtenida mediante contraste diferencial de Nomarsky. C; detalle de la señal de hibridación. Barras: A, B: 50 μm .

4.37. Localización de transcritos de *BnPME* en embrión cotiledonar cigótico de *Brassica napus*, mediante hibridación *in situ* sobre cortes en criostato de 40 μm (Parte cotiledonar).

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la digoxigenina marcada con Alexa fluor 488, utilizada como marcador de la hibridación. A; hibridación con sonda antisentido. B; imagen obtenida mediante contraste diferencial de Nomarsky. C; detalle de la señal de hibridación. Barras: A, B: 50 μm .

4.38. Localización de transcritos de *BnPME* en embrión cotiledonar cigótico de *Brassica napus*, mediante hibridación *in situ* sobre cortes en criostato de 40 μm (Parte radicular).

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la digoxigenina marcada con Alexa fluor 488, utilizada como marcador de la hibridación. A; hibridación con sonda antisentido. B; imagen obtenida mediante contraste diferencial de Nomarsky. C; detalle de la señal de hibridación. Barras: A, B: 50 μm .

Además, también se observa una distribución diferencial de los transcritos, siendo su presencia, mayor en las células de las capas externas del embrión, más diferenciadas,

mientras que las células del interior muestran una señal de hibridación más débil (Fig.4.31-A).

En la etapa de embrión torpedo, en la parte cotiledonar del mismo, también se observa la distribución diferencial de transcritos descrita en el embrión globular (Fig.4.32-A). Por otro lado, en la parte radicular del mismo, se observa una señal de hibridación citoplásmica más intensa (Fig.4.33-A).

Finalmente, en la etapa de embrión cotiledonar maduro derivado de microsporas, de nuevo se aprecia la diferente distribución de transcritos de PME asociado a las zonas de proliferación y diferenciación. En la parte cotiledonar, se observa que en las regiones más proliferantes, la señal de hibridación con la sonda antisentido es más débil, mientras que en las regiones más diferenciadas, como son las células de las capas más externas del embrión, que forman la epidermis, la presencia de transcritos de *BnPME* en el citoplasma es mucho más abundante (Fig.4.34-A). Esta distribución diferencial queda reflejada en la figura 4.35-A, donde se pueden observar zonas con mayor señal de hibridación frente a zonas con menor señal. Por otro lado, en la parte radicular del embrión cotiledonar derivado de microsporas, la presencia de transcritos de *BnPME* es muy elevada (Fig.4.36-A).

Con objeto de comparación, se analizó la expresión *in situ* de *BnPME* mediante FISH en embriones cotiledonares cigóticos. El patrón de distribución de la señal de hibridación es similar al obtenido en los embriones derivados de polen tanto en regiones cotiledonares como en regiones radiculares (Figs.4.37, 4.38).

4.2.3 Localización subcelular de la enzima pectinmetilesterasa (PME) mediante tecnología GFP

Se realizó la construcción de una proteína fusión combinando la proteína pectinmetilesterasa (PME) con una proteína GFP (PME-GFP) en el vector pF7KWG2, dirigiendo su expresión el promotor 35S. Esta construcción, se integró en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3100 (Apartado 3.10.2) para transformación

transitoria de hojas de tabaco, sistema experimental modelo muy adecuado para sobreexpresión ectópica de genes y análisis *in vivo* de localización subcelular de proteínas acopladas a GFP.

4.39. Representación esquemática de un corte histológico de una hoja.

La nueva construcción se empleó para infiltrar las hojas de *Nicotiana tabacum* para estudios de expresión transitoria de nuestra proteína de interés y su visualización *in vivo* en el microscopio de confocal a las 48 h de su infiltración. Asimismo, se infiltraron hojas de *Nicotiana tabacum* con una construcción control, que incluye la proteína GFP, bajo el mismo promotor 35S pero no la proteína de interés (PME). Como control negativo adicional del experimento, se emplearon hojas de *Nicotiana tabacum* sin infiltrar.

El análisis de la transformación se llevó a cabo a las 48 h de la infiltración a partir de secciones de hoja de 1 cm² de área (aproximadamente) (Apartado 3.10.4) obtenidas de las regiones infiltradas con la construcción PME-GFP. El análisis *in vivo* en el microscopio confocal, mostró una intensa señal fluorescente verde y por tanto, una localización específica de la misma, en paredes celulares del mesófilo de hoja, indicando que la proteína PME después de ser transcrita y procesada es dirigida a la pared donde presumiblemente realizaría su actividad enzimática sobre las pectinas *in muro* (Fig.4.40-E). Los cloroplastos de las células del mesófilo, que exhiben una intensa señal de autofluorescencia roja emitida por la clorofila, se localizan en regiones del citoplasma celular sin señal de PME-GFP.

Por otro lado, la infiltración con la construcción con GFP, proporciona una señal fluorescente verde inespecífica, localizada por todas las células del mesófilo de la hoja, incluso dentro de cloroplastos (Fig.4.40-D). Por otro lado, la hoja empleada como control negativo del experimento, no proporciona ninguna señal de

fluorescencia verde, únicamente la fluorescencia en rojo, empleada como marcador de cloroplastos (Fig.4.40-B).

Cabe destacar la gran diferencia observada en el patrón de distribución de PME-GFP en las paredes celulares de las células del mesófilo lagunar y el mesófilo en empalizada. En la figura 4.41-B, se observa que la distribución de PME en el mesófilo lagunar se manifiesta con una señal más engrosada, sugiriendo la existencia de paredes celulares más gruesas en esta capa, frente a las paredes celulares del mesófilo en empalizada.

También se ha localizado la proteína PME-GFP en las paredes de las células guarda que forman los estomas de la epidermis (Fig.4.42-B). En esta zona se observa una señal verde fluorescente muy intensa, debido al grosor característico de las paredes de estas células.

4.40. Localización subcelular *in vivo* de PME en paredes de las células del mesófilo de hojas de *Nicotiana tabacum* transformadas con la construcción GFP:PME.

En rojo se muestra la autofluorescencia de la planta y en verde la fluorescencia de la proteína GFP. A,B: control negativo a partir de una hoja sin transformar. C,D: control positivo a partir de una hoja transformada con el vector con GFP. A,C: canal rojo. B,D: canal verde. E: hoja transformada con la construcción GFP:PME. Barras: 25 μ m.

4.41. Localización subcelular *in vivo* de PME en paredes de las células del mesófilo en empalizada y lagunar de hojas de *Nicotiana tabacum* transformadas con la construcción GFP:PME.

En rojo se muestra la autofluorescencia de la planta y en verde la fluorescencia de la proteína GFP. A: mesófilo en empalizada de una hoja transformada con la construcción GFP:PME. B: mesófilo en empalizada de una hoja transformada con la construcción GFP:PME. Barras 25 μ m.

4.42. Localización subcelular *in vivo* de PME en paredes de las células guarda de los estomas de hojas de *Nicotiana tabacum* transformadas con la construcción GFP:PME.

En rojo se muestra la autofluorescencia de la planta y en verde la fluorescencia de la proteína GFP. A: representación esquemática de una sección longitudinal de un par de células guarda. B: representación esquemática de una sección transversal de par de células guarda. GFP:PME. C: células guarda de una hoja transformada con la construcción GFP:PME. Barra: 25 μ m.

Por último, también se puede apreciar la distribución de PME-GFP en las paredes de las células epidérmicas (Fig.4.43-B), que siguen el patrón típico de células aplanadas con formas poligonales.

4.43. Localización subcelular *in vivo* de PME en paredes de las células epidérmicas de hojas de *Nicotiana tabacum* transformadas con la construcción GFP:PME.

En rojo se muestra la autofluorescencia de la planta y en verde la fluorescencia de la proteína GFP. A: representación esquemática de las células de la epidermis. B: células epidérmicas de una hoja transformada con la construcción GFP:PME. Barra: 25 μm .

4.3 CAMBIOS EPIGENÉTICOS ASOCIADOS A LA REPROGRAMACIÓN DE LA MICROSPORA A EMBRIOGÉNESIS

4.3.1 Análisis de la metilación del DNA genómico

La metilación de los residuos de citosina del DNA constituye una importante modificación epigenética de la fibra de cromatina, la cual adopta una conformación transcripcionalmente inactiva, que da lugar al silenciamiento génico.

En esta Tesis, se han analizado los niveles y patrones nucleares de metilación del DNA genómico, como marca epigenética del estado funcional de la cromatina, en relación a la arquitectura nuclear durante el desarrollo y embriogénesis del polen.

Estas aproximaciones se han llevado a cabo mediante electroforesis capilar de alta resolución (HPCE) del DNA hidrolizado e inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-5-metildeoxicitidina (5mdC) sobre cortes semifinos de Historesin Plus, analizado posteriormente por microscopía láser confocal.

Ambos estudios se llevaron a cabo en microsporas aisladas de anteras extraídas de yemas florales en diferentes fases del desarrollo del polen, así como en los principales puntos del desarrollo embriogénico a partir de microsporas en cultivo.

4.3.1.1 Cuantificación del nivel de metilación del DNA y su patrón de distribución nuclear durante el desarrollo gametofítico del polen

La cuantificación de los niveles de metilación del DNA genómico mediante HPCE (Apartado 3.5) se llevó a cabo en la etapa de microspora vacuolada y polen maduro en las dos especies de estudio, *Brassica napus* y *Nicotiana tabacum*.

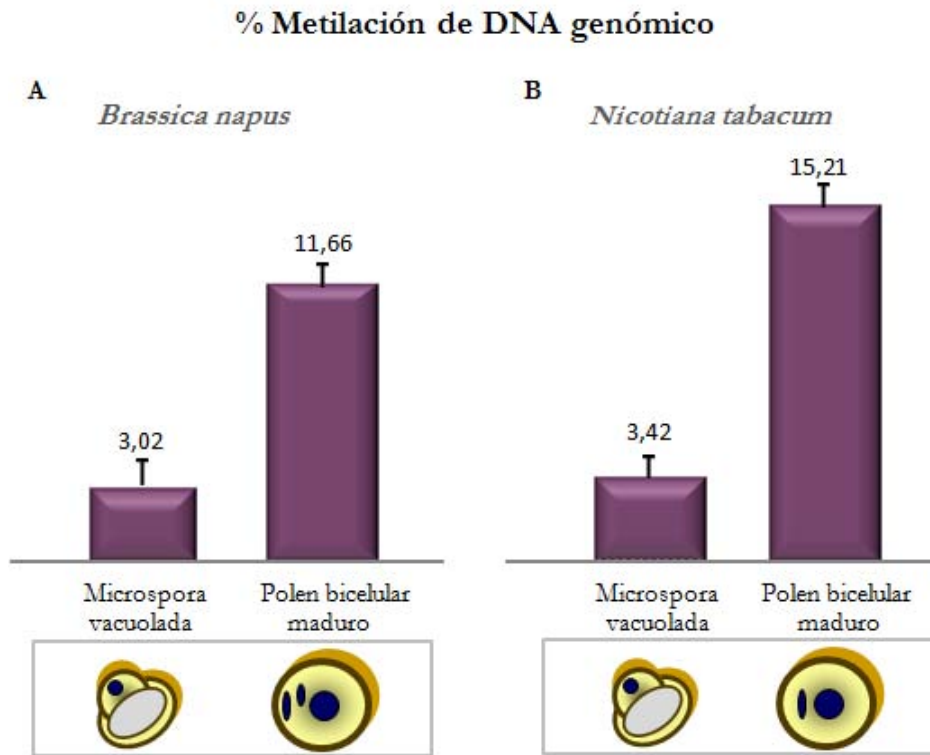
Las medidas en HPCE, proporcionan un electroferograma formado por 5 picos, cuyos tiempos de elución coinciden con los correspondientes estándares de deoxirribonucleósidos, verificándose así la pureza de las muestras (Fig.4.44).

4.44. Electroferograma obtenido mediante HPCE a 17kV.

dC: deoxicitidina; 5mdC: 5 metildeoxicitidina; dA: deoxiadenosina; dT: deoxitimina; dG: deoxiguanosina.

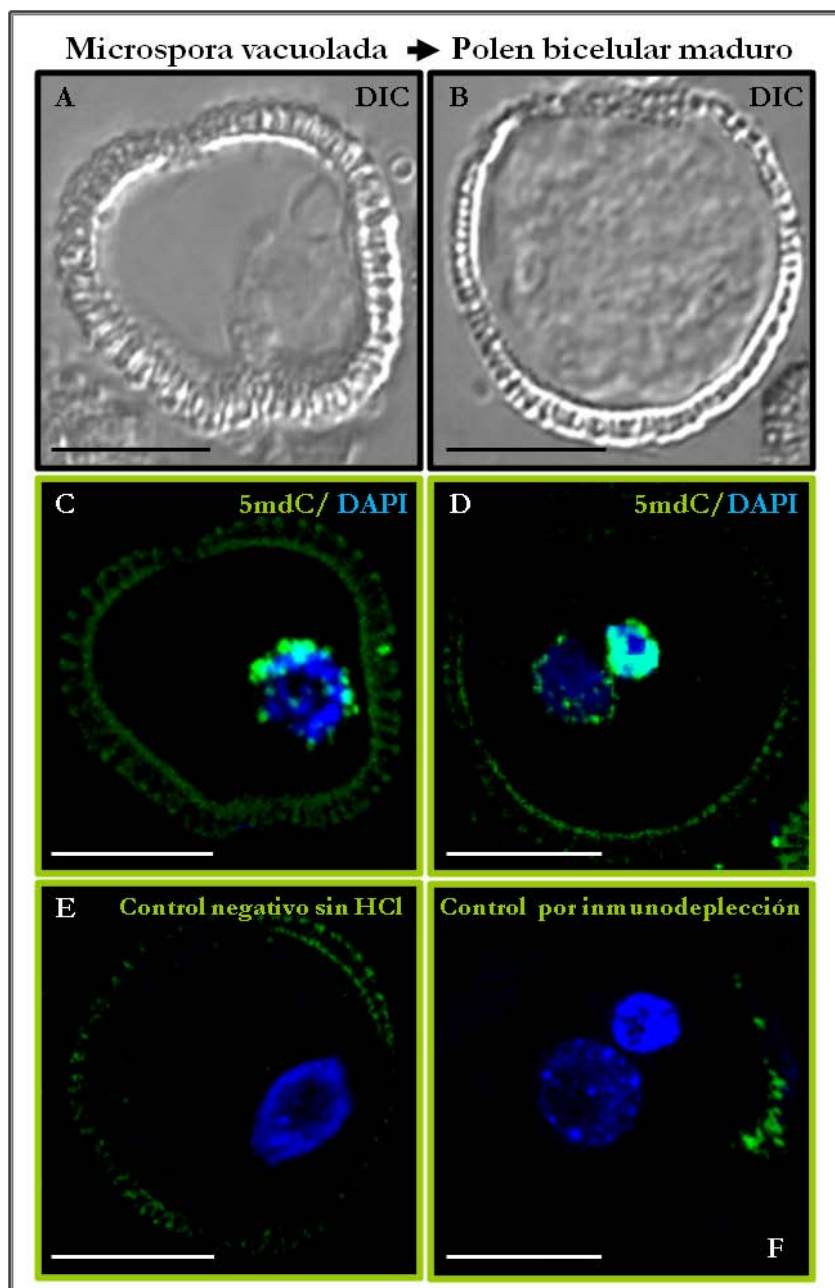
Los resultados obtenidos muestran un incremento significativo de los niveles de metilación del DNA genómico durante el proceso de maduración del polen en ambas especies (Fig.4.45); siendo la proporción de citosinas metiladas en el polen maduro (11,66%) casi 4 veces mayor que en la microspora vacuolada (3,02%) en el caso de la colza, y aún mayor (15,21% frente a 3,42%) en la planta de tabaco.

Los estudios de inmunolocalización de 5mdC se llevaron a cabo en las etapas de microspora vacuolada y de polen maduro del desarrollo gametofítico de *Brassica napus*. El análisis mediante microscopía de confocal refleja cambios en el patrón de distribución nuclear de 5mdC durante el desarrollo del polen (Fig.4.46). En etapas activas, como la microspora vacuolada, 5mdC tiene una distribución punteada por todo el núcleo, coincidiendo con las zonas de mayor condensación cromatínica (Fig.4.46-C). Por otro lado, en el grano de polen ya maduro, la señal de 5mdC cubre prácticamente todo el núcleo de la célula generativa, mientras que en el núcleo de la célula vegetativa, aún permanece el patrón punteado observado en la etapa anterior (Fig.4.46-D).



4.45. Cuantificación de metilación global del DNA genómico durante el desarrollo gametofítico de *Brassica napus* y *Nicotiana tabacum*, mediante HPCE.

Los controles realizados sin desnaturalización del DNA (necesaria para que el anticuerpo acceda a la unión con la 5mdC) y por inmunodeplección (pre-bloqueando el anticuerpo *in vitro* con 5mdC antes de realizar la inmunofluorescencia), muestran ausencia de marcado (Fig.4.46-E,F) observándose únicamente la fluorescencia azul, debida a la tinción de núcleos con DAPI.

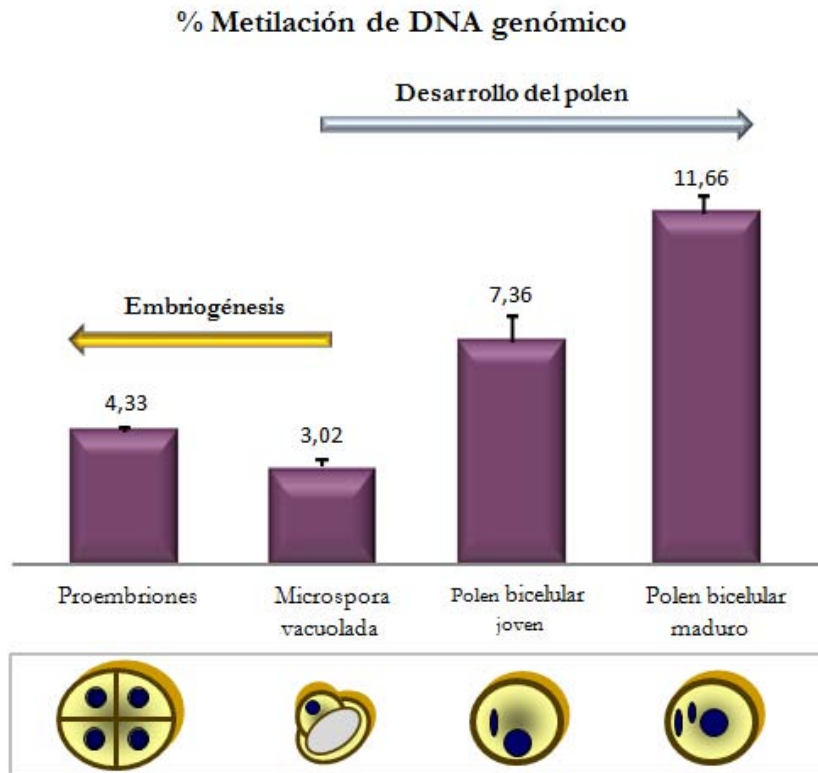


4.46. Inmunolocalización de 5mdC durante el desarrollo gametofítico de *Brassica napus* sobre cortes semifinos de Historesin Plus.

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la localización de 5mdC marcada con Alexa fluor 488. A, C, E: microspora vacuolada. B, D, F; polen bicelular maduro. A, B; imagen obtenida mediante contraste diferencial de Nomarsky. C,D; inmunofluorescencia con anti-5mdC. E; control negativo, sin desnaturalización. F; control negativo por inmunodeplección. Barras: 10 µm.

4.3.1.2 Cuantificación del nivel de metilación del DNA y su patrón de distribución nuclear durante la reprogramación y desarrollo embriogénico del polen

Se analizaron distintas etapas del desarrollo embriogénico del polen en colza (fases de microspora vacuolada y polen maduro), para la cuantificación de la metilación del DNA por HPCE.

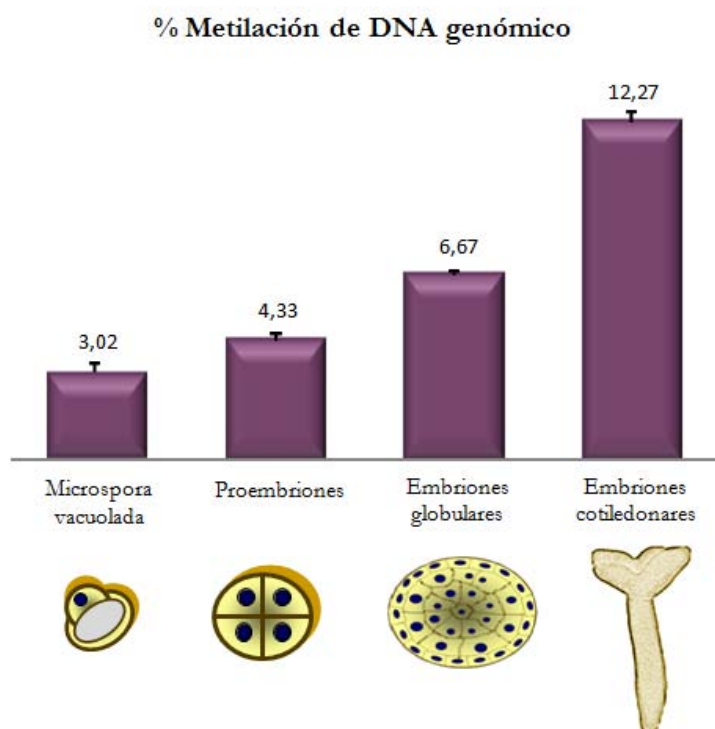


4.47. Cuantificación de metilación global del DNA genómico mediante HPCE durante el desarrollo gametofítico y tras la reprogramación a embriogénesis en *Brassica napus*.

Al comparar los datos obtenidos en el desarrollo gametofítico del polen con el inicio de la embriogénesis, se observa que tras la reprogramación de la microspora, el nivel de la metilación del DNA no cambia significativamente respecto al de la microspora vacuolada (4,33% frente a 3,02%). El cambio del programa de desarrollo por tanto, modifica notablemente la dinámica de metilación del DNA, ya que tras la

reprogramación, no se produce el incremento de los niveles de metilación registrado durante la maduración del polen (se obtiene un porcentaje de metilación de 4,33% en proembriones, frente a 11,66% en el polen maduro) (Fig.4.47).

Las primeras fases del desarrollo embriogénico, caracterizadas por ser etapas de proliferación, presentan bajos niveles de metilación global del DNA (4,33%), sin embargo, en etapas sucesivas del proceso de embriogénesis, se aprecia un incremento en dichos niveles, asociado a los procesos de diferenciación que tienen lugar en las etapas avanzadas del desarrollo embriogénico. De esta manera, en la etapa de embrión globular se observa un incremento significativo, con valores de metilación del 6,67% (Fig.4.48). No obstante, el incremento más significativo se observa en la etapa de embrión cotiledonar donde se registran niveles de metilación (12,27%) lo que supone casi 3 veces más que en los primeros proembriones (4,33%) (Fig.4.48).



4.48. Cuantificación de metilación global del DNA genómico durante el desarrollo embriogénico de *Brassica napus*, mediante HPCE

La inmunolocalización de 5mdC se llevó a cabo en las mismas etapas del desarrollo empleadas en el estudio por HPCE. El análisis en microscopio confocal, muestra que en los primeros proembriones, la señal de 5mdC aparece en pequeños focos perinucleares, (Fig.4.49-D,E) de nuevo asociado a masas de cromatina condensada.

A partir de la etapa de embrión globular, se observa un patrón de distribución de 5mdC diferencial, con cambios en las zonas de proliferación y diferenciación, que tienen lugar a partir de esta etapa del cultivo, en embriones globulares, corazón y torpedo (Fig.4.50). En los núcleos de ambas zonas se observa un patrón punteado, preferentemente perinuclear, pero en las células de las zonas de diferenciación, situadas en las capas más externas que forman la epidermis y células subyacentes, hay una mayor presencia de 5mdC (puntos brillantes más grandes y numerosos) (Fig.4.50-B) que en las zonas de proliferación (células del interior del embrión) (Fig.4.50-C). Este patrón de inmunofluorescencia se observa también en embriones torpedo, donde se aprecia un mayor marcado en células de zonas externas (Fig.4.50-E), más diferenciadas y menor marcado en el interior del embrión (Fig.4.50-F).

En embriones cotiledonares, se aprecia una señal de 5mdC por toda su estructura, siendo mayor en las zonas de diferenciación, como son la parte cotiledonar y zonas externas del embrión (Fig.4.51) mientras que en regiones más proliferantes, como el meristemo de la zona radicular (Fig.4.52) la señal de 5mdC es más escasa, con núcleos con menor número de señales punteadas, siendo éstas además, de menor tamaño.

Para analizar si este patrón de distribución de 5mdC era característico de los cultivos embriogénicos de microsporas o aparecía también durante la embriogénesis cigótica *in planta*, se realizó el ensayo en embriones cigóticos cotiledonares, extraídos de semillas. En las figuras 4.53 y 4.54, se observa que en los embriones cigóticos cotiledonares se aprecia la misma tendencia, tanto en la parte cotiledonar como en la parte radicular.

4.49. Inmunolocalización de 5mdC, durante las primeras etapas del desarrollo embriogénico de *Brassica napus* sobre cortes semifinos de Historesin Plus.

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la localización de 5mdC marcada con Alexa fluor 488. A, B; microspora vacuolada después del aislamiento. C, D: proembrión con exina. E, F: proembrión al inicio de la rotura de la exina. A, C, E: imágenes obtenidas mediante contraste diferencial de Nomarsky. B, D, E: inmunofluorescencia con anti-5mdC. Barras: A, B: 10 μm ; C, D, E, F: 20 μm .

4.50. Inmunolocalización de 5mdC durante las etapas más avanzadas del desarrollo embriogénico de *Brassica napus* sobre cortes semifinos de Historesin Plus.

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la localización de 5mdC marcada con Alexa fluor 488. A: imagen panorámica con azul de toluidina de un embrión globular. D: imagen panorámica con azul de toluidina de un embrión torpedo. B, C, E, F: inmunofluorescencia con anti-5mdC. B, E; detalle de la localización de 5mdC de una zona más diferenciada de los embriones globular y torpedo, respectivamente. C, F; detalle de la localización de 5mdC de una zona más proliferativa de los embriones globular torpedo, respectivamente. Barras: A: 20 μm . B: 50 μm .

4.51. Inmunolocalización de 5mdC sobre cortes semifinos de Historesin Plus de embrión cotiledonar maduro derivado de microsporas de *Brassica napus*. (Parte cotiledonar).

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la localización de 5mdC marcada con Alexa fluor 488. A; inmunofluorescencia con anti-5mdC. B; detalle de dos núcleos. Barra: 25 μm .

4.52. Inmunolocalización de 5mdC sobre cortes semifinos de Historesin Plus de embrión cotiledonar maduro derivado de microsporas de *Brassica napus*. (Parte radicular).

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la localización de 5mdC marcada con Alexa fluor 488. A; inmunofluorescencia con anti-5mdC. B; detalle de dos núcleos. Barra: 25 μm .

4.53. Inmunolocalización de 5mdC sobre cortes semifinos de Historesin Plus de embrión cotiledonar cigótico de *Brassica napus*. (Parte cotiledonar).

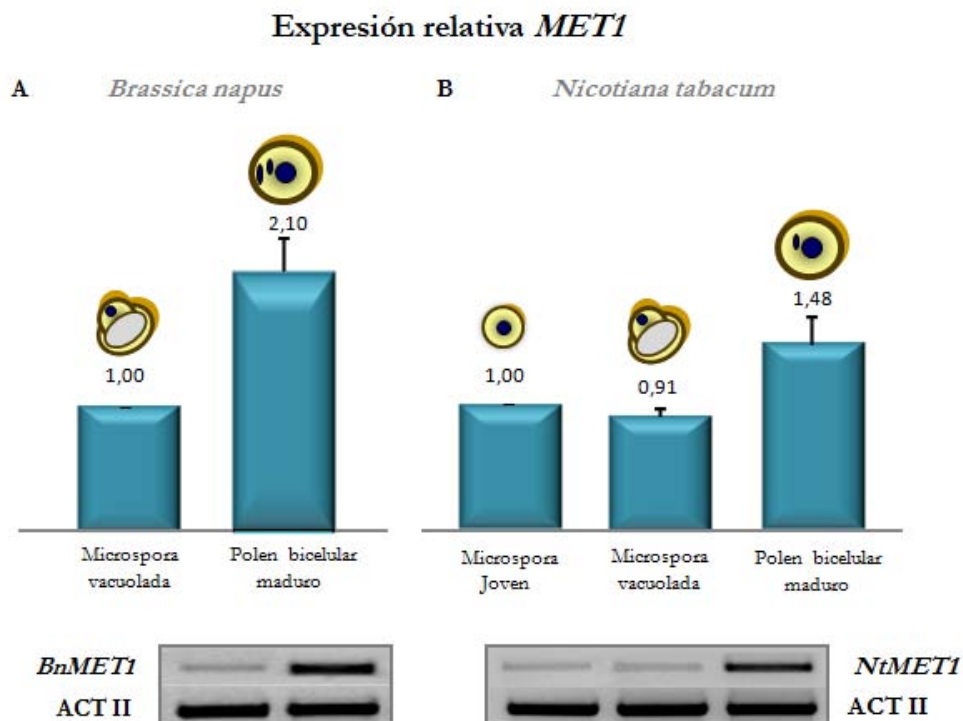
La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la localización de 5mdC marcada con Alexa fluor 488. A; inmunofluorescencia con anti-5mdC. B; detalle de dos núcleos. Barra: 25 μm .

4.54. Inmunolocalización de 5mdC sobre cortes semifinos de Historesin Plus de embrión radicular cigótico de *Brassica napus* (Parte radicular).

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la localización de 5mdC marcada con Alexa fluor 488. A; inmunofluorescencia con anti-5mdC. B; detalle de dos núcleos. Barra: 25 μm .

4.3.2 Análisis del patrón de expresión de DNA metiltransferasa 1 durante los dos programas de desarrollo del grano de polen

Con objeto de determinar los niveles de expresión de DNA metiltransferasa 1 (MET1), una de las enzimas responsables de la metilación *de novo* del DNA, se llevó a cabo un análisis de expresión mediante RT-PCR semicuantitativa en etapas específicas del desarrollo del polen de *Brassica napus* y *Nicotiana tabacum* y de los cultivos embriogénicos de la planta de la colza. En paralelo, también se analizó la distribución diferencial de los transcritos de *MET1* mediante hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), en los mismos puntos del desarrollo que en el estudio por RT-PCR semicuantitativa.



4.55. Análisis de la expresión relativa de *MET1* durante el desarrollo gametofítico de *Brassica napus* y *Nicotiana tabacum*, mediante RT-PCR semicuantitativa.

Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en gels de agarosa (1%) con bromuro de etidio 1mg/ml. La intensidad de las bandas se cuantificó en el analizador de imágenes con el software *Quantity one* (Bio-Rad). Los resultados se expresan como la razón entre el cDNA y la ACTII utilizada como control interno después de su normalización y expresa el número de veces respecto al control, al que se asigna el valor 1. ACTII: actina II, *MET1*: DNA metiltransferasa 1. *BnMET1*: DNA metiltransferasa 1 de *Brassica napus*. *NtMET1*: DNA metiltransferasa 1 de *Nicotiana tabacum*.

El análisis de expresión mediante RT-PCR semicuantitativa de *MET1*, se determinó empleando la expresión del gen de actina II (ACT-II) como control constitutivo.

En la figura 4.55, se observa un incremento significativo de la expresión de *MET1* durante el proceso de desarrollo y maduración del polen tanto en *Brassica napus* como en *Nicotiana tabacum*. En ambas especies se detecta un aumento de expresión de *MET1* en la etapa de polen maduro (valores de expresión relativa de 2,1 en *Brassica napus* y 1,58 en *Nicotiana tabacum*), frente a la etapa de microspora vacuolada (1).

Para los experimentos de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) se empleó una sonda RNA sentido y otra antisentido, marcadas con digoxigenina, tal y como se describió en el apartado 3.8. El resultado de la hibridación se observó en el microscopio láser confocal.

El estudio de FISH durante el desarrollo gametofítico del polen, se llevó a cabo sobre criocortes semifinos de anteras correspondientes a las etapas de microspora vacuolada y polen maduro de *Nicotiana tabacum* y *Brassica napus*.

La hibridación con la sonda antisentido, muestra un incremento de fluorescencia durante el desarrollo gametofítico del polen de *Brassica napus* (Fig.4.56). En la microspora vacuolada se observa una señal de hibridación débil (Fig.4.56-C), que se vuelve más intensa y abundante en la etapa de polen maduro, indicativo de la presencia de una gran cantidad de transcritos de *BnMET1* en esta etapa (Fig.4.56-D). En ambos casos, se trata de una señal citoplásmica y ausente en el núcleo, vacuolas y orgánulos, lo que demuestra que la hibridación de las sondas no es inespecífica con ácidos nucleicos del núcleo.

Por otro lado, la hibridación con la sonda sentido, control negativo del experimento, no muestra ningún tipo de señal de hibridación y tan sólo se observa la fluorescencia azul correspondiente al DAPI, utilizado como marcador de los núcleos (Fig.4.56-E,F).

4.56. Localización de transcritos de *BnMET1* durante el desarrollo gametofítico de *Brassica napus* mediante hibridación *in situ* sobre criocortes semifinos de anteras.

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la digoxigenina marcada con Alexa fluor 488, utilizada como marcador de la hibridación. A, C, E; microspora vacuolada. B, D, F: polen bicelular maduro. A, B: imágenes obtenidas mediante contraste diferencial de Nomarsky. C, D: hibridación con sonda antisentido. E, F: hibridación con la sonda sentido como control negativo de la hibridación. Barras: 10 µm.

4.57. Localización de transcritos de *NtMET1* durante el desarrollo gametofítico de *Nicotiana tabacum* mediante hibridación *in situ* sobre criocortes semifinos de anteras.

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la digoxigenina marcada con Alexa fluor 488, utilizada como marcador de la hibridación. A, C, E; microspora vacuolada. B, D, F: polen bicelular maduro. A, B: imágenes obtenidas mediante contraste diferencial de Nomarsky. C, D: hibridación con sonda antisentido. E, F: hibridación con la sonda sentido como control negativo de la hibridación. Barras: 10 µm.

Así mismo, durante el desarrollo gametofítico del polen de *Nicotiana tabacum*, se repite el mismo patrón de expresión observado en *Brassica napus*. El polen bicelular maduro muestra una señal de hibridación mucho mayor que la microspora vacuolada (Fig.4.57). De la misma manera, la hibridación con la sonda sentido, también proporcionó un resultado negativo (Fig.4.57-E,F). En *Nicotiana tabacum*, la exina (pared del polen) muestra autofluorescencia inespecífica en algunos casos.

Los resultados obtenidos mediante FISH durante el desarrollo gametofítico en colza y tabaco, confirman los análisis obtenidos mediante RT-PCR semicuantitativa.

4.58. Análisis de la expresión relativa de *MET1* durante el desarrollo gametofítico y la reprogramación a embriogénesis de *Brassica napus*, mediante RT-PCR semicuantitativa.

. Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (1%) con bromuro de etidio 1mg/ml. La intensidad de las bandas se cuantificó en el analizador de imágenes con el software *Quantity one* de Bio-Rad. Los resultados se expresan como la razón entre el cDNA y la ACT II utilizada como control interno después de su normalización y expresa el número de veces respecto al control, al que se asigna el valor 1. ACTII: actina II, *BnMET1*: DNA metiltransferasa 1 de *Brassica napus*.

La figura 4.58 muestra el efecto de la reprogramación de la microspora a embriogénesis sobre los niveles de expresión de *MET1*. Se observa que durante el desarrollo gametofítico del polen, se produce un incremento de los niveles de expresión de *MET1* respecto a la etapa de microspora vacuolada (en la etapa de polen maduro, se detecta un valor de expresión relativa 2 veces superior al obtenido en la etapa de microspora vacuolada). Sin embargo, tras la reprogramación a embriogénesis, no se observa dicho incremento, sino que ésta permanece similar a la expresión detectada en la etapa de microspora vacuolada, que se corresponde, con la etapa de inicio del cultivo (Fig.4.58).

Por otro lado, el estudio de expresión mediante FISH durante el desarrollo embriogénico de *Brassica napus*, se llevó a cabo sobre criocortes semifinos de muestras correspondientes a las primeras etapas del desarrollo, cortes de 30 μm obtenidos en

criostato, en el caso de embriones globulares y cortes de 50 μm obtenidos en vibratomo, en el caso de embriones cotiledonares.

El análisis en el microscopio laser confocal, muestra que las primeras etapas del desarrollo embriogénico de *Brassica napus*, presentan un bajo número de transcritos de *BnMET1*, que se manifiesta con una débil señal fluorescente en el citoplasma (Fig.4.59-A,B,C). Mientras avanza el desarrollo embriogénico, en la etapa de embrión globular, comienzan a tener lugar procesos de diferenciación y se observa que los niveles de expresión de *BnMET1* aumentan (Fig.4.60-A). En estos embriones, se observa una intensa señal de hibridación, siendo más débil en la zona interna del mismo, caracterizada por un patrón de células en proliferación, mientras que en las capas más externas, que comienzan a diferenciar, muestran una intensa señal fluorescente en el citoplasma (Fig.4.60-A).

En la figura 4.61-A, se muestra la parte cotiledonar de un embrión cotiledonar derivado de microsporas de *Brassica napus*, donde sólo se aprecia la presencia de transcritos en las capas de células más externas, que se trata de células más diferenciadas. Por otro lado, en la parte radicular del mismo, (Fig.4.62-A) la señal de hibridación observada es mucho más intensa.

4.59. Localización de transcritos de *BnMET1* durante el desarrollo embriogénico de *Brassica napus*, mediante hibridación *in situ* sobre criocortes semifinos de estructuras multicelulares tempranas derivadas microsporas.

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la digoxigenina marcada con Alexa fluor 488, utilizada como marcador de la hibridación. A, C, E; hibridación con sonda antisentido; B, D, F; imágenes obtenidas mediante contraste diferencial de Nomarsky. A, B; proembrión al inicio de la rotura de la exina; C, D; proembrión con exina rota. E,F; embrión globular joven. D, F. Barras: 20 μm .

4.60. Localización de transcritos de *BnMET1* sobre cortes de criostato de embrión globular de *Brassica napus*, mediante hibridación *in situ*.

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la digoxigenina marcada con Alexa fluor 488, utilizada como marcador de la hibridación. A; imagen panorámica de la hibridación con sonda antisentido en embrión globular. B; imagen panorámica del embrión globular obtenida mediante contraste diferencial de Nomarsky. C; detalle de la señal de hibridación. Barras: A, B: 75 μm .

4.61. Localización de transcritos de *BnMET1* sobre cortes de vibratomo de embrión cotiledonar derivado del cultivo de microsporas de *Brassica napus* mediante hibridación *in situ* (Parte cotiledonar).

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la digoxigenina marcada con Alexa fluor 488, utilizada como marcador de la hibridación. A; hibridación con sonda antisentido. B; imagen obtenida mediante contraste diferencial de Nomarsky. C; Detalle de la señal de hibridación. Barras: A, B: 50 μm .

4.62. Localización de transcritos de *BnMET1* sobre cortes de vibratomo de embrión cotiledonar derivado del cultivo de microsporas de *Brassica napus* mediante hibridación *in situ* (Parte radicular).

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la digoxigenina marcada con Alexa fluor 488, utilizada como marcador de la hibridación. A; hibridación con sonda antisentido. B; imagen obtenida mediante contraste diferencial de Nomarsky. C; Detalle de la señal de hibridación. Barras: A, B: 50 μm .

4.63. Localización de transcritos de *BnMET1* sobre cortes de vibratomo de embrión cotiledonar cigótico de *Brassica napus* mediante hibridación *in situ* (Parte cotiledonar).

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la digoxigenina marcada con Alexa fluor 488, utilizada como marcador de la hibridación. A; hibridación con sonda antisentido. B; imagen obtenida mediante contraste diferencial de Nomarsky. C; Detalle de la señal de hibridación. Barras: A, B: 50 μm .

4.64. Localización de transcritos de *BnMET1* sobre cortes de vibratomo de embrión cotiledonar cigótico de *Brassica napus* mediante hibridación *in situ* (Parte radicular).

La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la digoxigenina marcada con Alexa fluor 488, utilizada como marcador de la hibridación. A; hibridación con sonda antisentido. B; imagen obtenida mediante contraste diferencial de Nomarsky. C; Detalle de la señal de hibridación. Barras: A, B: 50 μm .

Con objeto de comparación, se analizó la expresión *in situ* de *BnMET1* mediante FISH en embriones cotiledonares cigóticos. El patrón de distribución de la señal de hibridación es similar al obtenido en los embriones derivados de polen tanto en regiones cotiledonares como en regiones radiculares (Figs.4.63, 4.64).

En la figura 4.65-A se comparan los resultados de expresión de *BnMET1* obtenidos por RT-PCR semicuantitativa, durante el desarrollo gametofítico y muestras recogidas tras 4 días en cultivo, donde predominan estructuras multicelulares todavía

con exina, pero con una elevada tasa de proliferación. Se observa que la reprogramación a embriogénesis frena el incremento de los niveles de expresión, que se produce con la maduración del grano de polen (Fig.4.65-A).

En la figura 4.65-B se muestran los resultados de expresión de *BnMET1* obtenidos mediante RT-PCR semicuantitativa, en embriones derivados de cotiledonares derivados de microsporas y cotiledonares cigóticos.

4.65. A; Análisis de la expresión relativa de *MET1* durante el desarrollo embriogénico *Brassica napus*. B; Comparación de los niveles de expresión relativa de *MET1* en embriones cotiledonares cigóticos y derivados de microsporas de *Brassica napus*.

Los análisis se realizaron mediante RT-PCR semicuantitativa. Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (1%) con bromuro de etidio 1mg/ml. La intensidad de las bandas se cuantificó en el analizador de imágenes con el software *Quantity one* (Bio-Rad). Los resultados se expresan como la razón entre el cDNA y la ACT II utilizada como control interno después de su normalización y expresa el número de veces respecto al control, al que se asigna el valor 1.

4.4 TAPETUM Y NÚCLEO

El tapetum, tejido nutricio de la antera, tiene un papel fundamental durante la microsporogénesis y desarrollo del polen. Una vez terminada su función, se produce su degradación por muerte celular programada (MCP).

En esta Tesis, se ha analizado la dinámica celular del tapetum durante su desarrollo en anteras de *Brassica napus* y *Nicotiana tabacum*, con objeto de monitorizar el proceso de MCP asociado a la degeneración del tapetum.

Por otro lado, también se han analizado los cambios en el núcleo asociados a MCP, empleando marcadores nucleares asociados a actividad transcripcional, degradación de RNA y MCP durante el desarrollo del tapetum.

4.4.1 Caracterización de la MCP del tapetum durante el desarrollo gametofítico del polen

La muerte celular programada (MCP) es un mecanismo fisiológico básico, genéticamente controlado, que forma parte de la vida normal de organismos multicelulares, animales y plantas y que conduce a la célula a un proceso de autólisis en respuesta a un conjunto de señales de muerte.

La maduración del tapetum y su degeneración una vez finalizada su función, no es un proceso incontrolado, sino que tiene lugar mediante un proceso de muerte celular programada (MCP) (Bedinger 1992, Papini, Mosti and Brighigna 1999, Wu and Cheung 2000).

En este estudio, se seleccionaron 3 etapas de desarrollo del tapetum: una etapa inicial, en la que el tapetum está completamente activo, una etapa en la que el tapetum comienza a degenerar, que denominamos tapetum en MCP temprana y por último, una etapa de tapetum completamente degradado, que denominamos tapetum en MCP avanzada.

4.4.1.1 Cambios en núcleo y citoplasma durante la MCP del tapetum

La pared de la antera consta de varias capas de diferentes tejidos: epidermis, exotecio, endotecio y tapetum. El tapetum es la capa más interna de la antera, que reviste el saco polínico (Fig.4.66).

4.66. Imagen panorámica de un corte longitudinal de una antera. Citoquímica con azul de toluidina sobre cortes semifinos de Historesin Plus de antera.

La degeneración del tapetum en la antera, tienen lugar en paralelo al proceso de maduración del polen. En este trabajo se han analizado los cambios en la arquitectura del núcleo y citoplasma durante la MCP del tapetum.

En etapas iniciales del desarrollo gametofítico, fase de tapetum activo (Fig.4.67-A, 4.68-A), tras la liberación de las microsporas de la tetrada, se observan las células del tapetum de gran tamaño y forma poligonal con núcleos binucleares íntegros, caracterizadas por grandes núcleos redondeados y densos citoplasmas con abundante población ribosómica, tal y como se aprecia en la inmunofluorescencia con anti-RNA (Fig.4.69-A) propio de células transcripcionalmente muy activas.

4.67. Desarrollo y MCP del tapetum de *Brassica napus*.

Citoquímica con azul de toluidina sobre cortes semifinos de Historesin plus de anteras en diferentes etapas del desarrollo. A; Imagen panorámica de una antera con tapetum activo. B; detalle células tapetum activo. C; Imagen panorámica de una antera con tapetum en MCP temprana. D; detalle células tapetum en MCP temprana. E; Imagen panorámica de una antera con tapetum en MCP avanzada. F; detalle células tapetum en MCP avanzada. PA: pared de la antera. C: Tap: tapetum. MJ: microspora joven. MV: microspora vacuolada PM: polen maduro.

4.68. Desarrollo y MCP del tapetum de *Nicotiana tabacum*.

Citoquímica con azul de toluidina sobre cortes semifinos de Historesin plus de anteras en diferentes etapas del desarrollo. A; Imagen panorámica de una antera con tapetum activo. B; detalle células tapetum activo. C; Imagen panorámica de una antera con tapetum en MCP temprana. D; detalle células tapetum en MCP temprana. E; Imagen panorámica de una antera con tapetum en MCP avanzada. F; detalle células tapetum en MCP avanzada. PA: pared de la antera. C: Tap: tapetum. MJ: microspora joven. MV: microspora vacuolada PM: polen maduro.

4.69. Localización de RNA total durante el desarrollo y MCP del tapetum.

Inmunofluorescencia con anti-RNA sobre cortes semifinos de Historesin plus de anteras de *Brassica napus* en diferentes etapas del desarrollo. La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la localización de 5mdC marcada con Alexa fluor 488. A,C,E; localización de RNA total. B,D,F; imágenes obtenidas mediante contraste diferencial de Nomarsky. PA: pared de la antera. C: Tap: tapetum. MJ: microspora joven. MV: microspora vacuolada PM: polen maduro. Barras: 10 μ m.

Sin embargo, justo antes de la primera mitosis del polen, en la etapa de microspora vacuolada, las células del tapetum comienzan a degenerar. En esta etapa, las células del tapetum empiezan a perder su forma geométrica, los núcleos pierden su forma redondeada y la cromatina se condensa en agregados. Por otro lado, aumenta el número de vacuolas en el citoplasma y se produce la contracción del mismo, con la consecuente separación de la pared celular (Fig.4.67-B, 4.68-B). La señal de inmunofluorescencia con anti-RNA en el citoplasma en esta etapa, todavía es intensa, dejando libres las áreas de citoplasma correspondientes a las vacuolas (Fig.4.69-B). A esta etapa la denominamos, tapetum en MCP temprana.

Finalmente, en anteras en fase de polen maduro, las células del tapetum, están completamente degradadas, los núcleos se caracterizan por tener forma lobulada o alargada y cromatina muy condensada (Fig.4.67-C, 4.68C). En la inmunofluorescencia con anti-RNA no se aprecia señal fluorescente (Fig.4.69-C), indicativo de la degradación de ribosomas y transcritos en esta fase. A esta etapa la denominamos, tapetum en MCP avanzada.

4.4.1.2 Localización y actividad de caspasa 3 durante la MCP del tapetum

El proceso de MCP tiene lugar a través de una serie de rutas complejas, mediadas por enzimas caspasas, que son cisteín proteasas aspártico-específicas, que constituyen la principal maquinaria apoptótica, siendo la caspasa 3 una de las principales caspasas efectoras.

En esta Tesis, se ha monitorizado la localización celular y actividad caspasa 3 durante el desarrollo y MCP del tapetum.

Este abordaje se llevó a cabo a partir de estudios de localización de caspasa 3 activa, mediante inmunofluorescencia y Western Blot, así como de determinación de actividad caspasa 3 en extractos de proteínas totales correspondientes a las distintas etapas del desarrollo y MCP del tapetum de *Brassica napus*.

4.4.1.2.1 Localización de la forma activa de caspasa 3 durante la MCP del tapetum de *Brassica napus*

La localización de caspasa 3 se realizó mediante el empleo del anticuerpo “anti-Cleaved Caspase-3” que sólo reconoce la forma activa de esta proteína, originada al romperse la pro-caspasa 3 o zimógeno por la acción de otras proteasas específicas.

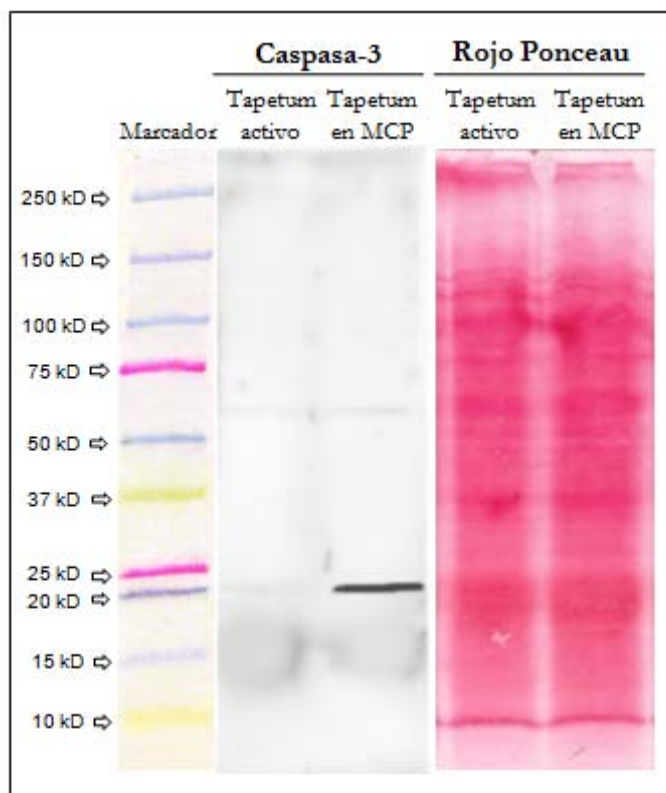
El estudio se llevó a cabo mediante dos tipos de aproximaciones: mediante Western Blot y técnicas de inmunofluorescencia, para la localización *in situ* de la enzima.

4.4.1.2.1.1 Inmunoblotting

Con objeto de confirmar la especificidad del anticuerpo anti-caspasa 3 activa en el material de estudio, se realizó un Western Blot a partir de extractos de proteínas totales obtenidos de anteras de *Brassica napus*, correspondientes a las fases de tapetum activo y tapetum en MCP temprana.

Tras el revelado del inmunoblotting mediante ECL (Apartado 3.6.3.2), en extractos de proteínas totales de anteras en fase de tapetum en MCP temprana se detectó una banda correspondiente a 19kD aproximadamente, que coincide con el peso molecular esperado correspondiente a la forma activa de caspasa 3. Sin embargo, en las mismas condiciones experimentales, en anteras en fase de tapetum activo, no se detectó la presencia de esta enzima (Fig.4.70).

Las mismas membranas utilizadas para el “Inmunoblot”, se tiñeron previamente con el colorante “Rojo Ponceau”, revelando una cantidad y patrón de proteínas análogo en las dos muestras (tapetum activo y tapetum en MCP temprana) (Fig.4.70).



4.70. Inmunoblot Caspasa.

Marcador de pesos moleculares *Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards*, Bio-Rad. Revelado mediante ECL. Las bandas correspondientes se visualizaron mediante la cámara CCD del equipo “Luminiscent Image Analyzer LAS-3000®” (Fujifilm). La tinción con Rojo Ponceau se empleó como control de carga y de la transferencia.

4.4.1.2.1.2 Inmunofluorescencia

La inmunolocalización de la forma activa de caspasa 3 se realizó mediante inmunofluorescencia sobre cortes obtenidos en criostato, de anteras extraídas de yemas florales de *Brassica napus* en distintas fases del desarrollo, correspondientes a las fases de tapetum activo, tapetum en MCP temprana y tapetum en MCP avanzada.

La figura 4.71-A,B, muestra que en las etapas de tapetum activo, no hay señal caspasa 3 activa, tan solo se observa la fluorescencia proporcionada por la tinción con DAPI, como marcador de núcleos. Sin embargo, las células del tapetum en MCP temprana, presentan una intensa señal fluorescente en su citoplasma, correspondiente a la forma activa de la enzima caspasa 3 (Fig.4.71-C,D).

4.71. Localización de caspasa 3 durante el desarrollo y MCP del tapetum.

Inmunofluorescencia con anti-caspasa 3 sobre criocortes semifinos de anteras de *Nicotiana tabacum* en diferentes etapas del desarrollo. La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la localización de 5mdC marcada con Alexa fluor 488. A,C,E; localización de caspasa 3. B,D,F; imágenes obtenidas mediante contraste diferencial de Nomarsky. PA: pared de la antera. C: Tap: tapetum. MJ: microspora joven. MV: microspora vacuolada PM: polen maduro.

En la última etapa del desarrollo del tapetum estudiada, tapetum en fase MCP avanzada, se aprecia una disminución de caspasa 3 activa que se refleja con una señal fluorescente en el citoplasma menos intensa (Fig.4.71-E,F).

Los controles realizados por inmunodeplección (pre-bloqueando el anticuerpo *in vitro* con el péptido bloqueante específico antes de realizar la inmunofluorescencia), muestran ausencia de marcado (Fig.4.71-C) observándose únicamente la fluorescencia azul, debida a la tinción de núcleos con DAPI.

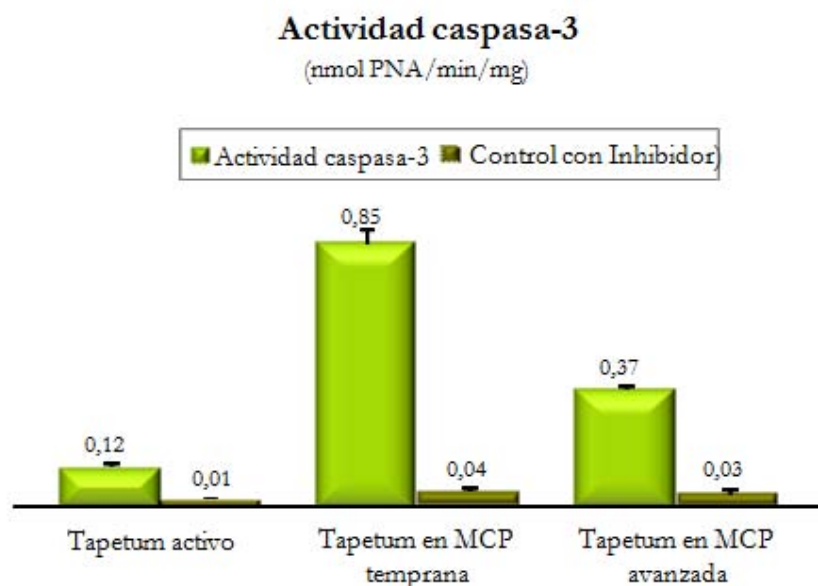
4.4.1.2.2 Determinación de la actividad caspasa 3 durante el desarrollo del tapetum

Se han analizado los niveles de actividad de caspasa 3 durante el desarrollo y MCP del tapetum de *Nicotiana tabacum* y de *Brassica napus* mediante un ensayo enzimático *in vitro* basado en la detección espectrofotométrica del cromóforo p-nitroanilina (pNA) liberado tras la proteólisis del sustrato sintético específico de la enzima caspasa 3, Acetil-Asp-Glu-Vaal-Asp p-Nitroanilina (Ac-DEVD-pNA) (Apartado 3.7).

En las figuras 4.72 y 4.73, se muestran los valores de actividad registrados durante el desarrollo y MCP del tapetum de *Brassica napus* y *Nicotiana tabacum*. En el caso de la colza, se empleó además, un inhibidor específico de la actividad caspasa 3, “Ac-DEVD-CHO”, como control del experimento. De manera que se evaluó la actividad caspasa 3 de cada etapa del desarrollo del tapetum en presencia y ausencia del inhibidor. Los resultados muestran una dinámica de actividad enzimática similar en ambas especies.

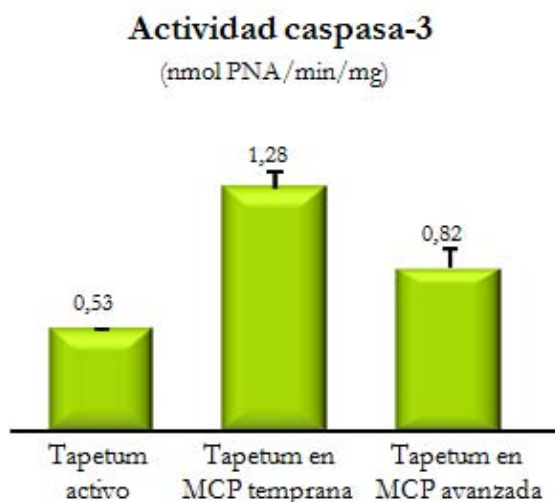
Los extractos de proteínas totales correspondientes a fases de tapetum activo, muestran niveles de actividad caspasa 3 muy bajos (0,12 μ moles pNA/mg/ml, en

Brassica napus y 0,5 μ moles pNA/mg/ml en *Nicotiana tabacum*). No obstante, en fases de tapetum en MCP temprana, se observa un incremento significativo de los niveles de actividad caspasa 3 (0,85 μ moles pNA/mg/ml en *Brassica napus* y 1,28 μ moles pNA/mg/ml en *Nicotiana tabacum*).



4.72. Actividad caspasa 3 durante el desarrollo y MCP del tapetum.

Determinación de actividad caspasa 3 en extractos de proteínas procedentes de anteras de *Brassica napus* en diferentes etapas del desarrollo en presencia y ausencia de inhibidor de caspasa 3 (Ac-DEDV-CHO) mediante un ensayo colorimétrico con el kit comercial “Caspase-3 Assay kit, Colorimetric” (Sigma). La actividad enzimática se determinó a partir de la cantidad de producto de reacción liberado (pNA) a través de la interpolación de los valores de absorbancia a 405nm obtenidos, en la recta de calibrado preparada previamente con diferentes concentración de pNA. La medida de absorbancia a 405 nm se realizó en un equipo lector de placas Varioscan 377.



4.73. Actividad caspasa 3 durante el desarrollo y MCP del tapetum.

Determinación de actividad caspasa 3 en extractos de proteínas procedentes de anteras de *Nicotiana tabacum* en diferentes etapas del desarrollo mediante un ensayo colorimétrico con el kit comercial “Caspase-3 Assay kit, Colorimetric” (Sigma). La actividad enzimática se determinó de la misma manera que en 4.71.

Finalmente, en la siguiente etapa de estudio, tapetum en MCP avanzada, se observa una disminución de los niveles de actividad caspasa 3, (0,37 μ moles pNA/mg/ml para *Brassica napus* y 0,82 μ moles pNA/mg/ml en *Nicotiana tabacum*) aunque estos niveles siguen siendo superiores a los obtenidos en la etapa inicial.

Según estos resultados, las fases de tapetum en MCP temprana se corresponden con el momento de máxima actividad caspasa 3 registrada en las dos especies de estudio (Figs. 4.72 y 4.73).

Cabe destacar, que AC-DEDV-CHO inhibe la actividad caspasa 3 en todos los puntos ensayados (Fig.4.72) demostrando la especificidad del ensayo. Los niveles de actividad registrados en cada una de las fases del desarrollo del tapetum en presencia del inhibidor son prácticamente despreciables (0,01, 0,04 y 0,03 μ moles pNA/mg/ml, para las fases de tapetum activo, tapetum en MCP temprana y tapetum en MCP avanzada, respectivamente).

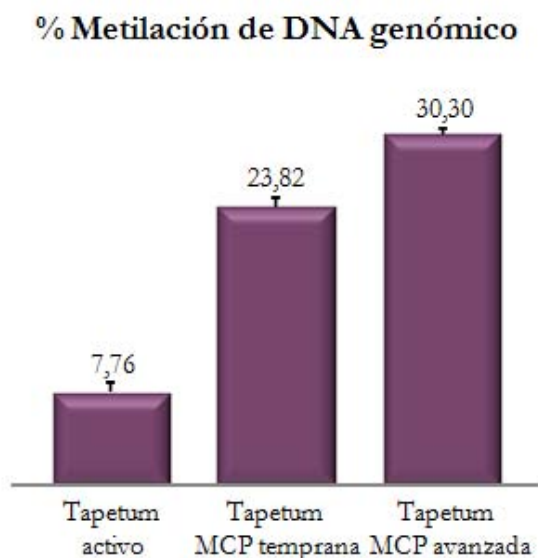
4.4.1.3 Cambios epigenéticos durante la MCP del tapetum

La metilación de citosinas del DNA es una modificación postraduccional que afecta a la organización de la cromatina, con consecuencias funcionales en procesos celulares como la transcripción, la reparación del DNA, mitosis y meiosis.

En esta memoria, se analiza por primera vez la metilación del DNA como marca epigenética del estado funcional de la cromatina durante un proceso de MCP.

4.4.1.3.1 Cuantificación del nivel de metilación del DNA genómico y su patrón de distribución nuclear durante el desarrollo y MCP del tapetum

El estudio se llevó a cabo mediante electroforesis capilar de alta resolución (HPCE) del DNA hidrolizado e inmunolocalización de 5mdC con el anticuerpo anti-5mdC en las distintas etapas del desarrollo y muerte celular del tapetum. Para ello, se emplearon anteras completas extraídas de yemas florales en distintas fases del desarrollo, correspondientes con fases de tapetum activo, tapetum en MCP temprana y tapetum en MCP avanzada.



4.74. Cuantificación de metilación global del DNA genómico durante el desarrollo y MCP del tapetum de *Nicotiana tabacum*, mediante HPCE.

En la figura 4.74, se muestran los resultados obtenidos en los análisis de HPCE para las distintas etapas del desarrollo y MCP del tapetum de la planta de tabaco. Se observa un incremento significativo del porcentaje de metilación global del DNA durante el proceso. En etapas iniciales del desarrollo, en las que el tapetum está completamente activo, se registran niveles de metilación global de 7,76%. Según progresa el desarrollo del polen, el tapetum de la antera, comienza a degradarse; así, justo antes de la primera división mitótica de la microspora, tapetum en fase de MCP temprana, se registran valores de metilación global de 23,82% lo que supone un incremento muy significativo respecto a la etapa anterior. En la siguiente etapa del desarrollo estudiada, en la que el grano de polen ya está completamente formado y el tapetum está en fase de MCP avanzada, se detectan los niveles de metilación global más altos de todo el proceso, con valores del 30,30%.

4.75. Localización de 5mdC durante el desarrollo y MCP del tapetum.

Inmunolocalización de 5mdC sobre cortes semifinos de Historesin Plus de embrión anteras de *Nicotiana tabacum* en diferentes etapas del desarrollo. La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la localización de 5mdC marcada con Alexa fluor 488. A, C,E; inmunofluorescencia con anti-5mdC. B,D, F; tinción con DAPI.

La inmunolocalización de 5mdC se llevó a cabo mediante inmunofluorescencias con el anticuerpo anti-5mdC sobre cortes semifinos de Historesin Plus de anteras en las diferentes etapas del desarrollo del tapetum mencionadas anteriormente.

Los resultados obtenidos muestran un incremento en la intensidad de señal de inmunofluorescencia con anti-5mdC durante el desarrollo y MCP del tapetum (Fig.4.75). Asimismo, también se aprecia un cambio en el patrón de distribución nuclear de 5mdC. En etapas correspondientes al tapetum activo, se observa un patrón de distribución de 5mdC, en pequeños “spots” en todo el núcleo (Fig.4.75-A), sin embargo, según avanza la MCP los núcleos del tapetum adquieren características apoptóticas, como una gran condensación cromatínica y lobulación nuclear, en los

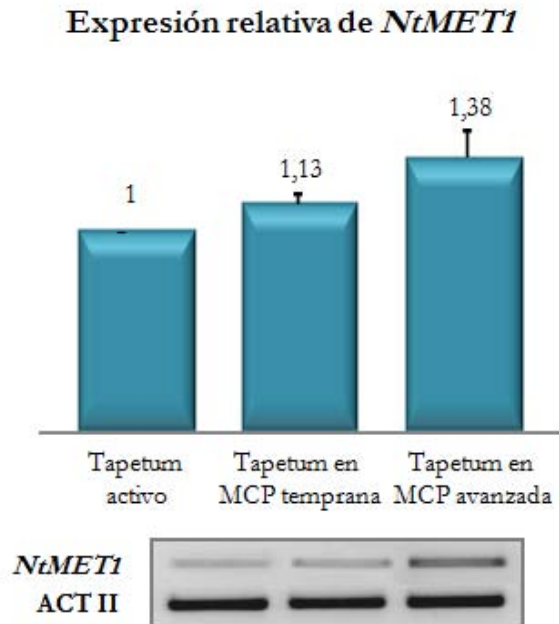
que se observa que la señal de 5mdC aumenta y se concentra en las zonas de cromatina muy condensada (Fig.4.75-B,C),

4.4.1.3.2 Análisis del patrón de expresión de DNA metiltransferasa 1 durante el desarrollo y MCP del tapetum

La enzima DNA metiltransferasa 1 (MET1) es una de las enzimas responsables de la metilación *de novo* del DNA. Se realizó un análisis de expresión mediante RT-PCR semicuantitativa, en etapas específicas del desarrollo y MCP del tapetum de *Nicotiana tabacum* (fase de tapetum activo, tapetum en MCP temprana y tapetum en MCP avanzada). En paralelo, también se analizó el patrón de expresión espacio-temporal a partir del estudio de la distribución diferencial de los transcritos de la misma, mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en las etapas mencionadas.

El análisis de expresión mediante RT-PCR semicuantitativa, se llevó a cabo en muestras de yemas florales en las correspondientes fases del desarrollo. Los cambios a nivel de expresión de *NtMET1* se determinaron empleando la expresión del gen de actina II (ACT-II) como control constitutivo.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.76, donde se observa un incremento significativo en la expresión de *NtMET1* durante el proceso de desarrollo y MCP del tapetum. Anteras en fase de tapetum en MCP temprana muestran un ligero incremento en los niveles de expresión de *NtMET1* (valores de expresión relativa de 1,13) respecto a la etapa anterior en la que el tapetum está completamente activo (valor de expresión 1). Los mayores niveles de expresión, se registran en anteras en fase de tapetum en MCP avanzada, (valores de expresión relativa de 1,38).



4.76. Expresión relativa de *MET1* durante el desarrollo y MCP del tapetum.

Análisis de la expresión relativa de *MET1* durante el desarrollo y MCP del tapetum de *Nicotiana tabacum*, mediante RT-PCR semicuantitativa. Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (1%) con bromuro de etidio 1mg/ml. La intensidad de las bandas se cuantificó en el analizador de imágenes con el software *Quantity one* de Bio-Rad. Los resultados se expresan como la razón entre el cDNA y la ACTII utilizada como control interno después de su normalización y expresa el número de veces respecto al control, al que se asigna el valor 1. ACTII: actina II, *MET1*: DNA metiltransferasa 1. *NtMET1*: DNA metiltransferasa 1 de *Nicotiana tabacum*.

Por otro lado, el estudio de expresión mediante FISH se llevó a cabo sobre cortes de vibratomo y criocortes de anteras correspondientes a las etapas de tapetum activo, tapetum en MCP temprana y tapetum en MCP avanzada. Se empleó una sonda RNA sentido y otra antisentido, marcadas con digoxigenina, tal y como se describió en el apartado 3.8. Finalmente, el resultado de la hibridación se reveló por fluorescencia y se observó en el microscopio láser confocal.

4.77. Expresión *in situ* de *MET1* durante el desarrollo y MCP del tapetum.

Localización de transcritos de *NtMET1* mediante hibridación *in situ* sobre criocortes semifinos de anteras de *Nicotiana tabacum*. La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la digoxigenina marcada con Alexa fluor 488, utilizada como marcador de la hibridación. A, C, E; imágenes panorámicas de la hibridación con la sonda antisentido en las distintas etapas. B, D, F: imágenes obtenidas mediante contraste diferencial de Nomarsky.

La hibridación con la sonda antisentido, muestra un incremento de la señal de hibridación, indicativo de un aumento en los niveles de expresión de *NtMET1* durante el desarrollo y MCP del tapetum (Fig.4.77), en relación con los resultados obtenidos mediante RT-PCR semicuantitativa (Fig.4.76). En anteras en fase de tapetum activo, se observa una señal de hibridación muy leve en el citoplasma de las células tapetales, mientras que el resto de células de la pared de la antera no muestran ninguna señal (Fig.4.77-A,B). Sin embargo, en anteras en fase de tapetum en MCP temprana, se aprecia un incremento significativo en la señal de hibridación en el citoplasma de las células del tapetum. En esta etapa, el resto de los tejidos somáticos de la antera no presentan expresión de esta enzima (Fig.4.77-C,D). Finalmente, en anteras en fase de tapetum en MCP avanzada, se observa una señal de hibridación intensa en el citoplasma cargado de vacuolas de estas células del tapetum. Además, en esta fase, se observa señal de hibridación en células somáticas de la pared de la antera (Fig.4.77-E,F) probablemente en relación al inicio de MCP en estas células, que se degradan en etapas más avanzadas para la dehiscencia de la antera y dispersión del polen maduro.

La hibridación control con la sonda sentido, no presentó ningún tipo de señal de hibridación (datos no mostrados).

4.4.1.4 MCP inducida por estrés en un sistema experimental modelo: caracterización celular y dinámica de metilación del DNA

Con objeto de contrastar los resultados obtenidos a partir de los estudios sobre metilación del DNA durante la MCP del tapetum de *Brassica napus* y *Nicotiana tabacum*, se realizó un análisis semejante en ápices meristemáticos de raíces de *Allium cepa* sometidos a un estrés salino, sistema experimental modelo para el estudio de procesos de muerte celular.

Los meristemos de radicales de *Allium cepa* son un sistema muy proliferativo, en el que se pueden inducir procesos de muerte celular programada de forma sencilla, a partir de tratamientos salinos a una concentración determinada (sistema experimental puesto a punto previamente en el laboratorio (Cortés-Eslava J, et al., 2005). En este caso, se emplearon meristemos de raíz tratados durante 3h con solución salina 500mM, frente a meristemos radicales sin tratar.

4.78. Sistema modelo de inducción de MCP.

A,B, C,D; imágenes citoquímicas con azul de toluidina. E,F; imágenes tinción con DAPI. A,C,E; raíz control; B,D,F; raíz tratada con NaCl 500mM durante 3 h para inducción de MCP. AT; azul de toluidina.

La tinción con Azul de Toluidina de secciones longitudinales de meristemos de raíz sin tratar de cortes semifinos de Lowicryl, muestra células meristemáticas isodiamétricas en diferentes momentos del ciclo celular, alineadas longitudinalmente entre las células epidérmicas más alargadas. En la tinción con DAPI se aprecia que los cromosomas mitóticos fluorescen intensamente en diferentes etapas de la división (Fig.4.78-A,C,E).

Por otro lado, en la tinción con Azul de Toluidina de secciones longitudinales de meristemos de raíz tratados durante 3h con solución salina 500mM, se observan células meristemáticas con una gran vacuolización citoplásmica, así como un menor número de células mitóticas, núcleos lobulados con condensación cromatínica, indicativo de etapas tempranas de MCP (Fig.4.78-B,D,F).

4.4.1.4.1 Determinación de la actividad enzima caspasa 3 durante la MCP inducida por estrés de meristemos de raíz

En la figura 4.79, se observa que los extractos de proteínas totales de meristemos radicales tratados con solución salina durante 3h, registran valores de actividad caspasa 3 de 1,39 $\mu\text{moles pNA/mg/ml}$ frente a 0,24 $\mu\text{moles pNA/mg/ml}$ detectados para los meristemos de raíz control. Esto significa que el tratamiento con solución salina 500mM provoca un incremento en los niveles de actividad de la enzima de nuestro estudio.

Estos resultados, coinciden con los obtenidos en el desarrollo del tapetum de *Brassica napus* y *Nicotiana tabacum* (Figs. 4.72 y 4.73).

4.79. Actividad caspasa 3 durante la MCP inducida en meristemos radiculares de *Allium cepa*.

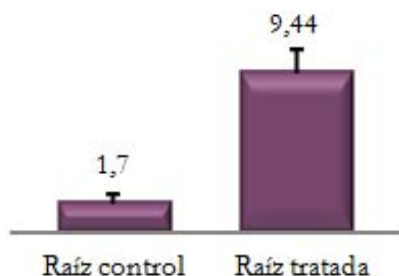
Determinación de actividad caspasa 3 en extractos de proteínas procedentes de anteras de meristemos radiculares de *Allium cepa* control y tratados con solución de NaCl 500mM durante 3h para inducción de MCP, mediante un ensayo colorimétrico con el kit comercial “Caspase-3 Assay kit, Colorimetric” (Sigma). La actividad enzimática se determinó a partir de la cantidad de producto de reacción liberado (pNA) a través de la interpolación de los valores de absorbancia a 405nm obtenidos, en la recta de calibrado preparada previamente con diferentes concentración de pNA. La medida de absorbancia a 405 nm se realizó en un equipo lector de placas Varioscan 377.

4.4.1.4.2 Cuantificación del nivel de metilación del DNA durante la MCP inducida por estrés de meristemos de raíz

En la figura 4.80, se muestran los resultados del análisis de metilación del DNA en meristemos radiculares, obtenido por HPCE. Se observa un incremento significativo de los niveles de metilación del DNA genómico en meristemos radiculares tratados con solución salina, donde se registran valores de metilación global del 9,44% frente a los meristemos de raíz control con valores de metilación global del 1,7% (Fig.4.80).

Estos resultados, coinciden con los obtenidos en el desarrollo del tapetum de *Nicotiana tabacum*.

% Metilación de DNA genómico



4.80. Cuantificación de metilación global del DNA genómico durante la MCP inducida en meristemos radiculares control y tratados con solución NaCl 500mM para inducción de MCP, mediante HPCE.

4.4.2 Localización de antígenos nucleares durante la MCP del tapetum y el desarrollo del polen

El núcleo celular es un compartimento muy estructurado y dinámico, que cambia sus funciones y arquitectura durante los procesos de desarrollo.

En esta memoria, se analizan estos cambios durante el proceso de MCP del tapetum y el desarrollo gametofítico del polen. Para ello, se realizó una estancia en el Laboratorio de “Biología Cellulare” de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Pavía, dirigido por el Profesor Marco Biggiogera, especialista en el estudio del núcleo celular durante procesos de parada transcripcional y muerte celular. Se ensayaron una serie de anticuerpos frente a moléculas implicadas en distintos aspectos del proceso de síntesis de RNA y su procesamiento. Las modificaciones en la presencia y distribución de estos marcadores nucleares, están relacionadas con cambios en los niveles de actividad transcripcional celular.

Se realizaron diversos ensayos para localizar dos tipos de moléculas, en relación a la función nuclear: a) moléculas asociadas a actividad transcripcional (híbridos DNA:RNA, “Cleavage stimulation factor” (CstF) y RNAs mensajeros poliadenilados) y b) moléculas asociadas a degradación de RNAs (RNasa A).

4.4.2.1 Núcleo y marcadores de síntesis y degradación de RNA durante la MCP del tapetum

Se emplearon cortes ultrafinos de Lowicryl K4M de anteras previamente extraídas de yemas florales en distintas fases del desarrollo, correspondientes a las etapas de tapetum activo, tapetum en MCP temprana y tapetum en MCP avanzada.

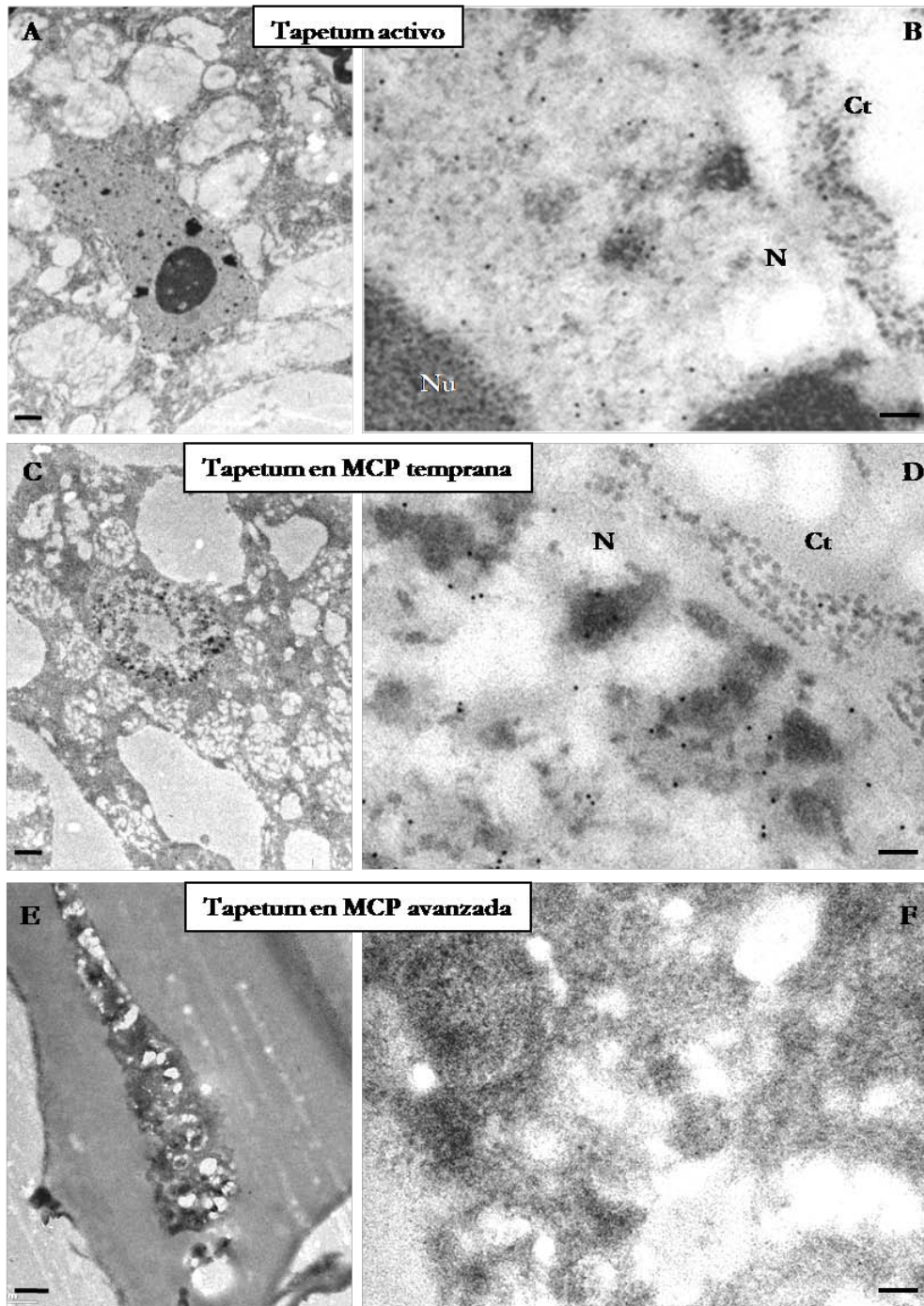
4.4.2.1.1 Inmunolocalización ultraestructural de híbridos DNA:RNA

Los híbridos DNA:RNA se forman en el núcleo de forma transitoria durante el inicio de la transcripción. Se trata de moléculas lábiles y de corta duración en el tiempo, que

pueden ser detectadas a nivel ultraestructural mediante el empleo de anticuerpos específicos anti-híbridos DNA:RNA (Testillano, Gorab and Risueño 1994).

El análisis del inmunomarcado en el microscopio electrónico de transmisión, muestra una disminución del número de moléculas DNA:RNA detectadas durante el desarrollo y MCP del tapetum. En etapas correspondientes al tapetum activo, se observa un marcado específico con el anticuerpo anti-híbrido DNA:RNA, localizado principalmente en el componente fibrilar del nucleolo y en las fibrillas pericromatínicas situadas en la periferia de las masas de cromatina condensada (Fig.4.81-B). No se observó marcado significativo en citoplasma o paredes, así como en otros dominios nucleares como las pequeñas masas de cromatina condensada o los cuerpos nucleares.

En la siguiente fase del desarrollo del tapetum estudiada, tapetum en MCP temprana, ya se observa condensación y segregación cromatínica, propio de núcleos en apoptosis, acompañado de una disminución del marcado con anti-híbrido (Fig.4.81-D), pero todavía presente, lo que sugiere que la síntesis de transcritos, es todavía activa, aunque menor que en la etapa anterior. Finalmente, en etapas correspondientes a tapetum en MCP avanzada, en las que se observan señales de apoptosis más acusadas, así como una completa desorganización del compartimento nuclear y citoplásmico, se observa una ausencia total del marcado con este anticuerpo, indicativo de una parada total de la actividad transcripcional en esta etapa (Fig.4.81-E).



4.81. Localización ultraestructural de híbridos DNA:RNA durante el desarrollo y MCP del tapetum.

Inmunomarcado con oro con anti-híbrido sobre cortes ultrafinos de anteras de *Brassica napus* en diferentes etapas del desarrollo. Imágenes obtenidas en microscopio electrónico de transmisión. A,C, E; imágenes panorámicas. B, D, F; imágenes en detalle. N; núcleo. Ct; citoplasma. Nu; nucleolo.

La ausencia de marcado en citoplasma, vacuolas, y paredes se consideró como control interno del experimento. Asimismo, los controles realizados sustituyendo el anticuerpo primario por tampón PBS, no mostraron señal alguna (datos no mostrados).

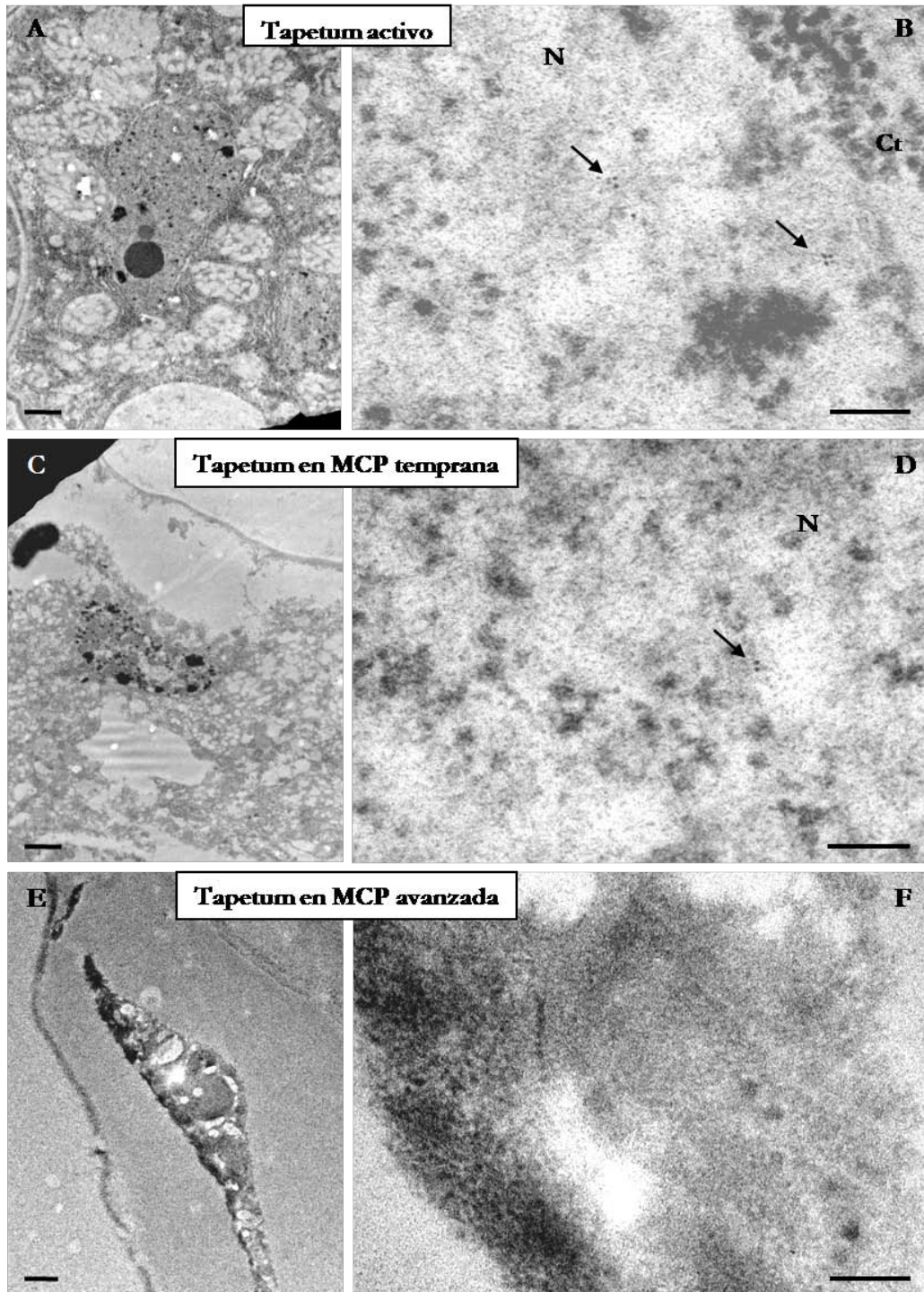
4.4.2.1.2 Hibridación *in situ* ultraestructural con Poli dT

La adición de una cola poli A en el extremo 3' del RNA mensajero (RNAm) forma parte del proceso de maduración del RNA. Esta modificación es necesaria para la exportación del RNAm al citoplasma para aumentar su estabilidad al mismo tiempo que actúa como señal para que la traducción tenga lugar adecuadamente.

Se han estudiado los niveles y localización de poli A en RNAs mensajeros, mediante hibridación *in situ* ultraestructural, sobre cortes ultrafinos de Lowicryl K4M de anteras en las diferentes etapas del desarrollo del tapetum mencionadas anteriormente. Para ello, se empleó una sonda de DNA marcada con biotina (Poli (dT)) que posteriormente se reveló con anticuerpos marcados con oro coloidal, tal y como se describió en el apartado 3.4.2. Finalmente, el resultado se analizó en el microscopio electrónico de transmisión.

En la etapa correspondiente al tapetum activo, se observa una baja señal de hibridación en el núcleo, pero muy específica. Este marcado aparece en fibrillas pericromatínicas y siempre en pequeños grupos de 2-3 partículas de oro alineadas, propio de la señal de hibridación (Fig.4.82-B). En el citoplasma también se observan pequeños grupos de partículas de oro dispersos en regiones ricas en ribosomas; los orgánulos, vacuolas y pared celular no presentan ningún marcado (Fig.4.82-B).

En etapas de tapetum en MCP temprana, se observa una ligera disminución de las partículas de oro detectadas en el núcleo, que aparecen siempre marcando estructuras fibrilares peri o intercromatínicas (Fig.4.82-D). Por último, en etapas de tapetum en MCP avanzada, ya no se observa ningún tipo de marcado de hibridación (Fig.4.82-F). Los controles negativos realizados sustituyendo la sonda por tampón PBS, no proporcionaron ninguna señal (datos no mostrados).



4.82. Localización ultraestructural de poli A durante el desarrollo y MCP del tapetum. Hibridación *in situ* ultraestructural con poli dT sobre cortes ultrafinos de anteras de *Brassica napus* en diferentes etapas del desarrollo. Imágenes obtenidas en microscopio electrónico de transmisión. A,C, E; imágenes panorámicas. B, D, F; imágenes en detalle. N; núcleo. Ct; citoplasma.

4.4.2.1.3 Inmunolocalización ultraestructural de CstF

CstF (“Cleavage Stimulation Factor”) es un factor esencial para el procesamiento del extremo 3’ del RNAm, ya que interviene en el proceso de poliadenilación o adición de la cola poli A al transcrito primario.

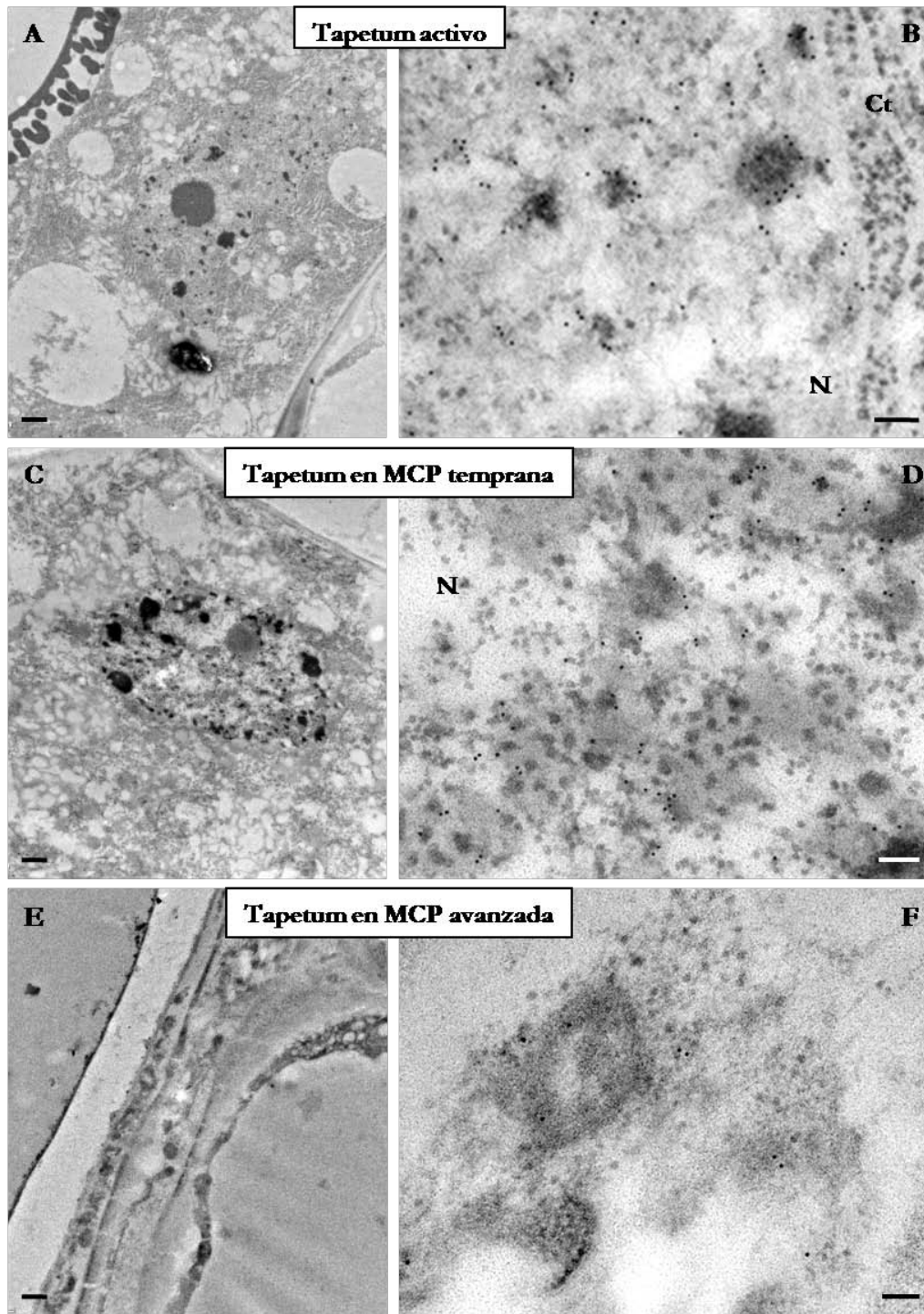
El análisis de los resultados del inmunomarcado con oro con anti-CstF en el microscopio electrónico, reveló una disminución general del marcado con dicho anticuerpo durante el desarrollo y MCP del tapetum, indicativo de la tendencia a un estado de menor actividad transcripcional (Fig.4.83).

En etapas de tapetum activo, se detecta un elevado marcado con anti-CstF. Se aprecian partículas de oro en la periferia de masas de cromatina condensada y fibrillas pericromatínicas (Fig.4.83-B).

En tapetum en MCP temprana, se observa una disminución del número de partículas de oro detectadas, las cuales aparecen en estructuras fibrilares intercromatínicas (Fig.4.83-D).

Finalmente, en etapas de tapetum en MCP avanzada, la célula está completamente desorganizada, no se puede diferenciar el compartimento del núcleo frente al del citoplasma. En esta fase, se observa una ausencia total del marcado con este anticuerpo, indicativo de la ausencia de procesos de maduración de RNA en esta fase (Fig.4.83-F).

La ausencia de marcado en citoplasma, vacuolas, y paredes se consideró como control interno del experimento. Asimismo, los controles realizados sustituyendo el anticuerpo primario por tampón PBS, no mostraron señal alguna (datos no mostrados).



4.83. Localización ultraestructural de CstF durante el desarrollo y MCP del tapetum. Inmunomarcado con oro con anti-CstF sobre cortes ultrafinos de anteras de *Brassica napus* en diferentes etapas del desarrollo. Imágenes obtenidas en microscopio electrónico de transmisión. A,C,E; imágenes panorámicas. B, D, F; imágenes en detalle. N; núcleo. Ct; citoplasma.

4.4.2.1.4 Localización ultraestructural de RNasa A

La RNasa A actúa de forma fisiológica en células metabólicamente activas como parte de la maquinaria que degrada RNAs defectuosos o cuya vida útil en la célula ha terminado. Además, se ha descrito un aumento de la actividad de la RNasa A durante procesos de MCP participando en la degradación masiva de RNAs que acompaña a la proteólisis y demás reacciones de degradación.

Se realizaron inmunomarcados ultraestructurales con el anticuerpo anti-RNasa A (que reconoce la proteína RNasa A total), sobre cortes ultrafinos de Lowicryl K4M de anteras de *Brassica napus* y *Nicotiana tabacum*, en distintas fases del desarrollo, correspondientes a las fases de tapetum activo, tapetum en inicio de MCP y tapetum en MCP avanzada.

Tanto en tabaco como en colza, se observa un incremento del marcado con RNasa A durante el desarrollo y MCP del tapetum. No obstante, existen algunas diferencias en cuanto a los tiempos del proceso desarrollo, ya que en *Nicotiana tabacum* este incremento de RNasa A parece ser más tardío.

En etapas de tapetum activo de *Brassica napus* se observa una baja presencia de marcado de RNasa A en el compartimento nuclear, siendo prácticamente inapreciable en el citoplasma; las partículas de oro se localizan dispersas sobre la región intercromatínica del núcleo (Fig.4.84-B). Sin embargo, en fases de tapetum en MCP temprana, se aprecia un incremento significativo del marcado en ambos compartimentos y por lo tanto, de la presencia de esta proteína (Fig.4.84-D). Este incremento, coincide con la aparición de marcas características de procesos de apoptosis, como condensación y segregación cromatínica y de hnRNPs. El marcado siempre aparece en la periferia de masas de cromatina, y alrededor estructuras granulares de RNPs en el núcleo, así como en zonas ricas en ribosomas en el citoplasma (Fig.4.84-D).

4.84. Localización ultraestructural de RNasa A durante el desarrollo y MCP del tapetum.

Inmunomarcado con oro con anti-RNasa A sobre cortes ultrafinos de anteras de *Brassica napus* en diferentes etapas del desarrollo. Imágenes obtenidas en microscopio electrónico de transmisión. A,C,E; imágenes panorámicas. B, D, F; imágenes en detalle. N; núcleo. Ct; citoplasma.

4.85. Localización ultraestructural de RNasa A durante el desarrollo y MCP del tapetum.

Inmunomarcado con oro con anti-RNasa A sobre cortes ultrafinos de anteras de *Nicotiana tabacum* en diferentes etapas del desarrollo. Imágenes obtenidas en microscopio electrónico de transmisión. A,C,E; imágenes panorámicas. B, D, F; imágenes en detalle. N; núcleo. Ct; citoplasma.

Finalmente, en etapas de tapetum en MCP avanzada, se aprecia una disminución significativa del marcado, indicativo de una menor presencia de RNasa A (Fig.4.84-F). En esta etapa, las células del tapetum, muestran rasgos de una apoptosis más avanzada. Se ha perdido la compartimentalización del núcleo y citoplasma y aparecen unas estructuras que recuerdan a estructuras ectópicas y heterogéneas derivadas de RNP (HERDS) descritos en células animales apoptóticas, que se forman fuera del núcleo como agregados de estructuras RNPs segregadas (Biggiogera and Pellicciari 2000) (Fig.4.84-F).

Por otro lado, en *Nicotiana tabacum*, el patrón de distribución del marcado con anti-RNasa A es similar al del *Brassica napus*. En etapas de tapetum activo se aprecian niveles de marcado de proteína de RNasa A similares a los encontrados en colza, tanto en núcleo como en citoplasma, lo que representa los niveles basales de RNasa A presente en células transcripcionalmente activas (Fig.4.85-B).

Sin embargo, en etapas de tapetum en MCP temprana, no se observan diferencias significativas respecto a la etapa anterior como ocurre en *Brassica napus* (Fig.4.85-D), sino que es en la etapa de tapetum en MCP avanzada, cuando se produce un incremento significativo de la presencia de RNasa A (Fig.4.85-F). En esta etapa, al igual que en la colza, se pueden apreciar rasgos de una apoptosis avanzada, así como de nuevo aparecen las estructuras similares a los HERDS encontrados en células animales apoptóticas.

La ausencia de marcado en citoplasma, vacuolas, y paredes se consideró como control interno del experimento. Asimismo, los controles realizados sustituyendo el anticuerpo primario por tampón PBS, no mostraron señal alguna (datos no mostrados).

4.4.2.1.5 Análisis cuantitativo del inmunomarcado con anti-RNasa A

Se realizó un estudio cuantitativo de la densidad media del marcado con oro (partículas de oro/ μm^2) observadas en el inmunomarcado con anti-RNasa A, para determinar con significación estadística las diferencias de marcado entre las diferentes fases del desarrollo del tapetum, así como entre las dos especies de estudio.

4.86. Cuantificación del inmunomarcado con anti-RNasa A durante el desarrollo y MCP del tapetum.

A; En *Brassica napus*. B; En *Nicotiana tabacum*.

Se estudiaron los compartimentos citoplásmico y nuclear, mientras que las vacuolas y paredes se tomaron como controles del experimento. Los valores de densidad de marcado en vacuolas y paredes fueron en todos los casos menor del 5% de la densidad de marcado obtenida en el citoplasma, por lo que se consideran valores sin significación, que indican el bajo nivel de ruido de fondo del experimento.

No se observan diferencias significativas en la densidad de marcado encontrada en núcleo y citoplasma en etapas estudiadas. En las fases de tapetum en MCP avanzada, la cuantificación se realizó de forma general, sin separar núcleo y citoplasma, debido a que en esta etapa se ha perdido toda la compartimentalización de núcleo y citoplasma.

La densidad media de partículas de oro en el citoplasma aumenta durante el desarrollo del tapetum en ambas especies, representado por un aumento estadísticamente significativo (“Test de t de student”, $\alpha = 0,01$) en las etapas de tapetum en MCP temprana en la colza y MCP avanzada en tabaco, fases donde se detectó mayor presencia de RNasa A.

En la figura 4.86 se representan los resultados obtenidos de la cuantificación.

4.4.2.1.6 Dinámica de los patrones de distribución de los marcadores de síntesis y degradación de RNA durante el desarrollo y MCP del tapetum

También se realizó un análisis cualitativo del nivel de marcado obtenido en los ensayos realizados con cada anticuerpo, con objeto de comparar el patrón observado para cada uno de ellos durante el desarrollo y MCP del tapetum (Fig.4.87).

De forma general, se observa que los marcadores estudiados implicados en la síntesis de RNA, disminuyen durante el desarrollo del tapetum (híbridos DNA:RNA, CstF y poli dT), mientras que el marcador de degradación de RNA estudiado (RNasa A), presenta la tendencia contraria. Esto se debe a que el avance del desarrollo del tapetum y por lo tanto, del proceso de muerte celular programada, produce una disminución de la actividad transcripcional (Fig.4.87).

La diferencia observada entre *Nicotiana tabacum* y *Brassica napus* en patrón de localización de RNasa A parece indicar un proceso de degradación de RNA más tardío en *Nicotiana tabacum*.

4.87. Cuadro- resumen de los anticuerpos empleados en el estudio del desarrollo y MCP del tapetum y los resultados obtenidos.

4.4.2.2 Núcleo y marcadores de síntesis y degradación de RNA durante el desarrollo gametofítico del polen

Con objeto de localizar marcadores de actividad transcripcional y degradación de RNAs durante el desarrollo gametofítico del polen, se realizó un estudio análogo al realizado para el desarrollo y MCP del tapetum. Para ello, se realizaron inmunomarcados con anticuerpos anti-híbrido DNA:RNA, anti-CstF, anti-RNasa A e hibridación *in situ* con Poli (dT), sobre cortes ultrafinos de Lowicryl K4M de anteras en fase de microspora vacuolada y polen bicelular en las especies de *Brassica napus* y *Nicotiana tabacum*.

4.88. Localización ultraestructural de híbridos DNA:RNA durante el desarrollo gametofítico.

Inmunomarcado con oro con anti-híbrido sobre cortes ultrafinos de anteras de *Brassica napus* en diferentes etapas del desarrollo. Imágenes obtenidas en microscopio electrónico de transmisión. A; microspora vacuolada. B; polen bicelular. N; núcleo. Ct; citoplasma. NV; núcleo vegetativo.

4.4.2.2.1 Inmunolocalización ultraestructural de híbridos DNA:RNA

La localización de híbridos DNA:RNA, se llevó a cabo mediante inmunomarcado con oro con un anticuerpo anti-híbrido, seguido del análisis en el microscopio electrónico de transmisión.

Los resultados obtenidos muestran una disminución del número de híbridos DNA:RNA detectados durante la maduración del polen (Fig.4.87).

En etapas correspondientes a microspora vacuolada, se observa un marcado específico con el anticuerpo anti-híbrido DNA:RNA, localizado principalmente en las fibrillas pericromatínicas localizadas en la periferia de regiones de cromatina condensada (Fig.4.88-A).

Sin embargo, en la fase polen bicelular se observa una drástica disminución del marcado con este anticuerpo, indicativo de una disminución de la actividad transcripcional en esta etapa (Fig.4.88-B).

La ausencia de marcado en citoplasma, vacuolas, y paredes se consideró como control interno del experimento. Asimismo, los controles realizados sustituyendo el anticuerpo primario por tampón PBS, no mostraron señal alguna (datos no mostrados).

4.4.2.2.2 Hibridación *in situ* ultraestructural con Poli dT

Con objeto de estudiar los niveles y la localización de poli A en RNAs mensajeros se llevó a cabo una hibridación *in situ* ultraestructural sobre cortes ultrafinos de Lowicryl K4M de anteras en las principales etapas del desarrollo gametofítico del polen de *Brassica napus* (fase de microspora vacuolada y polen bicelular).

Para ello, se empleó una sonda de DNA marcada con biotina (Poli (dT)) que posteriormente se reveló con anticuerpos marcados con oro coloidal, tal y como se

describió en el apartado 3.4.2 para su posterior análisis en el microscopio electrónico de transmisión.

4.89. Localización ultraestructural de poli A durante el desarrollo gametofítico.

Hibridación *in situ* ultraestructural con poli dT sobre cortes ultrafinos de anteras de *Brassica napus* en diferentes etapas del desarrollo. Imágenes obtenidas en microscopio electrónico de transmisión. A; microspora vacuolada. B; polen bicelular. N; núcleo. Ct; citoplasma. Marcado con oro indicado con flechas.

En la figura 4.89, se muestran los resultados obtenidos. En la etapa correspondiente a microspora vacuolada, se observa marcado de hibridación, no muy abundante, pero muy específico. Este marcado aparece en fibrillas pericromatínicas y preferentemente en pequeños grupos de 2-4 partículas de oro alineadas, propio de la señal de hibridación y en regiones ricas en ribosomas del citoplasma (Fig.4.89-A). En etapas de polen bicelular, el patrón de localización de la señal de hibridación es similar, pero se observa una ligera disminución de las partículas de oro detectadas en esta etapa (Fig.4.89-B).

La ausencia de marcado en citoplasma, vacuolas, y paredes se consideró como control interno del experimento. Asimismo, los controles realizados sustituyendo el anticuerpo primario por tampón PBS, no mostraron señal alguna (datos no mostrados).

4.4.2.2.3 Inmunolocalización ultraestructural de CstF

El análisis del inmunomarcado con el anticuerpo anti-CstF, en el microscopio electrónico muestra una disminución general del marcado con dicho anticuerpo durante el desarrollo del polen, indicativo de la tendencia a un estado de menor actividad transcripcional (Fig.4.90).

En etapas de microspora vacuolada, se detecta un elevado marcado con anti-CstF. Se aprecian partículas de oro en la periferia de masas de cromatina condensada y fibrillas pericromatínicas (Fig.4.90-A).

Por otro lado, en el polen bicelular, se puede apreciar una disminución significativa del número de partículas de oro detectadas, indicativo de la baja presencia de procesos de maduración de RNA en esta fase (Fig.4.90-B).

La ausencia de marcado en citoplasma, vacuolas, y paredes se consideró como control interno del experimento. Asimismo, los controles realizados sustituyendo el anticuerpo primario por tampón PBS, no mostraron señal alguna (datos no mostrados).

4.90. Localización ultraestructural de CstF durante el desarrollo gametofítico.

Inmunomarcado con oro con anti-CstF sobre cortes ultrafinos de anteras de *Brassica napus* en diferentes etapas del desarrollo. Imágenes obtenidas en microscopio electrónico de transmisión. A; microspora vacuolada. B; polen bicelular. N; núcleo. Ct; citoplasma.

4.4.2.2.4 Inmunolocalización ultraestructural de RNasa A

Se realizaron inmunomarcados ultraestructurales con el anticuerpo anti-RNasa A (que reconoce la proteína RNasa A total), sobre cortes ultrafinos de Lowicryl K4M de anteras de *Brassica napus* y *Nicotiana tabacum*, en las principales etapas del desarrollo del polen, correspondientes a las fases de microspora vacuolada y polen bicelular.

En colza, en las dos etapas del desarrollo estudiadas se detectan partículas de oro en núcleo y citoplasma, siendo este marcado mayor en el citoplasma en la etapa de microspora vacuolada, donde se observan las partículas de oro dispersas en zonas ricas en ribosomas (Fig.4.91-A). Sin embargo, en la etapa de polen bicelular, se aprecia una disminución en el marcado citoplásmico, mientras que el marcado en núcleo se mantiene con respecto a la etapa anterior (Fig.4.91-B).

Por otro lado, en el compartimento nuclear la presencia de RNasa A en las dos etapas de estudio se localiza principalmente en la periferia de las masas de cromatina condensada (Figs.4.91-A,B).

En tabaco, no se aprecia ninguna variación de los niveles de RNasa A con la maduración del polen (Fig.4.92). Al igual que en la colza, se observan partículas de oro en núcleo y citoplasma, siendo la presencia de estas más abundante en el citoplasma.

La ausencia de marcado en citoplasma, vacuolas, y paredes se consideró como control interno del experimento. Asimismo, los controles realizados sustituyendo el anticuerpo primario por tampón PBS, no mostraron señal alguna (datos no mostrados).

4.91. Localización ultraestructural de RNasa A durante el desarrollo gametofítico.

Inmunomarcado con oro con anti-RNasa A sobre cortes ultrafinos de anteras de *Brassica napus* en diferentes etapas del desarrollo. Imágenes obtenidas en microscopio electrónico de transmisión. A; microspora vacuolada. B; polen bicelular. N; núcleo. Ct; citoplasma.

4.92. Localización ultraestructural de RNasa A durante el desarrollo gametofítico.

Inmunomarcado con oro con anti-RNasa A sobre cortes ultrafinos de anteras de *Nicotiana tabacum* en diferentes etapas del desarrollo. Imágenes obtenidas en microscopio electrónico de transmisión. A; microspora vacuolada. B; polen bicelular. N; núcleo. Ct; citoplasma.

4.4.2.2.4.1 Análisis cuantitativo del inmunomarcado con anti-RNasa A durante el desarrollo gametofítico del polen

Se realizó un estudio cuantitativo de la densidad media de partículas de oro (partículas de oro/ μm^2) observadas en el inmunomarcado con anti-RNasa A, para determinar con significación estadística las diferencias de marcado entre las diferentes fases del desarrollo del polen, así como entre las dos especies de estudio.

Se estudió el compartimento nuclear y citoplásmico, mientras que las vacuolas, y paredes se tomaron como controles del experimento. Los valores de densidad de marcado en vacuolas y paredes fueron en todos los casos menor del 5% de la densidad de marcado obtenida en el citoplasma, por lo que se consideran valores sin significación que indican el bajo nivel de ruido de fondo del experimento.

En la colza, se aprecia una mayor densidad de marcado en el citoplasma respecto al compartimento nuclear en la fase de microspora vacuolada (Fig.4.93-A). Los niveles de RNasa A en núcleo no varían con el desarrollo del polen, sin embargo, la densidad media de partículas de oro en citoplasma disminuye con el proceso de maduración del polen, representado por una disminución estadísticamente significativa para el “Test de t de student” ($\alpha= 0,01$) en las etapas de microspora vacuolada y polen maduro (Fig.4.93-A).

Por otro lado, en tabaco, aunque se observan algunas similitudes con los resultados obtenidos en la colza, también se aprecian algunas diferencias.

Los niveles de RNasa A en citoplasma son significativamente mayores que los del compartimento nuclear en la fase de microspora vacuolada, al igual que se ha descrito en colza. No obstante, en *Nicotiana tabacum*, la diferencia entre la densidad media de partículas de oro detectadas en citoplasma y núcleo se mantiene durante el proceso de maduración del polen, siendo también mayor en citoplasma que en núcleo en el polen maduro (Fig.4.93-B).

Esta diferencia entre las dos especies en cuanto a la presencia de RNasa A en el citoplasma del polen maduro, sugiere que la disminución de la actividad transcripcional y metabólica (y por lo tanto de RNasa A) que acompaña a la maduración del polen, se produce antes en *Brassica napus* que en *Nicotiana tabacum*, lo cual podría estar en relación con el hecho de que el polen de la colza madura en la antera hasta la fase final de formación de las células espermáticas, liberando polen tritelular, mientras que en tabaco, el polen maduro es bicelular y solo tras la germinación del tubo polínico tiene lugar la división de la célula generativa.

4.93. Cuantificación del inmunomarcado con anti-RNasa A durante el desarrollo y MCP del tapetum.

A; En *Brassica napus*. B; En *Nicotiana tabacum*.

4.4.2.2.5 Análisis cualitativo de los marcadores de síntesis y degradación de RNA durante el desarrollo gametofítico del polen

Se realizó un análisis cualitativo del nivel de marcado obtenido en los ensayos realizados con cada anticuerpo, con objeto de comparar el patrón observado para cada uno de ellos durante el desarrollo gametofítico del polen (Fig.4.94).

Se observa que los marcadores estudiados implicados en la síntesis (híbridos DNA:RNA, CstF y poli(dT)) y degradación de RNA (RNasa A) disminuyen durante el desarrollo y maduración del grano de polen. Estos resultados están en relación con el hecho de que el avance del proceso de diferenciación del grano de polen, conlleva una disminución de la actividad transcripcional (Fig.4.94).

4.94. Cuadro- resumen de los anticuerpos empleados en el estudio del desarrollo y MCP del tapetum y los resultados obtenidos.

4.5 MUERTE CELULAR DURANTE LAS PRIMERAS ETAPAS DEL CULTIVO *IN VITRO* DE LA MICROSPORA PARA INDUCCIÓN A EMBRIOGÉNESIS

Brassica napus es considerada una especie modelo para el estudio de embriogénesis de polen, con una gran eficacia en la respuesta embriogénica. No obstante, después del estrés inductor de embriogénesis, tan solo un 2% de las microsporas cambian su ruta hacia un desarrollo embriogénico, mientras que el resto de microsporas que no responden a la inducción, siguen otras rutas de desarrollo todavía desconocidas.

En esta Tesis, se han analizado los niveles de muerte celular durante las primeras etapas del cultivo *in vitro* de microsporas de *Brassica napus*, para tratar de entender algunas de las rutas de desarrollo que siguen algunas de las microsporas que no responden al estrés inductor.

4.5.1 Detección de muerte celular durante las primeras etapas del cultivo *in vitro* de microsporas

Como marcador de muerte celular en el cultivo, se utilizó un colorante impermeable, “Azul de Evans”, que sólo penetra en aquellas células que presentan daños en la membrana.

El estudio se llevó a cabo en las primeras etapas del cultivo. Se recogieron muestras tras el aislamiento de microsporas (día 0), paso previo a la puesta en cultivo, así como transcurridos 4 y 8 días del inicio del mismo (Día 4 y día 8).

Las muestras recogidas, se incubaron en el colorante y tras sucesivos lavados, se observaron en el microscopio óptico (Apartado 3.3.7).

En esta observación, se identifican como estructuras muertas, aquellas en las que el colorante Azul de Evans ha penetrado en su interior, de manera que aparecen teñidas de azul, mientras que las estructuras que aparecen sin teñir, se identifican como estructuras vivas.

En la figura 4.95, se muestran 3 panorámicas representativas de los resultados obtenidos tras la tinción con Azul de Evans en los distintos tiempos del cultivo mencionados.

En el día 0 del cultivo (después del aislamiento de microsporas), se observa una población celular de tamaño homogéneo, correspondiente en su mayoría, a la fase de microspora vacuolada, por tratarse de la etapa seleccionada para el cultivo por su mayor respuesta a embriogénesis (Fig.4.95-A). La mayoría de estas células aparecen sin teñir con Azul de Evans, lo que indica que se trata de células vivas. Por otro lado aparecen también células teñidas de azul, identificadas como células muertas.

A los 4 días del cultivo, se observa claramente una población celular de tamaño heterogéneo (Fig.4.95-B). Las estructuras de mayor tamaño, se identifican como estructuras multicelulares derivadas de microsporas que han reprogramado su ruta de desarrollo hacia una ruta embriogénica. Estas estructuras aparecen sin teñir con Azul de Evans, indicando que son estructuras vivas que probablemente continuarán el desarrollo embrionario. Mientras que las estructuras de menor tamaño, que se corresponden a microsporas que no han respondido al estrés inductor, aparecen teñidas de azul, indicando que se trata de células muertas. No obstante, de forma ocasional, se pueden observar estructuras multicelulares que aparecen teñidas de azul, indicando que son estructuras derivadas de microsporas que cambiaron su programa de desarrollo hacia la ruta embriogénica y posteriormente, murieron (Fig.4.95-B). En esta etapa, se aprecia un incremento del número de estructuras muertas respecto a la etapa anterior (Fig.4.95-A).

A los 8 días en cultivo, se observa de nuevo una población heterogénea (Fig.4.90-C). En este caso, el tamaño de las estructuras que aparecen sin teñir es mayor que en la etapa anterior (Día 4), ya que se trata de proembriones que ya han roto su exina. Al igual que en la etapa anterior, solo las estructuras de menor tamaño, correspondientes a microsporas que no han respondido al estrés inductor, aparecen teñidas con Azul de Evans. En esta etapa, también se pueden observar ocasionalmente algunas estructuras multicelulares teñidas de azul (Fig.4.95-C).

4.95. Detección de muerte celular durante las primeras etapas del cultivo de microsporas.

La muerte celular se detectó mediante preparaciones en aplastado con Azul de Evans en muestras recogidas a diferentes tiempos de los cultivos de microsporas de *Brassica napus*. Las células que aparecen en azul son las células muertas.

A través de la observación en el microscopio óptico de las todas las réplicas analizadas para cada etapa, se cuantificó el porcentaje de muerte celular en cada una de las etapas del cultivo mencionadas. Los resultados obtenidos de dicha cuantificación se muestran en la (Fig.4.96). Tras el aislamiento de microsporas seleccionadas en el estadio de mayor respuesta a embriogénesis, previo a la puesta en cultivo, ya se observa un nivel alto de muerte celular, probablemente producido por el estrés del proceso de aislamiento y puesta en cultivo. (En este momento, se registran valores de muerte celular de 35,59%).

Posteriormente, se observa un incremento del número de estructuras muertas durante la progresión del cultivo. Por otro lado, en muestras recogidas a los 4 días del inicio del cultivo, donde predominan estructuras multicelulares todavía con exina, se registran valores de muerte celular del 56,53%, lo que supone un incremento del 21% respecto a la etapa anterior (Fig.4.96).

Finalmente, en muestras recogidas a los 8 días del inicio del cultivo, en las que predominan estructuras que ya han roto la exina, se obtuvieron valores del 64,47%, lo que supone un aumento del 8% respecto a la etapa anterior (Fig.4.96).

4.96. Cuantificación de los niveles de muerte celular durante las primeras etapas del cultivo de microsporas.

Cuantificación de muerte celular durante las primeras etapas del cultivo de microsporas de *Brassica napus*, a partir de los resultados de la tinción con Azul de Evans.

4.5.2 Muerte celular programada durante las primeras etapas del cultivo *in vitro* de microsporas

Con objeto de identificar la posible implicación de procesos de muerte celular programada (MCP) en las rutas de desarrollo que siguen las microsporas que no responden al estrés inductor, se llevó a cabo el estudio de la localización y actividad de la enzima caspasa 3, una de las enzimas efectoras implicada en procesos de MCP.

Para ello, se realizaron estudios de localización de caspasa 3 activa, mediante inmunofluorescencia y "Western Blot", así como de determinación de actividad

enzimática caspasa 3 en extractos de proteínas totales correspondientes a las distintas etapas del cultivo analizadas.

4.5.2.1 Localización de la forma activa de la enzima caspasa 3

La localización de caspasa 3 se realizó a partir del anticuerpo “anti-Cleaved Caspase-3” que sólo reconoce la forma activa de esta proteína, originada al romperse la pro-caspasa 3 o zimógeno por la actuación de otras proteasas específicas. El estudio se llevó a cabo mediante dos tipos de aproximaciones: técnicas de inmunofluorescencia, para la localización *in situ* de la enzima caspasa 3 y mediante Western Blot.

4.5.2.1.1 “Inmunoblotting”

Con objeto de confirmar la especificidad del anticuerpo frente a la forma activa de la enzima caspasa 3 en el material de estudio, se realizó un Western Blot a partir de extractos de proteínas totales obtenidos de muestras de cultivos recogidas tras el aislamiento de microsporas, (día 0 del cultivo) y muestras recogidas a los 4 días de cultivo. El revelado del inmunoblotting se llevó a cabo mediante ECL (Apartado 3.6.3.2).

En extractos de proteínas totales de las muestras recogidas a los 4 días del inicio del cultivo, se detecta una banda de aproximadamente 19kD, peso molecular esperado correspondiente a la enzima caspasa 3 activa. Sin embargo, en las mismas condiciones experimentales, en extractos de proteínas totales de muestras recogidas en el día 0 de cultivo, no se observó la presencia de esta enzima (Fig.4.97).

Las mismas membranas utilizadas para el “inmunoblotting”, se tiñeron previamente con el colorante “Rojo Ponceau”, revelando una cantidad y patrón de proteínas totales análogo en las dos muestras (Día 0 y Día 4) (Fig.4.97).

4.97. Inmunoblot Caspasa 3.

Marcador de pesos moleculares *Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards*, Bio-Rad. Revelado mediante ECL. Las bandas correspondientes se visualizaron mediante la cámara CCD del equipo “Luminiscent Image Analyzer LAS-3000®” (Fujifilm). La tinción con Rojo Ponceau se empleó como control de carga y de la transferencia.

4.5.2.1.2 Inmunolocalización subcelular de la forma activa de caspasa 3 mediante inmunofluorescencia

El experimento de inmunolocalización se llevó a cabo sobre criocortes semifinos de muestras recogidas tras el aislamiento de microsporas (Día 0 del cultivo) y a los 4 días del inicio del cultivo.

4.98. Localización de caspasa 3 durante las primeras etapas del cultivo de microsporas.

Inmunofluorescencia con anti-caspasa 3 sobre criocortes de muestras recogidas tras el aislamiento y a los 4 días de cultivo de microsporas de *Brassica napus*. La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la localización de caspasa 3 marcada con Alexa fluor 488. A; imagen panorámica de microsporas tras el aislamiento. B; imagen panorámica de microsporas a los 4 días del inicio de cultivo.

4.99. Localización de caspasa 3 en microsporas no inducidas a embriogénesis a los 4 días de cultivo.

Inmunofluorescencia con anti-caspasa 3 sobre criocortes de muestras recogidas a los cuatro días de cultivo de microsporas de *Brassica napus*. La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la localización de caspasa 3 marcada con Alexa fluor 488. A,C,E: localización de caspasa 3. B,D,F; imágenes obtenidas mediante contraste diferencial de Nomarsky.

4.100. Localización de caspasa 3 en microsporas embriogénicas a los 4 días de cultivo.

Inmunofluorescencia con anti-caspasa 3 sobre criocortes de muestras recogidas a los cuatro días de cultivo de microsporas de *Brassica napus*. La fluorescencia azul corresponde al DAPI, marcador de núcleos y la verde a la localización de caspasa 3 marcada con Alexa fluor 488. A,C,E: localización de caspasa 3. B,D,F; imágenes obtenidas mediante contraste diferencial de Nomarsky.

En la figura 4.98-A, se observa que tras el aislamiento de microsporas, no se detecta caspasa 3 activa. Sin embargo, transcurridos 4 días desde el inicio del cultivo, se observa que algunas estructuras presentan una señal citoplásmica fluorescente indicando la presencia de caspasa 3 activa (Fig.4.98-B) junto a otras negativas.

Las estructuras con señal de inmunofluorescencia citoplásmica se corresponden con microsporas que no han respondido al estrés inductor, ya que no presentan su morfología típica con varios núcleos ni paredes celulares interiores (Fig.4.99-A,C,E).

Por otro lado, se observa que las estructuras multicelulares derivadas de microsporas presentes a los 4 días del inicio del cultivo, no poseen señal fluorescente, lo que indica la ausencia de la forma activa de esta enzima en este tipo de estructuras (Fig.4.100-A,C,E).

4.5.2.2 Determinación de la actividad enzimática caspasa 3

Se han analizado los niveles de actividad de caspasa 3 durante las primeras etapas del desarrollo embriogénico de *Brassica napus* mediante un ensayo enzimático *in vitro* basado en la detección espectrofotométrica del cromóforo p-nitroanilina (pNA) liberado tras la proteólisis del sustrato sintético específico de la enzima caspasa 3, Acetil-Asp-Glu-Vaal-Asp p-Nitroanilina (Ac-DEVD-pNA) (Apartado 3.7).

El estudio se llevó a cabo en muestras recogidas tras el aislamiento de microsporas (día 0 del cultivo) y transcurridos 4 y 8 días desde el inicio del cultivo.

Se empleó un inhibidor específico de la actividad caspasa 3, “Ac-DEVD-CHO-Inhibitor”, como control del experimento. De manera que en cada muestra se evaluó la actividad caspasa 3 en presencia y ausencia de este inhibidor.

En el día 0 de cultivo, se registran valores de actividad caspasa 3 muy bajos (0,18 nmol pNA/min/mg) (Fig.4.101). Sin embargo, en extractos de proteínas totales de muestras recogidas a los 4 días en cultivo, se observa un incremento significativo de la actividad caspasa 3 (valores de 1,28 nmol pNA/min/mg), momento en el que se registra la máxima actividad de esta enzima. Finalmente, a los 8 días del inicio del cultivo, se aprecia una disminución de los niveles de actividad caspasa 3, registrándose valores similares a los obtenidos en el día 0 del cultivo (0,21 nmol pNA/min/mg).

4.101. Actividad caspasa 3 durante la MCP inducida en meristemos radiculares de *Allium cepa*.

Determinación de actividad caspasa 3 en extractos de proteínas procedentes de muestras recogidas tras el aislamiento y a los 4 días de cultivo de microsporas de *Brassica napus*,

mediante un ensayo colorimétrico con el kit comercial “Caspase-3 Assay kit, Colorimetric” (Sigma). La actividad enzimática se determinó a partir de la cantidad de producto de reacción liberado (pNA) a través de la interpolación de los valores de absorbancia a 405nm obtenidos, en la recta de calibrado preparada previamente con diferentes concentración de pNA. La medida de absorbancia a 405 nm se realizó en un equipo lector de placas Varioscan 377.

AC-DEDV-CHO inhibe la actividad caspasa 3 en todos los puntos ensayados (Fig.4.101) demostrando la especificidad del ensayo. Los niveles de actividad registrados en cada una etapas del cultivo en presencia del inhibidor son prácticamente nulas (0,01, 0,05 y 0,01 μ moles pNA/mg/ml, para el día 0, tras 4 y 8 días desde el inicio del cultivo, respectivamente).

- Bedinger, P. (1992) THE REMARKABLE BIOLOGY OF POLLEN. *Plant Cell*, 4, 879-887.
- Biggiogera, M. & C. Pellicciari (2000) Heterogeneous ectopic RNP-derived structures (HERDS) are markers of transcriptional arrest. *Faseb Journal*, 14, 828-834.
- Bueno, M. A., B. Pintos, M. Hofer & A. Martín (2005) Pro-embryos induction from *Olea europaea* L. isolated microspore culture. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27, 695-701.
- Papini, A., S. Mosti & L. Brighigna (1999) Programmed-cell death events during tapetum development of angiosperms. *Protoplasma*, 207, 213-221.
- Testillano, P. S., E. Gorab & M. C. Risueño (1994) A NEW APPROACH TO MAP TRANSCRIPTION SITES AT THE ULTRASTRUCTURAL LEVEL. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 42, 1-10.
- Wu, H. M. & A. Y. Cheung (2000) Programmed cell death in plant reproduction. *Plant Molecular Biology*, 44, 267-281.

5 DISCUSIÓN

5.1 MEJORAS EN LA EFICIENCIA DE INDUCCIÓN A EMBRIOGÉNESIS DE LA MICROSPORA MEDIANTE ESTRÉS TÉRMICO Y DESARROLLO DE UN NUEVO SISTEMA *IN VITRO*

Durante la realización de esta Tesis se ha establecido un sistema de cultivo *in vitro* de microsporas de *Brassica napus* con una gran eficiencia de reprogramación a embriogénesis, así como de regeneración de plantas doble haploides.

5.1.1 Optimización del sistema *in vitro* de embriogénesis de microsporas de *Brassica napus* a 32°C

Existen numerosos factores tanto endógenos como exógenos que afectan a la respuesta embriogénica de las microsporas en cultivo (Atanassov et al. 1995, Smykal 2000, Wang, van Bergen and Van Duijn 2000, Datta 2005). En la optimización del cultivo de microsporas aisladas para la producción de plantas doble haploides, se debe tener en cuenta: el genotipo, el estado fisiológico y condiciones de crecimiento de las plantas donadoras, la fase de desarrollo del polen, el método de aislamiento de microsporas, condiciones de cultivo e inducción de microsporas y germinación de embriones y regeneración de plantas, junto con sus interacciones, ya que todos ellos son factores que afectan de forma importante a la respuesta de las microsporas al cultivo *in vitro*.

El estado fisiológico y las condiciones de crecimiento de las plantas donadoras

Un requisito esencial para la correcta respuesta de microsporas a la inducción de embriogénesis son las condiciones fisiológicas de las plantas donadoras.

Las plantas donadoras pueden crecerse en el campo, en el invernadero o en cámaras de crecimiento controlado, siendo estas últimas las que proporcionan condiciones más favorables, ya que permiten el control de temperatura, humedad, fotoperiodo e intensidad de luz y proporcionan un espacio cerrado minimizando las infecciones y ataques de insectos.

Varios trabajos han mostrado la influencia del ambiente de crecimiento en la totipotencia de las microsporas (Chuong et al. 1988, Gland, Lichter and Schweiger 1988, Lichter 1989, Takahata, Brown and Keller 1991). Aunque los acontecimientos celulares que tienen lugar después del tratamiento de estrés inductor de embriogénesis a partir de microsporas aisladas han sido objeto de numerosos estudios (Zaki and Dickinson 1991, Telmer, Simmonds and Newcomb 1992, Segui-Simarro, Testillano and Risueño 2003, Testillano et al. 2005), la razón por la que microsporas en la misma etapa de desarrollo, obtenidas de diferentes ambientes de crecimiento reaccionan de forma distinta al mismo estímulo, aún permanece siendo un misterio.

En nuestro estudio se ensayaron cultivos de microsporas a partir de plantas donadoras crecidas en invernadero a 18°C y en cámaras de crecimiento en condiciones controladas a menor temperatura (15°C y 10°C durante el día y la noche, respectivamente), obteniendo mejores rendimientos en los cultivos procedentes de cámaras de crecimiento.

Las condiciones fisiológicas de las plantas donadoras afectan al número de granos de polen producidos y su viabilidad (Heberleborgs 1985), a los niveles endógenos de hormonas y al estado nutricional del tejido de la antera (sunderland y Dunwell, 1977), factores que determinan el éxito de las condiciones de inducción del proceso de reprogramación. El estado metabólico de las células en diferenciación en las plantas donadoras afecta de forma directa a todos los procesos celulares y subcelulares del desarrollo de las microsporas (Dunwell and Thurling 1985, Gland et al. 1988).

En nuestros resultados, las plantas donadoras sometidas a condiciones ambientales óptimas estrictamente controladas en las cámaras de crecimiento, contendrían una mayor proporción de microsporas en el estadio idóneo y probablemente metabólicamente más óptimo, lo que podría ser una de las causas de obtener una mayor respuesta embriogénica frente aquellas procedentes de donadoras crecidas en el invernadero, independientemente de la temperatura de inducción.

Las condiciones de crecimiento de las plantas donadoras no sólo juegan un importante papel en la respuesta de las microsporas a la reprogramación, sino también en la regeneración de los embriones obtenidos. Por ejemplo se ha descrito que plantas de cebada crecidas en cámara de crecimiento (en condiciones controladas) producen una mayor cantidad de doble haploides que las plantas crecidas en invernadero, donde las condiciones parecen no estar estrictamente controladas (Dahleen 1999).

Por otra parte, la temperatura de crecimiento de las plantas donadoras por sí misma, también tiene una gran influencia en la respuesta de las microsporas al estrés inductor, como se ha descrito en varios estudios en cebada (Foroughiwehr et al. 1976), en colza (Keller and Stringham 1978; (Dunwell, Cornish and Decourcel 1985) y en maíz (Lazar, Baenziger and Schaeffer 1984).

El crecimiento de plantas donadoras en condiciones ambientales estrictamente controladas, especialmente sometidas a bajas temperaturas, como en este estudio (15°C durante el día y 10°C durante la noche) propicia un metabolismo más lento en comparación con aquellas otras plantas crecidas bajo condiciones parcialmente controladas o en el campo. Se ha demostrado que este cambio en el metabolismo es el resultado de la alteración de los niveles endógenos de los reguladores del crecimiento y utilización de nutrientes por las microsporas y anteras (Lo and Pauls 1992).

Nuestros resultados mostraron una mejor respuesta embriogénica en las microsporas de plantas donadoras crecidas en condiciones de bajas temperaturas; Esto podría deberse a que las condiciones de baja temperatura ralentizan el desarrollo *in vivo* de las microsporas, favoreciendo la sincronización de las microsporas dentro de la antera. De esta manera, la selección de botones florales para cultivo *in vitro* a partir de plantas donadoras crecidas en condiciones de bajas temperatura, contendría una mayor proporción de células en la etapa de máxima respuesta embriogénica, la microspora vacuolada tardía, proporcionando una mayor eficiencia final en la inducción a embriogénesis respecto a cultivos de plantas donadoras crecidas a mayor temperatura.

Durante el desarrollo *in vivo* del polen, cualquier reducción nutricional o cambio ambiental, puede afectar al desarrollo del polen y viabilidad. Nuestros resultados mostraron que las plantas donadoras sometidas a condiciones ambientales estrictamente controladas contendrían una mayor proporción de microsporas en el estadio metabólico óptimo y por lo tanto, una mayor respuesta embriogénica que aquellas otras plantas donadoras crecidas en invernadero, independientemente de la temperatura de inducción.

Por otro lado, el crecimiento de las plantas donadoras bajo condiciones controladas, a baja temperatura, como se ha establecido en esta Tesis, además de aumentar la eficiencia del sistema, proporciona unas condiciones más estables tanto a nivel celular como molecular, requerimiento indispensable a la hora de realizar estudios comparativos de procesos de desarrollo, lo cual ha sido un factor clave para la optimización y establecimiento del sistema *in vitro*.

Selección adecuada de la fase del desarrollo de la microspora

La correcta selección de la fase del desarrollo de la microspora es un factor clave, que afecta de manera importante a la inducción a embriogénesis de microsporas (Pechan and Keller 1988, Gland et al. 1988, Takahata et al. 1991, Guo and Pulli 1996, Prem, Gupta and Agnihotri 2005, González-Melendi et al. 1995, Barany et al. 2005).

En *Brassica napus*, como en muchas otras especies, la fase seleccionada que mejor responde a la inducción a embriogénesis es la fase de microspora vacuolada tardía, probablemente debido a su estado de actividad transcripcional y no completamente diferenciado (González-Melendi et al. 1995, Malik et al. 2007), mientras que después de la división mitótica, el polen empieza a acumular reservas y pierde su capacidad embriogénica, siguiendo una ruta de desarrollo gametofítica (Raghavan 1990, Heberle-Bors 1990).

Por este motivo, es de gran importancia comprobar la fase de desarrollo del polen mediante una tinción con DAPI (Fan, Armstrong and Keller 1988) para establecer una relación entre el tamaño del botón floral y la fase de desarrollo de las

microsporas, que permita realizar una correcta selección de los botones florales con mayor contenido de microsporas en la fase adecuada para proceder a hacer el cultivo. A pesar de esta estricta selección, a menudo se obtienen microsporas en diferentes fases entre anteras procedentes de la misma flor o incluso dentro de una misma antera, lo que deriva en una población no completamente homogénea al inicio del cultivo (Vasil 1967, Shull and Menzel 1977, Hidaka T 1979, Hidaka T 1981, Z. 1985). No obstante, conocer la proporción de microsporas fuera de la fase de desarrollo de mayor respuesta al inicio del cultivo (microspora joven y polen bicelular) es esencial, ya que sólo las células en fase de microspora vacuolada podrán cambiar su ruta de desarrollo hacia la embriogénesis (González-Melendi et al. 1995, Barany et al. 2005, Solis et al. 2008) de las cuales, únicamente un 1%, progresarán hasta la formación de embriones cotiledonares maduros. Además, trabajos previos defienden que la presencia de microsporas en el cultivo fuera de la fase adecuada, tienen un efecto inhibitorio en el cambio de ruta de desarrollo de aquellas otras microsporas que están en la fase adecuada (Kott et al. 1988b).

En esta Memoria, se ha establecido la correlación entre el tamaño de la yema floral y la fase de la microspora, en las condiciones de crecimiento controladas de la planta donadora, identificándose como mejor criterio de selección la yema de 3.2-3.4 mm, ya que contiene una mayor proporción de microsporas vacuoladas que otras yemas florales procedentes de plantas crecidas en condiciones no controladas. Una mayor presencia de microsporas en la etapa adecuada aporta un mayor rendimiento en la obtención de embriones.

Aislamiento de microsporas y puesta en cultivo

La eliminación de todo tipo de contaminantes (bacterias y hongos) de la superficie de los botones florales recogidos y seleccionados en la etapa de mayor respuesta embriogénica, mediante esterilización con hipoclorito sódico, es un paso fundamental para la correcta progresión del cultivo.

Tanto para el aislamiento de microsporas como para la puesta en cultivo se empleó el medio de cultivo NLN (Lichter 1982), ampliamente utilizado en los cultivos de microsporas de *Brassica napus*.

La composición del medio de cultivo juega un papel fundamental en la inducción de microsporas a embriogénesis *in vitro*. Cada especie presenta requerimientos diferentes para ello. Los requerimientos nutricionales de las microsporas aisladas son más exigentes que para los cultivos de anteras (Bajaj 1977, Bajaj 1990).

El medio NLN contiene macro y micronutrientes, vitaminas y carbohidratos, siendo la sacarosa la principal fuente de carbono, que supone el 13% de la composición del medio, debido a que *Brassica napus*, es una especie cuyo polen maduro es tricelular (Dunwell and Thurling 1985) mientras que especies de polen bicelular como solanáceas, requieren niveles de sacarosa menores, 2-5% (Dunwell 2010).

Es importante señalar que en nuestro trabajo, el medio NLN se ha empleado desde el inicio del cultivo hasta el final del mismo, con la obtención de embriones maduros derivados de microsporas, de manera que este elevado porcentaje de sacarosa garantiza el aporte de carbono hasta el final del desarrollo.

El pH es otro factor importante que puede influir en el proceso de embriogénesis de microsporas (Stuart and Redenbaugh 1987). En el cultivo de microsporas de *Brassica napus* el pH del medio NLN-13, es de 6.

El aislamiento de microsporas consiste en extraer las microsporas de las anteras como paso previo a su puesta en cultivo. Se han descrito diferentes métodos para realizar el aislamiento de microsporas, como el empleo de un homogenizador o “blender” (Kott, Polsoni and Beversdorf 1988a). En esta Memoria, el método seleccionado implica la rotura mecánica de los botones florales previamente esterilizados con la ayuda de un mortero de porcelana (Coventy 1988, Prem et al. 2005), lo cual permitió un mayor control y mayor suavidad, en la disgregación de los tejidos de yemas y anteras. El homogenizado obtenido se filtra mediante una malla de 40µm, para descartar la mayor parte del tejido somático y sólo se recoge el filtrado que contiene las microsporas extraídas. La eliminación del tejido somático de las microsporas que van a iniciar el cultivo es un paso crítico, ya que su presencia afecta

de forma negativa a las microsporas en cultivo, con la liberación de componentes fenólicos y en algunos casos incluso puede inducir la formación de callos o embriones somáticos, que interfiere en la producción de plantas haploides y dobles haploides (Ferrie and Caswell 2011). Por este motivo, para asegurar la completa eliminación de restos de tejido somático, se realizan varios lavados con medio NLN preenfriado.

Además, con objeto de minimizar el estrés que supone el aislamiento para las microsporas, así como para disminuir la actividad celular de las mismas y prevenir la muerte celular antes del inicio del cultivo, todo el proceso de aislamiento se realiza a 4°C.

La densidad del cultivo celular (número de microsporas por unidad de volumen de medio de cultivo) es otro factor clave en el cultivo de microsporas aisladas. La mayoría de los protocolos descritos para la inducción de embriogénesis de microsporas de *Brassica napus* emplean una densidad celular entre 40000-80000 microsporas/ml (JBM 2003). No obstante, en esta Memoria, el ajuste de la densidad celular a 10000 microsporas/ml ha sido clave para la correcta progresión del cultivo, obteniéndose mejores rendimientos, probablemente al disminuir la competencia celular por los nutrientes del medio.

Tratamiento de estrés inductor y progresión de embriogénesis

La reprogramación de la microspora a embriogénesis, se induce a partir de un tratamiento de estrés, en ausencia del cual, las microsporas siguen su ruta de desarrollo gametofítico normal para formar granos de polen (Touraev, Vicente and HeberleBors 1997).

Los agentes inductores del proceso de embriogénesis en microsporas más empleados son el frío o calor, ayuno y tratamiento con colchicina, según la especie. No obstante, en términos generales, el estrés mediante el incremento de temperatura es el tratamiento más efectivo para la inducción del desarrollo de embriogénesis del polen

en muchas especies. La temperatura óptima y la duración del tratamiento varían según la especie (Germana 2011).

Aunque el mecanismo de cómo el estrés afecta a la reprogramación del polen no está completamente establecido, parece que un primer efecto es la alteración de la polaridad de la división en la primera mitosis haploide, lo que implica una reorganización del citoesqueleto (Nitsch and Norreel 1973, Reynolds 1997), retrasando y modificando la mitosis del polen, (se producen 2 células iguales entre sí, en vez de dos desiguales) bloqueando la acumulación de almidón o manteniendo la viabilidad de los cultivos de polen (Heberleborgs 1985).

Aunque en la actualidad, el empleo de 32°C como estrés inductor del proceso de embriogénesis para *Brassica napus* está ampliamente extendido, existen variaciones en la duración del mismo, que influyen en la eficiencia y progresión del cultivo (Chuong et al. 1988, Pechan and Keller 1988, Gland et al. 1988, Charne and Beversdorf 1988, Lichter 1982, Lichter 1989, Chen and Beversdorf 1992, Custers et al. 1994, Joosen et al. 2007, Malik et al. 2007).

En esta Memoria, se empleó como tratamiento de estrés la incubación de las microsporas a 32°C en oscuridad hasta la aparición de los primeros embriones globulares, visibles a simple vista (12-14 días, aproximadamente). En ese momento, se cambiaron las condiciones del cultivo a 25°C en oscuridad y agitación, hasta el final del desarrollo embrionario con la aparición de embriones cotiledonares maduros. Estas condiciones permitieron la obtención de un elevado número de embriones cotiledonares maduros derivados de microsporas (795 embriones/placa, aprox.) en aproximadamente 25 días desde el inicio del cultivo.

Existen trabajos en los que se describen tratamientos de estrés inductores de embriogénesis más cortos que el empleado en esta Tesis. Sin embargo, la reducción de los tiempos de incubación a 32°C, presenta una eficiencia menor en el número de embriones obtenidos por ml de cultivo (Joosen et al. 2007) por lo que la determinación del tratamiento empleado en esta Tesis, ha sido un logro en la

obtención de un alto número de embriones obtenidos frente a otros tratamientos descritos.

En conclusión, en este trabajo se han seleccionado diversas condiciones, resumidas en el siguiente cuadro, que han permitido optimizar el sistema *in vitro* para una mayor eficiencia de embriogénesis de microsporas en *Brassica napus*, que no han sido obtenidas hasta el presente con el resto de condiciones descritas.

FACTORES	CONDICIÓN SELECCIONADA
1. Condiciones de crecimiento de planta donadora.	Cámara de crecimiento controlado a baja temperatura (15°C, día/ 10°C, noche).
2. Selección de yemas florales con microsporas en la fase de desarrollo de mayor respuesta.	Yemas de 3,2-3,4mm (70% de microsporas vacuoladas viables)
3. Aislamiento de microsporas y puesta en cultivo.	Aislamiento en mortero, filtrado, lavados a 4°C. Densidad celular 10000 msp/ml
4. Tratamiento de estrés inductor (temperatura y duración).	32°C durante 10-12 días (hasta la observación de los primeros embriones globulares).

5.1. Condiciones seleccionadas en la optimización del cultivo *in vitro* para una mayor eficiencia de embriogénesis de microsporas en *Brassica napus*.

5.1.2 Desarrollo de un nuevo sistema *in vitro* de inducción a embriogénesis de microsporas a 18°C

El estrés térmico a 32°C está universalmente aceptado como inductor de la reprogramación a embriogénesis de la microspora de *Brassica napus* para dar lugar a un embrión cotiledonar maduro (Babbar SB 2004, Ferrie and Caswell 2011, Segui-Simarro et al. 2003) mientras que el tratamiento *in vitro* a 18°C durante 8 días en cultivo, se ha empleado para el estudio del desarrollo gametofítico *in vitro* a partir de

microsporas aisladas (Satpute et al. 2005, Custers et al. 1994). En estudios anteriores del grupo, se han descrito los acontecimientos celulares que tienen lugar en las microsporas durante el desarrollo gametofítico *in vivo* y en condiciones *in vitro* (Satpute et al. 2005). Sin embargo, la mayoría de los trabajos sobre el desarrollo gametofítico *in vitro* a partir de microsporas de *Brassica napus* aisladas, sólo ilustran los acontecimientos celulares hasta los 10 días de cultivo, que coincide con el desarrollo de estructuras similares al polen maduro, tal y como se observaron en este trabajo (datos no mostrados). Sin embargo, el desarrollo de microsporas aisladas incubadas a baja temperatura a largo plazo no ha sido caracterizado hasta el momento.

Nuestros resultados muestran un sistema nuevo de inducción a embriogénesis de microsporas en *Brassica napus*, mediante el empleo de bajas temperaturas (18°C) como tratamiento de estrés (Prem et al., 2011. Enviado). Estos resultados demuestran por primera vez las diferencias en la dinámica de la arquitectura celular observada bajo diferentes tratamientos térmicos de inducción. No obstante, la obtención de embriones cotiledonares maduros a partir de microsporas aisladas de botones florales procedentes de plantas donadoras crecidas en diferentes condiciones, en cultivos realizados bajo tratamientos de 18°C, durante 2 años consecutivos, indica la solidez de este nuevo sistema de inducción y progresión de embriogénesis.

Las estructuras y tiempos de desarrollo observados tanto en fases tempranas como al final del desarrollo en cultivos a 32°C, son similares a los descritos en trabajos anteriores (Kott et al. 1988a, Telmer et al. 1992, Segui-Simarro et al. 2003). Sin embargo, los eventos celulares observados durante todo el desarrollo embriogénico a 18°C, no han sido descritos anteriormente. Lo más novedoso del sistema de inducción a 18°C, es la clara aparición en los cultivos de dos rutas de desarrollo diferentes: por un lado, una ruta de desarrollo mayoritaria con estructuras tipo suspensor y por otro lado, una ruta minoritaria con estructuras sin suspensor, similar al desarrollo embriogénico convencional descrito en el sistema a 32°C, junto con algunas microsporas que no respondieron al tratamiento de estrés y siguieron una ruta de desarrollo “gametophytic-like” dirigida a la formación de polen maduro.

En base a los resultados obtenidos, en las figuras 4.1 y 4.2 se muestra un resumen esquemático de los diferentes acontecimientos celulares que definen la embriogénesis de microsporas en los dos tratamientos térmicos inductores (sistema convencional a 32°C y sistema nuevo a 18°C) en relación al tiempo del cultivo.

La ruta de desarrollo embriogénico sin suspensor observada en nuestro estudio a 18°C, se asemeja bastante a la ruta de embriogénesis publicada en trabajos de inducción de embriogénesis de microsporas mediante tratamientos de estrés a 32°C, aunque tiene lugar en una menor frecuencia a 18°C. La ruta de desarrollo embriogénico predominante encontrada bajo tratamientos de estrés a 18°C, implica el establecimiento de una polaridad temprana y la formación de estructuras con suspensor. Una característica interesante encontrada en las microsporas que siguen la ruta de desarrollo embriogénico con estructuras con suspensor, es la formación de una gruesa pared celular bajo la exina, observada durante las primeras etapas en las microsporas embriogénicas con gran tamaño y con la exina rota, antes de la primera división.

Se ha descrito que durante la embriogénesis cigótica en *Brassica napus*, la polaridad del embrión en desarrollo se establece en la primera división celular y el suspensor se desarrolla desde las primeras etapas (Yeung, Rahman and Thorpe 1996, Ilic-Grubor, Attree and Fowke 1998, V 2001)(Raghavan 2001. Varios trabajos han resaltado la similitud entre la embriogénesis derivada de microsporas y la embriogénesis cigótica durante las últimas fases del desarrollo, concretamente a partir del embrión globular en adelante (Yeung et al. 1996, Barany et al. 2005, Bueno et al. 2003).

En el nuevo sistema que aquí se describe, la similitud más notable entre la embriogénesis cigótica y la embriogénesis derivada de microsporas, es el desarrollo de estructuras celulares similares al suspensor en embriones derivados de microsporas.

La aparición de estas estructuras celulares similares al suspensor en embriones derivados de microsporas en el sistema de inducción a 32°C, es esporádica e

impredecible; trabajos previos sólo describieron su presencia en etapas tardías como embriones globulares y corazón derivados de microsporas (Yeung et al. 1996, Ilic-Grubor et al. 1998) sin identificar su posible origen. Se ha propuesto que las células tipo suspensor en cultivos de microsporas inducidos a 32°C, se desarrollan a partir de las células hipofisarias del embrión globular (Hause et al. 1994). Recientemente, (Joosen et al. 2007) han descrito un método de cultivos de microsporas a partir de un tratamiento inductor a 32°C durante 24h, en el que el desarrollo embriogénico a partir de microsporas se asemeja mucho a la embriogénesis cigótica. Posteriormente, (Supena et al. 2008) ha documentado en detalle esta ruta similar a la del embrión cigótico, con la aparición de estructuras tipo suspensor.

Los resultados de nuestro estudio, revelan que en el sistema de inducción de 18°C hay una predominancia del desarrollo de estructuras con suspensor. En esta ruta de desarrollo, las primeras divisiones de las microsporas dan lugar a estructuras alargadas en las que la parte distal genera el embrión globular, mientras que la parte inferior da lugar al suspensor, estableciendo una polaridad temprana en el desarrollo de embriones derivados de microsporas y mimetizando las primeras etapas de la embriogénesis cigótica.

La razón por la que las microsporas bajo las mismas condiciones externas *in vitro*, muestran diferentes comportamientos continúa siendo un misterio; diferencias en la etapa inicial de desarrollo y el estado metabólico de las microsporas podría afectar a la recepción de señales para la especificación de identidades asimétricas y el destino celular del suspensor en algunas microsporas, como ocurre en la embriogénesis cigótica (Petricka, Van Norman and Benfey 2009). En etapas tardías del desarrollo, nuestros resultados muestran similitudes morfológicas entre los embriones derivados de microsporas obtenidos a partir de 2 tratamientos inductores diferentes (32°C y 18°C), ya que en ninguno de los dos sistemas *in vitro* aparece el suspensor, asociando su papel con las primeras etapas del desarrollo.

Las diferencias en el estado metabólico y la etapa concreta del desarrollo gametofítico de la población inicial de microsporas podrían explicar los diferentes comportamientos que se observan bajo las mismas condiciones *in vitro* a 18°C.

Este nuevo sistema *in vitro* representa una ventaja para el estudio de mecanismos de ambas rutas de desarrollo embriogénicos, ya que permite el estudio comparativo de diferentes dinámicas celulares empleando las mismas condiciones de inducción. Estos estudios podrían contribuir a aclarar los mecanismos moleculares que subyacen en el proceso de la reprogramación de microsporas a embriogénesis, así como el establecimiento de un posible patrón de desarrollo en embriones.

5.1.3 Mejoras en la eficiencia de germinación de embriones de polen y regeneración de plantas haploides/doble haploides

Este trabajo ofrece dos aspectos novedosos en la regeneración de embriones derivados de microsporas. Por un lado, el desarrollo de un sistema nuevo de gran eficiencia en la germinación de embriones y su conversión a plantas adultas, así como también supone la producción de gran número de embriones de gran similitud fisiológica mediante dos protocolos de cultivo diferentes.

La desecación controlada al aire junto con estrés a bajas temperaturas, son técnicas descritas para incrementar la frecuencia de germinación de embriones en *Brassica napus* (Kott and Beversdorf 1990, Anandarajah et al. 1991, Zhang et al. 2006). El tratamiento de frío de los embriones incrementa la frecuencia de germinación de embriones derivados de microsporas hasta un 90% (Zhang et al. 2006), sin embargo, la frecuencia del desarrollo de plántulas permanece alrededor del 50-80% (Zhou, Tang and Hagberg 2002, Gu, Hagberg and Zhou 2004).

Se ha documentado que la desecación de embriones derivados de microsporas con o sin pre-tratamiento con ácido abscísico (ABA; 50 µM) incrementa la frecuencia de conversión en *Brassica napus* (Kott and Beversdorf 1990, Senaratna et al. 1991). La desecación de los embriones tiene un papel fundamental en la regulación de los

niveles endógenos de ABA, que afectan a los procesos de maduración y conversión (Kermode 1990).

En este estudio, se ha empleado una combinación de desecación por aire seguido de la incubación de los embriones derivados de microsporas a 18°C en oscuridad, lo que dio lugar a una germinación superior al 90%; según nuestro conocimiento, este tratamiento de germinación de embriones derivados de microsporas no se ha descrito anteriormente en el sistema de doble haploides de *Brassica napus*. Además, la eficiencia del trasplante y crecimiento de estas plántulas fue superior al 95%, para plantas haploides y doble haploides (Prem et al., 2011. Enviado).

Estos resultados demuestran la similitud fisiológica entre los embriones producidos por ambos sistemas de inducción (32°C y 18°C). Los estudios dirigidos al desarrollo de protocolos altetRNAivos para la reprogramación de microsporas a embriogénesis, sólo destacan las similitudes morfológicas entre la embriogénesis de microsporas y la embriogénesis cigótica, sin embargo, no detallan la equivalencia fisiológica en términos de germinación y producción de plantas.

En conclusión, los resultados obtenidos presentan una metodología novedosa para la inducción eficiente de la embriogénesis de microsporas en *Brassica napus* a 18°C. En el nuevo sistema *in vitro* aquí presentado, las microsporas siguen de forma predominante una ruta de desarrollo con estructuras de tipo suspensor y un desarrollo similar al que se observa en la embriogénesis cigótica. Además, también se demuestra la alta eficiencia conseguida en la conversión de embriones derivados de microsporas hasta la producción de plantas adultas, a partir de un tratamiento inductor diferente.

Estos datos abren nuevas perspectivas a la comprensión de la reprogramación celular y procesos de diferenciación, en cuanto a las similitudes y analogías observadas entre la embriogénesis cigótica y la embriogénesis de microsporas en el sistema modelo de *Brassica napus*.

5.2 OTRAS RESPUESTAS CELULARES AL ESTRÉS INDUCTOR DE EMBRIOGÉNESIS EN EL CULTIVO DE MICROSPORAS: MUERTE CELULAR PROGRAMADA

La microspora, bajo condiciones de cultivo *in vitro* y mediante determinados tratamientos de estrés, puede cambiar su programa de desarrollo hacia una ruta de desarrollo embriogénico con la formación de embriones que darán lugar a plantas haploides o doble haploides (Chupeau 1998). Después del tratamiento de estrés *in vitro*, algunas microsporas responden a la inducción y cambian su ruta de desarrollo a embriogénesis, mientras que otras no son sensibles a la inducción y siguen rutas de desarrollo diferentes, todavía poco conocidas. Por ello, sabiendo que el descenso en la viabilidad de las microsporas en cultivo constituye una de las causas más importantes que afecta al rendimiento del cultivo de microsporas, en esta Tesis se evaluaron los niveles de muerte celular durante las primeras etapas del cultivo de microsporas de *Brassica napus*, por tratarse de las más susceptibles, analizándose además la posible implicación de procesos de muerte celular programada (MCP) durante el mismo.

4.1.1 Las primeras etapas del cultivo *in vitro* de microsporas muestran altos niveles de muerte celular tras el tratamiento de estrés

En comparación con otras especies, *Brassica napus* está considerada como modelo para la inducción de embriogénesis de microsporas por la eficacia de reprogramación de sus microsporas hacia una ruta embriogénica en respuesta al tratamiento de estrés. No obstante, se ha determinado que sólo un pequeño porcentaje de las microsporas que se ponen en cultivo, son capaces de producir embriones maduros, aunque este porcentaje, dado el elevado número de microsporas del que se disponen para los cultivos, supone la producción de una media de 795 embriones por cada placa Petri de cultivo.

El estudio realizado en este trabajo revela los elevados niveles de muerte celular que acompañan las primeras etapas del proceso de cultivo de microsporas en esta especie, hecho que compromete significativamente el rendimiento de la progresión del mismo y en la obtención de embriones.

La citoquímica con “Azul de Evans”, marcador de células muertas, muestra un incremento progresivo en el número de éstas con el desarrollo del cultivo *in vitro*, siendo el aislamiento de las microsporas para su puesta en cultivo y el tratamiento de estrés, las etapas donde se produce un mayor índice de muerte celular (Fig. 4.91).

En el desarrollo *in vivo* las microsporas se encuentran rodeadas de tejidos somáticos de la antera dentro de las yemas florales, que protegen a las microsporas de agresiones externas, pero también dificultan el proceso de extracción. Por este motivo el aislamiento de microsporas de las yemas florales constituye uno de los pasos críticos en el cultivo de microsporas, ya que una extracción poco eficaz, disminuye el número de microsporas puestas en cultivo y por lo tanto, el número de embriones obtenidos. Por ello, los procesos de aislamiento de microsporas de las yemas florales son procedimientos agresivos encaminados a la obtención de altos rendimientos en la extracción de microsporas. En nuestro caso, la extracción de microsporas de la antera se llevó a cabo mediante la rotura mecánica de los botones florales en un mortero de porcelana con medio NLN-13. Con objeto de disminuir la muerte celular durante la extracción, todo el proceso se llevó a cabo a 4°C, empleando material previamente preenfriado. Sin embargo, los datos obtenidos en el estudio con “Azul de Evans”, mostraron un nivel de muerte celular del 35% de las microsporas después del aislamiento y antes de su puesta en cultivo. Este hecho compromete de forma importante la evolución y eficacia posterior del mismo, ya que las microsporas que mueren durante el aislamiento y los lavados previos a la puesta en cultivo, acompañan en el proceso a las microsporas viables afectando al programa de desarrollo de las mismas.

Cultivos de microsporas de otras especies como cebada incluyen un paso previo para separar las microsporas del resto de células y tejidos procedentes de las espigas, mediante el empleo de un gradiente de sacarosa (Rodríguez-Serrano et al., 2011,

J.Exp.Bot.In press) Este procedimiento, aunque también separa muchas células muertas, no elimina una importante fracción de microsporas que mueren antes de su puesta en cultivo, habiéndose determinado un 32% de muerte celular tras el aislamiento en cultivos de microsporas de cebada (Rodríguez-Serrano et al., 2011, J.Exp.Bot.In press).

Los resultados obtenidos tras los primeros 4 días de cultivo indican que las microsporas en esta etapa son más susceptibles de sufrir muerte celular que en etapas posteriores. Trabajos previos de nuestro grupo, indicaron diferentes rutas de desarrollo que pueden seguir las microsporas de *Brassica napus* en respuesta al estrés inductor (Satpute et al., 2005).

Numerosos trabajos han analizado diferentes aspectos del desarrollo embriogénico *in vitro* de microsporas inducido por estrés (Cordewener et al. 1995, Yeung et al. 1996, Seguí-Simarro 2001, Seguí-Simarro et al. 2003, Seguí-Simarro et al. 2005), sin embargo, los programas de desarrollo seguidos por las microsporas que no responden al tratamiento inductor no han sido estudiados en profundidad, por lo que hay pocos datos disponibles (Satpute et al. 2005)

Se ha observado que algunas microsporas bloquean su desarrollo y/o mueren inmediatamente, mientras que otras pueden seguir un desarrollo similar al gametofítico (“gametophytic-like”) sufriendo una división asimétrica del núcleo hasta alcanzar una etapa con analogías al polen maduro a los 4-5 días del cultivo, momento en el que se para su desarrollo y mueren (Satpute et al. 2005, Hosp et al. 2007). Otras microsporas son efectivamente inducidas y cambian su programa de desarrollo hacia una ruta embriogénica con una serie de divisiones simétricas para la formación de estructuras multicelulares todavía rodeadas de la exina o proembriones jóvenes. Esto significa que las primeras etapas del cultivo de microsporas, se caracterizan por una población muy heterogénea.

Trabajos recientes indican que los niveles de tolerancia a estrés, juegan un papel importante en la embriogénesis y podrían ser considerados como un factor que afecta a la eficiencia final del proceso (Zur et al. 2009).

Los primeros días a 32°C suponen una etapa fundamental en la que la microspora se debate entre dos procesos de desarrollo diferentes. El choque térmico a 32°C y el cultivo en medio líquido, desprotegidas de la antera, sitúan a las microsporas en condiciones de elevado estrés, lo que puede conducir a muerte celular. Las consecuencias del aislamiento y el estrés en las microsporas dependen de múltiples factores, aún poco conocidos. Parte de las microsporas que son sometidas al estrés inductor se reprograman a embriogénesis, mientras que otras no consiguen equilibrar el daño producido por el tratamiento e inician un programa de muerte celular. Según nuestros resultados, a los 8 días de cultivo, sólo un 35% de las microsporas que iniciaron el cultivo están vivas y por lo tanto, serán las que puedan dar lugar a un embrión maduro.

El conocimiento de las rutas no embriogénicas que suceden en el cultivo y su dinámica temporal, ayudaría a diseñar estrategias con posibles bloqueante de esas rutas en etapas definidas que hicieran disminuir los niveles de muerte celular en el cultivo, incrementando el número de microsporas vivas y por lo tanto, capaces de originar embriones haploides. Los datos obtenidos en esta Tesis aportan información nueva sobre las respuestas no embriogénicas de la microspora en cultivo.

5.2.1 La muerte celular en las primeras etapas del cultivo de microsporas presenta actividad tipo caspasa.

Se han descrito diferentes tipos de estrés para la inducción de embriogénesis de microsporas, en función de la especie vegetal. Así, en *Brassica napus*, especie empleada en este trabajo, el estrés inductor consistió en una incubación a 32°C hasta la aparición de los primeros embriones globulares.

Según los altos niveles de muerte celular detectados durante las primeras etapas del desarrollo del cultivo en nuestro estudio con Azul de Evans, se analizó la posible implicación de procesos de muerte celular programada (MCP) mediante la

determinación de la localización y actividad de la enzima caspasa 3, una de las enzimas efectoras implicada en procesos de MCP.

La MCP se ha descrito durante la progresión de varios procesos de desarrollo *in vitro* como la embriogénesis somática (Petruzza et al. 2009) y la transición de embrión globular a embrión torpedo en la embriogénesis del polen en cebada (Maraschin et al. 2005). Sin embargo, no hay estudios sobre los fenómenos de MCP durante las primeras etapas de cultivos de microsporas en relación al tratamiento de estrés, a excepción de un reciente trabajo de nuestro grupo en cebada cebada (Rodríguez-Serrano et al., 2011, J.Exp.Bot.In press).

Trabajos recientes describen fenómenos de apoptosis inducida mediante estrés bióticos o abióticos como infección de patógenos o stress por calor, especialmente en cultivos *in vitro* de células en suspensión (Reape and McCabe 2010).

En esta Tesis se ha identificado por primera vez la participación de enzimas con actividad tipo caspasa 3 en las primeras etapas del cultivo de microsporas de *Brassica napus*.

Tras confirmar la especificidad del anticuerpo frente a la forma activa de caspasa 3 en el material de estudio mediante “Western Blot” (Fig.4.97) se llevó a cabo la monitorización de la localización de caspasa 3 mediante inmunofluorescencia, durante las primeras etapas del cultivo de microsporas.

Los resultados obtenidos indican que tras el aislamiento no hay presencia de caspasa 3 en el citoplasma de las microsporas en cultivo. A los 4 días del tratamiento inductor, ya se puede observar algunas estructuras multicelulares embriogénicas frente a otras microsporas que no han dividido. En esta población heterogénea, se observa que las microsporas que no han respondido al estrés inductor presentan una señal citoplásmica fluorescente indicativa de la presencia de caspasa 3 activa (Fig.4.98 y 4.99) mientras que aquellas que se han reprogramado hacia la ruta embriogénica, no presentan señal fluorescente indicando la ausencia de la forma activa de esta enzima en este tipo de estructuras.

El análisis en detalle del transcriptoma y proteoma de microsporas inducidas y proembriones derivados de microsporas de Brassica, demuestra la ausencia de expresión de proteínas relacionadas con MCP en estas estructuras (Joosen et al. 2007, Malik et al. 2007). Según (Maraschin et al. 2006), la inducción a embriogénesis mediante estrés está marcado por la regulación de transcritos implicados en varias rutas metabólicas incluyendo la inhibición de MCP, señalando que dicha regulación es específica para microsporas embriogénicas y no ocurre en el desarrollo de granos de polen de forma natural.

Nuestros datos indican que las estructuras embriogénicas no muestran presencia citoplásmica de caspasa 3 frente a aquellas otras que no responden al estrés inductor, lo cual apoya la idea de que el inicio de la embriogénesis implica la inhibición del programa de MCP. (Varnier, Jacquard and Clement 2009) señala la gran importancia de que el tratamiento inductor detenga el programa de MCP en la microspora para evitar que éste dificulte la eficiencia de la respuesta embriogénica de las microsporas.

Las caspasas son las enzimas ejecutoras del proceso de apoptosis en células animales. Sin embargo, en el genoma de plantas no se ha encontrado hasta el momento secuencias homólogas de caspasas, pero se han observado varias proteínas con actividad tipo caspasa, llamadas metacaspasas (Uren et al. 2000), las cuales no son inhibidas por inhibidores de caspasa (Bonneau et al. 2008) lo que sugiere la existencia de otras enzimas con actividad tipo caspasa en plantas. Sin embargo, estudios recientes han demostrado la implicación de metacaspasas durante la embriogénesis del abeto noruego y en procesos de MCP inducida en Arabidopsis (Reape and McCabe 2010).

El ensayo de actividad enzimática caspasa 3 llevado a cabo en nuestro estudio, proporcionó los niveles de actividad caspasa 3 más elevados a los 4 días del inicio del cultivo, sugiriendo que las microsporas que no responden al estrés inductor de embriogénesis, inician rutas que cursan con procesos de MCP dependiente de actividad tipo caspasa. La drástica disminución de esta actividad enzimática a los 8

días de cultivo, indica que la actividad "caspasa 3-like" ha terminado, apoyando la idea de que la actuación puntual de la enzima caspasa 3 en los procesos de MCP no es prolongada, como ya se indicó en el apartado sobre MCP del tapetum en esta Memoria. Asimismo, el empleo de inhibidores específicos de caspasa 3, provocó la inhibición de la actividad tipo caspasa 3 detectada en el ensayo, demostrando la especificidad del mismo.

En resumen, nuestros resultados revelan la existencia de una proteína con "actividad caspasa 3-like", que es reconocida por el anticuerpo "anti-cleaved caspasa 3" y cuya actividad es inhibida mediante el empleo de inhibidores específicos de caspasa 3.

Estos datos sugieren que la muerte celular detectada mediante la tinción con "Azul de Evans", podría deberse, a procesos de MCP dependientes de caspasa, desencadenados por el tratamiento de estrés inductor de embriogénesis.

La identificación de marcadores de procesos de MCP como enzimas caspasas, durante las primeras etapas del desarrollo del cultivo, aporta un mayor conocimiento de las rutas que siguen las microsporas que no son inducidas, proporcionando posibles vías de controlar este tipo de muerte mediante el empleo de inhibidores de MCP e incrementar la viabilidad de las microsporas en cultivo. No obstante, serán necesarios nuevos estudios que incluyan otros marcadores de MCP que ayuden a comprender los mecanismos que subyacen a la respuesta celular al tratamiento de estrés inductor de embriogénesis.

5.3 MARCADORES TEMPRANOS DE EMBRIOGÉNESIS DE POLEN

Durante la inducción a embriogénesis, se producen en la microspora una serie de cambios a distintos niveles, que generan varias respuestas celulares. En un mismo cultivo, células sometidas a idénticas condiciones, responden a la inducción, reprogramando su expresión génica hacia embriogénesis y junto a ellas, hay otras que no responden. La determinación de marcadores que ayuden a identificar las microsporas reprogramadas a embriogénesis del resto, es un objetivo de gran interés para evaluar la eficacia de la inducción.

La búsqueda de marcadores moleculares y celulares durante la inducción y primeras etapas del proceso de embriogénesis constituye un importante objetivo para la identificación temprana de células reprogramadas a embriogénesis, frente a aquellas que no responden al estrés inductor. Asimismo, también son importantes herramientas para la identificación de los procesos metabólicos implicados en la inducción y su monitorización.

En esta Tesis, se han caracterizado una serie de marcadores celulares del proceso, en dos especies de interés económico características muy diferentes, *Olea europaea*, especie leñosa de elevado interés por su calidad oleaginosa, difícil de mejorar y transformar y *Brassica napus*, herbácea de interés hortícola, considerada especie modelo para estudios de embriogénesis de polen.

5.3.1 Marcadores celulares que diferencian las rutas de desarrollo gametofítico y embriogénico del polen

Se han descrito una serie de cambios en las actividades celulares y organización estructural de los compartimentos subcelulares, que acompañan al proceso de reprogramación del polen en algunas herbáceas y leñosas (Barany et al. 2005, Seguí-Simarro et al. 2006, Solís et al. 2008). Estos datos, aportan información sobre los

cambios fisiológicos implicados en el proceso de la reprogramación y la identificación de marcadores de competencia embriogénica.

Brassica napus y *Olea europaea* son ejemplos representativos de una especie modelo, fácilmente inducible y una especie recalcitrante, en términos de su respuesta a tratamientos de estrés inductores de embriogénesis.

La elección del olivo para este estudio se debe al gran interés que supone la embriogénesis de microsporas como método rápido de obtención de haploides.

El desarrollo de un método adecuado para la inducción mediante tratamientos de estrés de microsporas aisladas en diferentes variedades de olivo (Bueno et al. 2005, Solís et al. 2008), supone un gran avance metodológico y un paso crucial para la producción de plantas haploides a partir de estructuras derivadas de embriogénesis de polen. En este trabajo, como un primer paso, se ha determinado la fase óptima de la microspora para la inducción a embriogénesis, así como también se han obtenido proembriones multicelulares a partir de microsporas de olivo. Estos resultados, en una especie recalcitrante como el olivo, representa un avance sustancial hacia la producción de embriones haploides en esta especie.

Las estructuras multicelulares obtenidas a partir de microsporas de olivo representan el primer paso hacia la producción de embriones haploides en esta especie.

En los sistemas del olivo y colza, se han caracterizado además, marcadores celulares de etapas tempranas de la embriogénesis.

El estudio comparativo realizado en esta Tesis Doctoral, entre los cambios celulares específicos que acompañan al desarrollo gametofítico *in vivo* de la microspora y aquellos observados en las células reprogramadas a embriogénesis, desarrollado en paralelo en los dos sistemas vegetales mencionados, ha permitido la identificación de una serie de marcadores de las primeras etapas del proceso de embriogénesis en relación a procesos de proliferación y diferenciación, comunes en ambas especies, lo cual indicaría mecanismos similares, que subyacen al proceso de inducción a embriogénesis de ambas especies.

La presencia de células con tamaño y arquitectura celular similar, núcleos con una organización estructural idéntica, engrosamiento de la pared localizada debajo de la exina, ausencia de depósitos de almidón en el citoplasma y presencia de paredes internas que tabican el citoplasma, son algunos de los marcadores de embriogénesis identificados.

5.3.1.1 Marcadores del desarrollo gametofítico

Tamaño y arquitectura celular diferente.

La división asimétrica de la microspora para dar lugar al polen bicelular, constituye un punto clave en el proceso de diferenciación del polen (Twell, Park and Lalanne 1998). Tras este tipo de división, se forman dos células muy diferentes entre sí, la célula vegetativa y la célula generativa, confinadas en la pared original de la microspora. Nuestros resultados muestran la diferente estructura, tamaño y organización que presentan ambos tipos celulares, en las dos especies de estudio, colza y olivo, siendo la división asimétrica uno de los sucesos que determina este diferente patrón de desarrollo.

La célula vegetativa ocupa la mayor parte del volumen del grano de polen, mientras que la generativa es más pequeña y está incluida en el citoplasma de la anterior. El citoplasma vegetativo es rico en todo tipo de orgánulos que van aumentando en número durante la maduración del grano de polen, al tiempo que se reabsorbe la vacuola que ocupaba gran parte de ese citoplasma (Martin, Risueño and Sogo 1970, Sanger and Jackson 1971). Así, los resultados obtenidos en la inmunofluorescencia con anti-RNA indicaron una abundante población ribosómica en el citoplasma de la célula vegetativa. Esta organización estructural específica responde a la característica actividad metabólica del polen durante su proceso de maduración que incluye una elevada actividad biosintética y de almacenamiento proteico y energético

En cambio, la célula generativa presenta una fina capa de citoplasma con pocas mitocondrias, ribosomas, retículo endoplásmico disperso y dictiosomas (Burgess 1970, Sanger and Jackson 1971).

En la etapa de polen bicelular, se observa que la nueva pared resultante de la división, envuelve a la célula generativa, debido a que en la división asimétrica ocurre la formación de una placa celular curvada, que es mediada por un sistema de microtúbulos que se extienden desde el núcleo de la futura célula generativa (Vanlammeren et al. 1985, Vanaelst and Vanwent 1992, Terasaka and Niitsu 1990).

En etapas sucesivas del proceso de maduración del polen, la célula generativa migra desde su posición inicial periférica, en contacto con la pared del polen, hacia el interior del grano de polen. Este proceso está acompañado de un cambio en la forma de la célula generativa que en la fase de madurez adopta un perfil fusiforme (Martin, Risueño and Sogo 1970).

Estas diferencias, son el resultado de una estricta regulación génica (Mascarenhas 1992)(McCormick *et al.*, 1991;Mascarenhas, 1992) dirigida a la diferenciación del grano de polen.

La diferente morfología y organización estructural que presentan la célula vegetativa y generativa, determinan un marcador diferencial de la ruta de desarrollo gametofítico en diferentes especies vegetales.

Diferente posición y organización estructural del núcleo.

El programa gametofítico dirige la formación de un núcleo vegetativo y otro generativo de características muy diferentes, en términos de tamaño, forma, grado de condensación cromatínica y actividad transcripcional.

La caracterización citoquímica llevada a cabo en nuestro trabajo en el polen bicelular de colza y olivo, mostraron claramente esta diferente organización estructural de los núcleos.

El núcleo de la microspora vacuolada se mantiene en una posición periférica hasta que comienza la división (Bedinger 1992, Sylvester 2000). Después de la división, el núcleo generativo se localiza en la periferia de la célula, en contacto con la pared del polen, la exina, mientras que el núcleo vegetativo se localiza en el centro de la célula.

En estadios más avanzados del proceso de maduración, la célula generativa migra al centro del grano de polen hasta situarse próximo al núcleo de la célula vegetativa.

Nuestros resultados mostraron que el núcleo de la célula generativa del polen bicelular es de pequeño tamaño y presenta una cromatina muy condensada, relacionada con muy baja o ninguna actividad transcripcional (Martin et al. 1970, McCormick 1993, Testillano et al. 1995). Existen datos de la presencia de histonas especiales exclusivas del núcleo generativo (gH2B y gH3), que pueden ser responsables de la gran condensación de la cromatina de dichos núcleos (Ueda and Tanaka 1995).

Por otra parte el núcleo vegetativo, de mayor tamaño, presenta una cromatina muy descondensada, con un nucleolo muy prominente, asociado a su alta actividad transcripcional durante la maduración del polen (Martin et al. 1970, McCormick 1993, Testillano et al. 1995).

Esta variación en el patrón de condensación de la cromatina refleja diferentes estados de actividad de ambas células, relacionados con sus diferentes funciones durante la maduración y germinación del polen. La célula vegetativa presenta una elevada actividad biosintética de la maquinaria de formación del tubo polínico (Mascarenhas 1975)(Risueño, 1990;Mascarenhas, 1975;Testillano and Risueño, 1998), mientras que la célula generativa está inactiva, en espera de la segunda mitosis del polen que origina las dos células espermáticas o gametos.

De manera que la división asimétrica de los núcleos constituye un buen marcador del desarrollo gametofítico del polen en las dos especies de estudio.

Presencia de almidón

Los resultados obtenidos en la citoquímica de almidón, indicaron una progresiva acumulación de depósitos de almidón durante el desarrollo gametofítico de colza y olivo, cuyo número y tamaño se ve aumentado con la maduración de los granos de polen.

El almidón constituye junto con las gotas lipídicas una de las reservas energéticas más universales entre las células vegetales. Los granos de polen, durante etapas concretas de su diferenciación y dependiendo de la especie, almacenan importantes cantidades de almidón y lípidos (Coronado 2002).

El desarrollo de plastidios y acumulación de almidón constituye una característica diferencial durante la formación del polen en muchas especies (Franchi et al. 1996). En algunas especies, las reservas de carbohidratos del polen maduro no son en forma de gránulos de almidón, sino en forma de polisacáridos citoplásmicos, especialmente, sacarosa (Franchi et al. 1996, Pacini 1996).

Nuestros resultados indicaron que la acumulación de almidón acompaña la progresión del desarrollo gametofítico, dando lugar a la formación de un polen bicelular con alto contenido en almidón.

En base a esto, la presencia de depósitos de almidón constituye un buen marcador del desarrollo gametofítico en las dos especies de estudio.

5.3.1.2 Marcadores de embriogénesis

Tras el estrés inductor de embriogénesis, las microsporas reprogramadas bloquean el programa de diferenciación del polen e inician un proceso de proliferación que viene dado por una serie de características que difieren de las señales propias de la división asimétrica que ocurre en el desarrollo gametofítico.

Tamaño y arquitectura celular similar

A diferencia de lo que ocurre en el desarrollo gametofítico, la microspora reprogramada a embriogénesis sufre una división simétrica que da lugar a dos células hijas de tamaño y organización estructural idéntica.

Nuestros resultados mostraron que la organización estructural cambia inmediatamente tras la reprogramación de la ruta embriogénica. Así, las células embriogénicas presentan citoplasmas menos densos, con un menor número de

orgánulos, pero abundante población ribosómica, característico de una elevada actividad transcripcional, propio de células proliferantes. Además, estas células presentaron pequeñas vacuolas dispersas por todo el citoplasma.

Esta organización es típica de células en proliferación con un ciclo celular corto en el que la mayor parte de la actividad metabólica se dirige a la duplicación de orgánulos y biosíntesis de la maquinaria de división (Testillano et al. 1994a, Testillano et al. 1993)(Testillano *et al.*, 1993a; Testillano *et al.*, 1994a).

El tamaño y organización estructural similar es un marcador del proceso de inducción a embriogénesis, que permitirá diferenciar entre microsporas que reprogramaron su ruta y las que no.

Núcleos con organización estructural idéntica

Nuestros resultados revelaron que las microsporas reprogramadas a embriogénesis en las dos especies de estudio, sufren una primera división simétrica con el resultado de dos núcleos con una organización estructural idéntica.

Esta división simétrica de la microspora es la primera evidencia morfológica de la ruta embriogénica, opuesto a lo que ocurre durante la primera mitosis del desarrollo gametofítico (Zaki and Dickinson 1991). No obstante, la observación en nuestro trabajo de proembriones derivados de microsporas de olivo con varios núcleos idénticos entre sí, es indicativo además, de la correcta evolución de la ruta embriogénica de las microsporas reprogramadas. Este dato en una especie como el olivo, representa el primer paso hacia la producción de embriones haploides en esta especie.

En etapas muy tempranas del desarrollo embriogénico, en la microspora vacuolada inducida a embriogénesis, el núcleo comienza a prepararse para la división celular y se desplaza hacia una posición central y el citoplasma sufre una reorganización estructural (Touraev et al. 1996a, Touraev et al. 1996b, Zaki and Dickinson 1990)(Rodríguez and Risueño, 1978; Touraev *et al.*, 1996a; Touraev *et al.*, 1996b; Zaki and Dickinson, 1990). Tras la reorganización del citoesqueleto la microspora sufre la

división simétrica, característica específica de células activadas mitóticamente (Dubois et al. 1991, Kranz, Vonwiegen and Lorz 1995).

Como consecuencia, la organización estructural de los núcleos en las primeras divisiones embriogénicas, se caracteriza por la posición central de los núcleos en las células hijas, con un tamaño y patrón de cromatina idénticos entre sí. Se trata de un patrón de cromatina descondensado con escasas masas de cromatina condensada, similar al encontrado en células proliferantes y en la fase de desarrollo de microspora vacuolada, pero muy diferente del observado en el núcleo vegetativo y generativo del grano de polen bicelular detectada en núcleos en interfase de células en ciclo de división (González-Melendi *et al.*, 1998).

La presencia de patrones de cromatina idénticos entre las diferentes células que componen los proembriones derivados de microsporas, sugiere que todas ellas se encuentran en una fase proliferativa análoga, que constituiría la etapa inicial de la embriogénesis.

Por otro lado, la elevada población ribosomal en el citoplasma de proembriones derivados de microsporas, tal y como revela la inmunofluorescencia con anti-RNA, constituye un dato adicional de la elevada actividad metabólica de estas células en proliferación (Mena et al. 1994).

El desarrollo embriogénico genera por lo tanto una organización cromatínica característica y notablemente distinta a la que presentan aquellos granos de polen que no son reprogramados a embriogénesis, por lo que constituye un marcador muy útil de las microsporas que han cambiado su programa de desarrollo a embriogénesis.

Ausencia de depósitos de almidón.

Los resultados obtenidos en ambas especies indicaron la ausencia de depósitos de almidón en el citoplasma de las estructuras multicelulares o proembriones derivados de microsporas. Sin embargo, aquellas otras microsporas que no respondieron al tratamiento inductor, presentaron un alto contenido en almidón en sus citoplasmas.

(Telmer, Newcomb and Simmonds 1995, Touraev et al. 1996c) ya indicaron la ausencia de almidón en células embriogénicas de *Brassica napus* y *Nicotiana tabacum*, respectivamente.

Esta ausencia de depósitos de almidón en la primeras estructuras multicelulares, se debe a que con la reprogramación a embriogénesis *in vitro*, la microspora abandona el proceso de desarrollo gametofítico normal, bloqueando este programa y con ello, la acumulación de gránulos de almidón.

Asimismo, trabajos previos del grupo realizados en *Brassica napus*, indicaron que las microsporas no inducidas con gran acumulación de almidón en su citoplasma, de manera análoga al polen maduro desarrollado *in vivo*, siguen una ruta denominada “gametophytic like” (Satpute et al. 2005). La identificación de un comportamiento similar en olivo, supone un dato muy interesante en el avance del conocimiento del sistema de inducción de embriogénesis en esta especie, ya que permitirá diferenciar fácilmente las microsporas reprogramadas de las que no.

Recientemente se ha identificado el papel del almidón en el destino celular del polen en microsporas de pimiento (Barany et al. 2010a) y de cebada (Maraschin et al. 2006) inducidas a embriogénesis, donde los genes implicados en la biosíntesis y acumulación de almidón están reprimidos, mientras que aquellos genes implicados en la rotura de almidón y sacarosa están inducidos (Maraschin et al. 2006).

Por lo tanto, la ausencia de depósitos de almidón en el citoplasma de las microsporas reprogramadas constituye un marcador temprano óptimo del proceso de embriogénesis en ambas especies.

Presencia de pared engrosada entre la exina y el citoplasma.

Las microsporas reprogramadas a embriogénesis presentan una pared engrosada entre la exina y el citoplasma. Esta característica se observó en las dos especies empleadas en el estudio, olivo y colza.

Trabajos anteriores han propuesto la presencia de estas paredes gruesas en fases determinadas del desarrollo de la embriogénesis de microsporas, embriogénesis

somática y organogénesis como marcadores moleculares de estos procesos (González-Melendi et al. 1995, Fortes et al. 2002, Ramirez et al. 2004, Ramirez et al. 2003, Barany et al. 2005). Asimismo, se ha sugerido que esta capa engrosada presenta la finalidad de crear un ambiente adecuado para favorecer la progresión de la ruta embriogénica (Fortes et al. 2002).

Este engrosamiento de la pared en las microsporas que reprograman su ruta a embriogénesis tras el tratamiento inductor, se detectó mediante la tinción con Calcofluor White, método citoquímico preferencial para componentes celulósicos (Galbraith 1981), indicado para evaluar cultivos embriogénicos de microsporas mediante citometría de flujo (Schulze and Pauls 2002). Nuestros resultados sugieren que tras la inducción a embriogénesis, se produjo un cambio en la estructura, organización y/o la cantidad de los componentes celulósicos de estas paredes celulares localizadas debajo de la exina, de tal manera que aumentan su grosor y adquieren una diferente reactividad frente a la tinción con Calcofluor, respecto a aquellas otras células no inducidas.

Durante los procesos de desarrollo, la estructura y los componentes de la pared celular cambian (Catoire et al. 1998, Willats et al. 2001a, Somerville et al. 2004); así, se han encontrado algunos marcadores moleculares de embriogénesis somática y organogénesis en paredes celulares (Fortes et al. 2002, Fry et al. 1993).

Por otro lado, también se han descrito diferencias en la presencia y abundancia de varios componentes de la pared celular durante los procesos de diferenciación y embriogénesis en algunas herbáceas y leñosas (Ramirez et al. 2003, Ramirez et al. 2004, Barany et al. 2005).

La obtención de resultados comunes en dos especies tan diferentes como olivo y colza, convierte la tinción citoquímica de semifinos con Calcofluor en una técnica muy fiable y conveniente para diferenciar microsporas inducidas a embriogénesis y proembriones derivados de microsporas, actuando como un marcador temprano del

proceso de reprogramación, que proporciona una intensa marca fluorescente en la gruesa pared localizada debajo de la exina.

No obstante, será necesario realizar nuevas investigaciones para determinar los componentes y su patrón de distribución en estas paredes con reactividad positiva a la tinción con Calcofluor, de las microsporas inducidas y los proembriones derivados de microsporas.

Además, en el caso del olivo, se detectó la presencia de un alto contenido de pectinas no esterificadas en la pared engrosada localizada debajo de la exina de las microsporas reprogramadas.

Las pectinas son el componente mayoritario de las paredes, se trata de polisacáridos de gran complejidad, cuya modificación por la enzima pectinmetilesterasa (PME), actúa regulando la estructura y la rigidez de la pared celular.

El patrón de localización y nivel de esterificación de pectinas observado en proembriones de olivo, aun rodeados de la exina, presenta similitudes y diferencias con otros sistemas vegetales.

En sistemas proliferativos como meristemos radiculares y proembriones jóvenes derivados de microsporas de especies herbáceas como pimiento, cebada, maíz y tabaco, hay una elevada presencia de pectinas esterificadas en las paredes celulares, hecho que se ha sugerido como característica asociada a actividad proliferativa (Ramirez et al. 2003, Ramirez et al. 2004). Nuestros resultados en colza confirman la relación entre la actividad proliferativa y la presencia de pectinas altamente esterificadas observada en estos trabajos. La dinámica de esterificación de pectinas en colza durante la embriogénesis del polen, se detalla en el apartado 5.4 de esta Tesis.

En contraste, los resultados obtenidos en la inmunocitoquímica realizada en olivo con el anticuerpo Jim 5, revelaron la ausencia de pectinas esterificadas en las paredes engrosadas localizadas debajo de la exina y en las paredes divisorias internas que tabican el citoplasma de los proembriones de olivo. No obstante, trabajos anteriores realizados en otras especies arbóreas como *Quercus suber* y *Citrus clementina* revelaron

un patrón de esterificación de pectinas en las paredes celulares de proembriones jóvenes derivados de microsporas, similar al encontrado en olivo en esta Memoria (Ramírez et al. 2003, Ramírez et al. 2004).

Sin embargo, se necesitan más investigaciones para establecer si la ausencia de pectinas esterificadas en las primeras fases de la embriogénesis de microsporas podría estar asociada con la baja tasa de actividad proliferativa de los proembriones en las especies leñosas, que presentan un desarrollo mucho más lento (varios meses) que las herbáceas (20-30 días).

Composición diferencial de paredes durante la progresión de la embriogénesis.

Además de los marcadores de inducción embriogénesis señalados, nuestros resultados mostraron signos de una correcta progresión de embriogénesis de las microsporas reprogramadas, como la presencia de paredes internas divisorias que tabican el citoplasma en una posición central dando lugar a dos células hijas de tamaño similar.

Estas paredes recién formadas presentan una composición diferencial similar a la composición de la pared engrosada localizada debajo de la exina de las microsporas inducidas, descrita previamente.

La reactividad positiva de estas paredes a la tinción con Calcofluor, señaló su alto contenido en celulosa. No obstante, los estudios realizados en proembriones de *Brassica napus*, procedentes de etapas más avanzadas en el desarrollo, mostraron una señal disminuida en la tinción con Calcofluor, señalando que la reactividad positiva a esta tinción es sólo marcador de las primeras etapas de la progresión del proceso de embriogénesis.

Además, en el caso del olivo, estas paredes internas divisorias presentan un alto contenido en pectinas no esterificadas tal y como se observó en la pared engrosada de las microsporas reprogramadas.

La presencia de este tipo de paredes sólo se ha descrito en algunos sistemas (González-Melendi et al. 1995, Ramirez et al. 2003, Ramirez et al. 2004, Barany et al. 2005). Este dato en la especie del olivo, es indicativo de un evento más avanzado en el proceso de embriogénesis de microsporas, lo que supone un gran progreso en la estandarización de sistemas de inducción de embriogénesis eficientes en esta especie. Por otro lado, el hecho de que *Brassica napus*, presente también este tipo de tabicación, sugiere que se trata de una característica común a ambos sistemas, de manera que puede ser un buen marcador de la correcta progresión de embriogénesis de las microsporas que respondieron al estrés inductor.

Finalmente, los resultados que aquí se presentan, proporcionan nuevos datos sobre los eventos moleculares y celulares asociados con la reprogramación de microsporas a embriogénesis, de los que no hay mucha información. Este conocimiento, en una especie arbórea de tanto interés económico como el olivo, podría guiar futuras estrategias para inducir la reprogramación y embriogénesis dirigida a la mejora del rendimiento de producción y regeneración de embriones derivados de microsporas y plantas.

5.4 LA ESTERIFICACIÓN DE PECTINAS Y LA EXPRESIÓN DE PECTINMETILESTERASA (PME) ESTÁN REGULADOS DURANTE EL DESARROLLO Y EMBRIOGÉNESIS DEL POLEN

Diferentes trabajos han estudiado la pared celular estableciendo modelos esquemáticos de la estructura de la misma y la organización de los oligosacáridos que la componen, pero se ha demostrado que estos modelos no pueden ser aplicados a todas las paredes celulares primarias ni a las originadas en los diversos procesos de desarrollo en plantas (Knox 2008). Por esta razón, los trabajos sobre el desarrollo o configuración de polímeros específicos de la pared celular son de gran interés para comprender el significado funcional de los cambios de la pared celular. Las técnicas inmunocitoquímicas mediante el empleo de un amplio rango de anticuerpos desarrollados frente a epítomos de la pared celular, están entre los mejores métodos para el análisis de la diversidad de los componentes de la pared celular *in situ* y las configuraciones macromoleculares que ocurren durante el desarrollo vegetal (Knox 2008).

En esta Tesis se han aplicado técnicas de detección molecular e *in situ* a programas de desarrollo del polen, en los cuales tienen lugar procesos de proliferación y diferenciación.

5.4.1 Los componentes de la pared celular son marcadores de la reprogramación de la microspora a embriogénesis

Las pectinas se sintetizan en el Golgi y se segregan a la pared como polímeros altamente esterificados. Su desesterificación es un proceso clave que modula sus propiedades estructurales, ya que se pueden unir iones de calcio formando puentes entre las capas pépticas que aumentan la rigidez de la pared celular. Nuestros resultados muestran diferencias en el patrón de distribución y en la proporción de pectinas esterificadas y no esterificadas durante los dos programas de desarrollo del polen (desarrollo gametofítico y embriogénico).

El análisis comparativo de los cambios en la esterificación de pectinas en la pared celular durante el desarrollo gametofítico *in vivo* y el desarrollo embriogénico *in vitro* de microsporas, ha permitido la identificación diferencial de caracteres específicos del proceso de reprogramación de la microspora a embriogénesis, como es el alto nivel de pectinas esterificadas en las primeras etapas del desarrollo embriogénico.

Los resultados que aquí se presentan, muestran un bajo grado de esterificación de pectinas en el grano de polen maduro de *Brassica napus*. Estudios inmunocitoquímicos previos en otras especies, han descrito una señal de pectinas no esterificadas mucho mayor que de pectinas esterificadas en la pared celular del grano de polen maduro (Stepka et al. 2000, Suarez-Cervera et al. 2002). Por otro lado, en la etapa de microspora vacuolada de *Brassica napus*, se detectó una elevada cantidad de pectinas altamente esterificadas en la intina, capa localizada debajo de la exina. De modo, que la microspora vacuolada se comporta en este sentido como una célula en proliferación, de hecho sufrirá una división para originar el polen bicelular, al igual que las estructuras multicelulares que aparecen en las primeras etapas del cultivo embriogénico. De manera que nuestros resultados indican que una elevada proporción de pectinas altamente esterificadas en la pared celular, no es sólo un marcador de procesos de proliferación, sino también supone un marcador de la reprogramación de la microspora a embriogénesis.

Los altos niveles de pectinas no esterificadas pueden ser considerados como marcadores del desarrollo gametofítico, mientras que la presencia de pectinas esterificadas pueden emplearse como un marcador del desarrollo embriogénico a partir de polen, permitiendo la identificación de las células inducidas y los primeros proembriones derivados de microsporas. En base a los resultados que aquí se presentan, el anticuerpo Jim7 podría emplearse como un marcador fiable para la detección de microsporas en la etapa adecuada de reprogramación y primeras etapas de embriogénesis y el anticuerpo Jim5 para la detección de granos de polen que no se reprograman y siguen el proceso de diferenciación.

5.4.2 Las pectinas esterificadas y no esterificadas muestran patrones de distribución opuestos durante el desarrollo gametofítico y la embriogénesis del polen

El estudio realizado en etapas secuenciales de los dos programas de desarrollo del polen muestra que la presencia de pectinas altamente esterificadas está asociada con procesos de proliferación, mientras que la presencia de pectinas no esterificadas, está asociada a procesos de diferenciación, resultados resumidos en la figura 5.2.

Existen diferentes estudios, principalmente a nivel de microscopia óptica, de la distribución de antígenos detectados mediante los anticuerpos Jim7 y Jim5, que reconocen pectinas esterificadas y no esterificadas respectivamente, en varios tejidos y órganos vegetales, principalmente a nivel de microscopia óptica (Goldberg, Morvan and Roland 1986, Dolan, Linstead and Roberts 1997, Guglielmino et al. 1997, Hasegawa et al. 2000). La desesterificación de pectinas se lleva a cabo por enzimas pectinmetilesterasas implicadas en procesos de desarrollo específicos, (Goldberg et al. 1986, Dolan et al. 1997, Hasegawa et al. 2000) que modulan la relación de pectinas esterificadas y no esterificadas y su distribución en la pared celular (Goldberg et al. 1986, Dolan et al. 1997, Guglielmino et al. 1997, Hasegawa et al. 2000, Willats et al. 2001a, Vasil 1967, Willats et al. 2001b).

Trabajos previos de nuestro grupo de investigación, han descrito diferencias en la proporción de pectinas esterificadas entre microsporas y embriones derivados de microsporas en 3 especies arbóreas diferentes como *Quercus suber*, *Citrus clementina* y *Olea europaea* así como en meristemos radiculares de *Allium cepa*.

Nuestros resultados en *Brassica napus*, revelan que los niveles de pectinas esterificadas son más altos en paredes celulares de células en proliferación que en las células diferenciadas, las cuales muestran paredes celulares ricas en pectinas no esterificadas. Así, en las primeras etapas del desarrollo embriogénico de *Brassica napus*, los proembriones derivados de polen, presentan un elevado contenido de pectinas esterificadas, mientras que la presencia de pectinas no esterificadas es muy baja. En estudios previos en estructuras multicelulares derivadas de microsporas de especies

herbáceas como pimiento, también se observaron elevados niveles de pectinas esterificadas en las paredes celulares (Barany et al. 2005, Barany et al. 2010a).

Por otro lado, nuestros resultados en *Brassica napus* han contemplado por primera vez las fases más avanzadas del desarrollo embriogénico y muestran que existe una distribución diferencial de las pectinas esterificadas y no esterificadas en los embriones derivados de microsporas más avanzados en el desarrollo. Esta distribución diferencial está asociada a los distintos tipos celulares de los embriones y a procesos de proliferación y diferenciación que tienen lugar en los embriones en desarrollo. En embriones derivados de microsporas de etapas avanzadas, se registran señales positivas de pectinas no esterificadas en las células diferenciadas localizadas en la periferia de los embriones, mientras que las células localizadas en el interior de los mismos presentaban un alto contenido en pectinas esterificadas.

Estos resultados evidencian que el dinamismo de los componentes de la pared celular, en particular de las pectinas, durante los procesos de desarrollo del polen así como los cambios en su grado de esterificación, están asociados a la diferenciación y proliferación celular que tiene lugar durante la embriogénesis del polen.

5.4.3 El patrón de expresión de *PME* cambia con los procesos de proliferación y diferenciación

La enzima pectinmetilesterasa (*PME*) es responsable de la desesterificación de las pectinas presentes en la pared celular. En esta Memoria se analizó la expresión y dinámica del gen que codifica para la proteína *PME* de *Brassica napus* (AY036606).

Los resultados presentados en esta Memoria aportan evidencias del cambio en el patrón de expresión de *PME* en los procesos de proliferación y diferenciación durante el desarrollo gametofítico y embriogénico del polen.

Los resultados obtenidos a partir de dos metodologías diferentes, PCR semicuantitativa e hibridación fluorescente *in situ* (FISH), muestran bajos niveles de expresión de *PME* durante las etapas de microspora vacuolada y polen maduro del



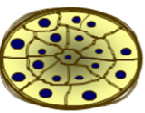


desarrollo gametofítico; teniendo lugar en etapas posteriores del desarrollo un incremento en los niveles de expresión de *PME*, asociado a la emisión del tubo polínico en la germinación del polen (Bosch, Cheung and Hepler 2005, Bosch and Hepler 2005).

Por otro lado, el estudio del desarrollo embriogénico del polen muestra un incremento de los niveles de expresión de *PME* asociado a los procesos de diferenciación que tienen lugar durante el mismo. Así, en las primeras etapas del desarrollo embriogénico, marcadas por procesos de proliferación, nuestros resultados muestran bajos niveles de expresión de *PME*, hecho que acompaña a los altos niveles de pectinas esterificadas detectados en estas etapas, como señal de que la actividad de *PME* es aún baja. No obstante, con la progresión del desarrollo embriogénico, tras la aparición de los primeros embriones globulares, los resultados obtenidos mediante PCR semicuantitativa indican un incremento en los niveles de expresión de *PME*, asociado a los primeros eventos de diferenciación que tienen lugar en esta etapa, especialmente con la formación de la protodermis. Por otro lado, los resultados obtenidos mediante FISH, además de corroborar este incremento en los niveles de expresión de *PME*, muestran la localización de los transcritos de *BnPME*, preferentemente en las capas más externas del embrión globular, correspondientes a células más diferenciadas. Esta distribución diferencial de los transcritos de *BnPME*, se mantiene en las siguientes etapas del desarrollo embriogénico, hasta la formación del embrión cotiledonar maduro, donde se registran los valores de expresión de *PME* más altos, junto con un incremento de los niveles de pectinas no esterificadas.

La enzima *PME* tiene el papel principal en la remodelación de pectinas *in muro* (Pelloux, Rusterucci and Mellerowicz 2007), de manera que cambios en la expresión de *PME*, regulan el grado de metilesterificación de pectinas de la pared celular. El balance entre las formas metilesterificadas y desesterificadas de pectinas es esencial para los mecanismos de la pared y debe estar estrictamente regulado durante el crecimiento celular y desarrollo (Ridley, O'Neill and Mohnen 2001, Willats et al. 2001a, Pelloux et al. 2007, Wolf, Mouille and Pelloux 2009).

Los resultados que aquí se presentan, junto con estudios anteriores (Barany et al. 2010a), permiten concluir que la dinámica de desesterificación de pectinas es una característica común a los procesos de diferenciación celular durante el desarrollo vegetal. Las dos metodologías empleadas en este estudio, diferentes, pero complementarias entre sí, demuestran que los procesos de proliferación se asocian con bajos niveles de expresión de *BnPME*, relacionado a su vez con altos niveles de esterificación de pectinas. Mientras que los procesos de diferenciación se asocian con un incremento de los niveles de expresión de *BnPME*, relacionado a su vez, con un incremento de la desesterificación de pectinas, lo que sugiere que la actividad de la enzima PME está regulada durante este proceso, fundamentalmente a nivel transcripcional.

En la figura 5.2 se muestra un cuadro-resumen del patrón de distribución de los antígenos estudiados en cada una de las etapas del desarrollo, así como los niveles de expresión de *BnPME*, en células en proliferación y en diferenciación.

Proceso de desarrollo	Etapa- tipos celulares		Pectinas no esterificadas (Jim5)	Pectinas esterificadas (Jim7)	Nivel de expresión de PME		
Desarrollo gametofítico del polen	Microspora vacuolada			+		Células en proliferación	
	Polen maduro		++			Células en diferenciación	
Desarrollo embriogénico del polen	Proembrión			++	+	Células en proliferación	
	Embrión globular	Células interiores			++	+	Células en proliferación
		Células exteriores		++		++	Células en diferenciación

5.2. Cuadro resumen de los niveles de esterificación de pectina y el nivel de expresión de *PME* durante los dos programas de desarrollo del polen.

5.4.4 Embriones derivados de microsporas y embriones cigóticos poseen un patrón de expresión de *PME* común

Hay pocos trabajos que comparen el desarrollo de los embriones derivados de microsporas con los obtenidos a partir de embriogénesis cigótica (Yeung et al. 1996, Testillano et al. 2002, Barany et al. 2005).

Estudios anteriores realizados en *Brassica* indican que en las primeras etapas del desarrollo embriogénico, la formación de proembriones multicelulares no sigue un patrón constante y definido como ocurre en la embriogénesis cigótica (Raghavan 2000). Sin embargo, en las etapas más avanzadas del desarrollo embriogénico, con la diferenciación de la protodermis en los embriones globulares y posterior desarrollo en embriones corazón y torpedo, el patrón de desarrollo es muy similar a la secuencia de eventos que tienen lugar durante el desarrollo de embriones cigóticos (Barany et al. 2005). También se ha descrito una organización estructural similar en embriones derivados de polen y embriones cigóticos en la fase de embrión globular en especies arbóreas, como *Quercus suber* (Bueno et al. 2003).

(Barany et al. 2010a), realizó por primera vez un análisis comparativo de determinados componentes de la pared celular mediante el empleo de antígenos específicos, durante las primeras etapas de los dos tipos de embriogénesis en pimiento, mostrando un patrón de distribución similar.

En esta Tesis se analizó la expresión *in situ* de *BnPME* mediante PCR semicuantitativa y FISH en embriones cotiledonares maduros, obtenidos en los dos tipos de programas embriogénicos, la embriogénesis derivada de microspora y la embriogénesis cigótica. Los resultados obtenidos muestran unos niveles de expresión de *BnPME* similares en ambos tipos de embriones cotiledonares maduros, así como una distribución diferencial de transcritos análoga. En el embrión cotiledonar maduro derivado de microsporas se aprecia la diferente distribución de transcritos de *PME* asociado a las zonas de proliferación y diferenciación. En la parte cotiledonar, la señal de hibridación con la sonda antisentido en las regiones proliferantes es más débil, mientras que en las regiones más diferenciadas, como son las células de las

capas más externas del embrión que forman la epidermis, la presencia de transcritos de *BnPME* en el citoplasma es mucho más abundante. Por otro lado, en la parte radicular del embrión cotiledonar derivado de microsporas, la presencia de transcritos de *BnPME* es muy elevada.

Estudios complementarios realizados en este trabajo muestran una distribución y dinámica de acumulación de almidón en embriones cotiledonares maduros derivados de polen, similar a la descrita en embriones cotiledonares cigóticos, donde la diferenciación celular aumenta acompañada de un incremento en los depósitos de almidón, siendo escasos en las células del interior próximas al eje de los meristemos del embrión y las capas celulares del interior de los cotiledones, que corresponden a zonas en proliferación.

Estos datos, indican la existencia de un patrón común en la organización estructural de la pared celular en las etapas finales de los dos programas de desarrollo embriogénicos estudiados, proporcionando un apoyo adicional a la idea de que la embriogénesis de microsporas mimetiza el proceso de embriogénesis cigótica.

5.4.5 La proteína PME se localiza en la pared celular de células diferenciadas en hojas de tabaco transformadas con PME-GFP

El empleo de la tecnología GFP en esta Tesis ha permitido la localización *in vivo* de la proteína PME en hojas de *Nicotiana tabacum*, sistema modelo elegido para la transformación transitoria con construcciones PME-GFP, expresión dirigida por el promotor constitutivo 35S de la proteína de fusión codificada por la construcción de la secuencia completa de PME seguida de la secuencia de GFP (construcción PME-GFP)

El análisis *in vivo* en el microscopio confocal de dicha construcción, mostró la localización específica de la proteína PME en las paredes celulares diferenciadas de las células del mesófilo y de las células epidérmicas de hojas de *Nicotiana tabacum*. Cabe destacar el diferente patrón de localización de GFP detectada en las células de los dos tipos de mesófilos. Así, en la figura 4.41, se observa que la distribución de

PME en el mesófilo lagunar se manifiesta con una señal más engrosada, sugiriendo su distribución homogénea por las paredes celulares más gruesas en esta capa.

Además, nuestros resultados demuestran la presencia de la proteína PME-GFP en las gruesas paredes de las células guarda que forman los estomas de la epidermis (Fig. 4.42). Estos resultados apoyarían la posible implicación de la enzima PME en el proceso de apertura y cierre estomático, así como el papel de las pectinas en la flexibilidad de las paredes de estas células (Jones et al. 2003, Jones et al. 2005).

Los patrones de distribución de la proteína de fusión PME-GFP mostrarían por primera vez para el gen de *Brassica napus*, que la proteína PME después de ser transcrita y procesada es dirigida a la pared donde realizaría su actividad enzimática sobre las pectinas *in muro*.

5.5 LA METILACIÓN DEL DNA Y LA EXPRESIÓN DE LA DNA METILTRANSFERASA MET1 CAMBIAN CON LA REPROGRAMACIÓN CELULAR Y DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS

La metilación del DNA es una modificación epigenética esencial que contribuye a la regulación del correcto crecimiento y desarrollo de los organismos eucariotas. En plantas, la metilación del DNA está implicada en numerosos procesos, incluyendo la transcripción, replicación, y reparación del DNA, además de estar implicada en el silenciamiento génico y la transposición de elementos móviles.

En esta Memoria de Tesis Doctoral se ha analizado la dinámica del patrón de metilación del DNA como marca epigenética del estado funcional de la cromatina en relación a la arquitectura nuclear durante el desarrollo y reprogramación a embriogénesis del polen, demostrando que ambos procesos están controlados epigenéticamente.

5.5.1 La diferenciación del polen está asociada al aumento de metilación del DNA

Los resultados experimentales obtenidos en esta Tesis, mediante HPCE e inmunolocalización, revelan un incremento en los niveles de metilación global del DNA durante la maduración del grano de polen, de manera que la etapa de polen maduro se corresponde con los niveles más altos de metilación del DNA, mientras que la etapa de microspora vacuolada presenta niveles más bajos. La cuantificación de 5mdC mediante HPCE mostró una tendencia y unos niveles de metilación similar en las dos especies de estudio, *Nicotiana tabacum* y *Brassica napus*, lo que apoya el aumento en la metilación global del DNA como indicador del proceso de diferenciación durante el desarrollo gametofítico del polen, independientemente de la especie.

Trabajos recientes sugieren modificaciones cromatínicas a gran escala, asociadas con la diferenciación epigenética de las células gametofíticas (Baroux, Raissig and Grossniklaus 2011).

En la actualidad se dispone de un conocimiento muy limitado de la regulación de la metilación del DNA durante la gametogénesis; este conocimiento es crucial para el entendimiento de la dinámica de la metilación del DNA en la línea germinal vegetal.

Según (Benedito et al. 2008) y (Wan et al. 2008), la diferenciación celular se acompaña de grandes cambios en la expresión génica, los cuales implican modificaciones del DNA y la cromatina. Esta organización a diferentes niveles parece contribuir a la estabilidad y heredabilidad de los programas de transcripción que define la función celular (Lanzuolo and Orlando 2007, Valledor et al. 2007, Valledor et al. 2009). Asimismo, también se ha descrito un aumento de metilación global del DNA en procesos de maduración de órganos como el desarrollo floral, en el que la 5mdC incrementa con la diferenciación de los órganos reproductivos (Zluvova, Janousek and Vyskot 2001, Zhao et al. 2008, Meijon et al. 2009), durante la formación del polen en alcornoque (Ribeiro, Viegas and Morais-Cecilio 2009) y durante el periodo de inactividad de los botones florales en *Castanea sativa*, y disminuye con la apertura de los mismos (Santamaria et al. 2009). Sin embargo, estos trabajos no analizan el patrón de distribución nuclear del DNA metilado, como se ha realizado en esta Tesis.

Según nuestros resultados, aunque la tendencia de metilación del DNA observada en las dos especies estudiadas es la misma, el patrón de distribución de 5mdC encontrado es ligeramente diferente, debido a las diferencias en el patrón de organización cromatínica de ambas. Por un lado, la microspora vacuolada de tabaco presenta un patrón de cromatina condensada en retículo distribuida por todo el núcleo, mientras que la colza presenta un patrón de heterocromatina con escasas masas de cromatina condensada, que aparecen marcadas intensamente, como revela la tinción con DAPI en la misma imagen. Ambos patrones cromatínicos, reflejan una

organización nuclear característica de células activas en transcripción (González-Melendi et al. 1995).

Nuestros resultados mostraron una distribución de 5mdC muy diferente en los núcleos vegetativo y generativo del polen bicelular de las dos especies. En la colza, el núcleo vegetativo presenta una señal muy débil con un patrón punteado, asociando la presencia de 5mdC a las regiones de mayor condensación cromatínica, mientras que el núcleo generativo presenta una intensa señal de 5mdC por todo el núcleo. En tabaco, se observa la misma tendencia, pero el patrón encontrado en el núcleo vegetativo es algo diferente, ya que aparece más extendido por el núcleo debido a su mayor grado de condensación cromatínica.

La cromatina condensada ha sido descrita como un estado inactivo de la misma, (Back 1976)(Back, 1976;Fakan and Puvion, 1980a) ya que la transcripción y la replicación no puede ser llevada a cabo en estados de tan alta condensación.

Así, el patrón de cromatina condensada del núcleo generativo está relacionado con muy baja o nula actividad transcripcional mientras que la organización del núcleo vegetativo de ambas especies, se relaciona con un estado de mayor actividad transcripcional (Martin et al. 1970, McCormick 1993, Testillano et al. 1995).

Esta variación en el patrón de condensación de la cromatina refleja por lo tanto, diferentes estados de actividad de ambas células, relacionados con sus diferentes funciones durante la maduración y germinación del polen. La célula vegetativa presenta una elevada actividad biosintética de la maquinaria de formación del tubo polínico (Mascarenhas 1975)(Risueño, 1990;Mascarenhas, 1975;Testillano and Risueño, 1998), mientras que la célula generativa permanece inactiva, en espera de la segunda mitosis del polen que origina las dos células espermáticas o gametos.

Nuestros resultados indican que el incremento en los niveles de metilación global del DNA durante el desarrollo gametofítico del polen, está asociado a la heterocromatinización que tiene lugar con los procesos de diferenciación celular. En el polen, los bajos niveles de metilación del núcleo vegetativo, serían característicos de una cromatina muy activa, que compensa el silenciamiento génico del núcleo generativo, con elevados niveles de metilación.

5.5.2 La reprogramación del polen está asociada a la disminución de la metilación del DNA y su redistribución nuclear

La reprogramación de la microspora a embriogénesis mediante un estrés inductor, implica no sólo cambios morfológicos y fisiológicos en la microspora, sino que también se acompaña de cambios en la organización global del genoma, de manera que requiere factores específicos que contribuyen a regular la flexibilidad del genoma, siendo las modificaciones epigenéticas un factor clave de esta flexibilidad (Arnold-Schmitz 2004, Miguel and Marum 2011).

Existen evidencias en cultivos celulares de la palmera del aceite, que indican que desregulaciones epigenéticas de la expresión génica pueden originar diferentes fenotipos en los regenerantes obtenidos mediante embriogénesis somática (Miguel and Marum 2011).

Los resultados experimentales obtenidos en esta Tesis, mediante HPCE e inmunolocalización, revelaron que tras la reprogramación a embriogénesis, no se produce el incremento de los niveles de metilación observado durante la maduración del polen, sino que se mantienen o disminuyen ligeramente con respecto a la etapa de microspora vacuolada. Asimismo, la inmunolocalización de 5mdC, mostró un patrón de distribución asociado exclusivamente a las pequeñas masas de cromatina condensada presentes.

Los núcleos de los proembriones haploides obtenidos tras la reprogramación a embriogénesis, no presentan caracteres de células diferenciadas, sino en ciclo celular activo (Medina et al. 1983)(Risueño and Medina, 1986a; Medina *et al.*, 1983a). El grado de condensación de cromatina en las células de los proembriones, es similar a la detectada en núcleos en interfase de células en ciclo (Gonzalez-Melendi et al. 1998)(González-Melendi *et al.*, 1998), sugiriendo que todas se encuentran en proliferación, etapa inicial de la embriogénesis, ruta a la que han cambiado su programa de desarrollo gametofítico a embriogénico.

Los resultados que aquí se presentan, indican por lo tanto, un cambio en el patrón epigenético de las microsporas embriogénicas en cultivo, asociado a la proliferación celular que tiene lugar en esta etapa inicial del cultivo embriogénico (4-5 días). Este hecho estaría relacionado con los cambios en la expresión génica que ocurren con el nuevo programa de desarrollo, de forma similar a lo descrito en mamíferos (Reik, Dean and Walter 2001, Morgan et al. 2005, Meijon et al. 2010).

Como consecuencia del estrés inductor, se produce el cambio de programa de desarrollo y la microspora adquiere competencia embriogénica y capacidad de proliferación, que tras la embriogénesis generará una planta. Estudios realizados por (Hasbun et al. 2007) en tallos de individuos de *Castanea sativa* de diferentes edades, indicaron que la capacidad morfogénica está asociada con bajos niveles de metilación del DNA, mientras que individuos maduros con menor potencial morfogénico, presentan niveles de metilación más altos.

La expresión génica determinada tanto en procesos de desarrollo como en estrés, a menudo depende de la modificación de histonas y la metilación del DNA (Chinnusamy and Zhu 2009).

Se ha visto que la metilación del DNA puede activar o reprimir la transcripción de genes, mediante cambios en la configuración de la cromatina. Generalmente, la desmetilación del DNA se asocia con la conformación abierta de la cromatina, que incrementa la accesibilidad al genoma de la maquinaria de la transcripción (Law and Suttle 2005), mientras que la conformación cerrada de la cromatina reprime la expresión génica ya que limita la accesibilidad (Reyes 2006, Kouzarides 2007, Pfluger and Wagner 2007).

De esta manera, los cambios epigenéticos observados en nuestro estudio tras la reprogramación de la microspora a embriogénesis, podrían conllevar la reducción del silenciamiento de genes diana, con el incremento de la plasticidad celular facilitando el acceso a los factores de transcripción.

Según (Costa and Shaw 2006, Costa and Shaw 2007) la habilidad de remodelar la organización cromatínica celular, puede proporcionar la base de la plasticidad del

cambio del destino y la totipotencia celular, de manera que la organización de los dominios de cromatina proporcionan una plataforma adicional a nivel de regulación e información genética. Nuestros resultados demuestran que el control epigenético mediante la metilación del DNA juega un papel esencial en el proceso de reprogramación y diferenciación celular y una disminución en la metilación global permitiría a las células ser reprogramadas.

5.5.3 El desarrollo embriogénico del polen conlleva un aumento de metilación del DNA

El análisis del patrón de metilación de las etapas más avanzadas del desarrollo embriogénico realizado en nuestro estudio, muestra un incremento de los niveles de metilación global del DNA, asociado al incremento de los procesos de diferenciación celular que tienen lugar en estas etapas. Así, el elevado grado de diferenciación del embrión cotiledonar maduro, se acompaña de los niveles más altos de metilación del DNA. Estos resultados indican que el progreso de la diferenciación celular está relacionado con el incremento rápido de los niveles de metilación del DNA y el inicio de expresión de un nuevo programa génico (Costa and Shaw 2007, Zhao et al. 2008).

No obstante, aunque la cuantificación del nivel de metilación del DNA es un parámetro global importante asociado al estado del desarrollo y la expresión génica, los estudios de inmunolocalización permiten la observación del patrón de distribución nuclear de 5mdC proporcionando una información más detallada, ya que permite la observación del grado de diferenciación y organización de los diferentes tipos celulares, especialmente en el caso de embriones. Así, las inmunolocalizaciones de 5mdC realizadas en este trabajo en *Brassica napus*, muestran un patrón de distribución nuclear de 5mdC punteado, asociado a las pequeñas masas de cromatina condensada. Esta señal de inmunofluorescencia incrementa con la embriogénesis hasta el embrión globular, donde se puede apreciar una mayor señal de 5mdC en los núcleos de las capas celulares externas más diferenciadas, que forman la protodermis.

Este patrón de distribución asociada al grado de diferenciación celular se mantiene hasta el embrión cotiledonar maduro, donde las zonas meristemáticas presentan una señal de 5mdC más escasa, mientras que el resto de las zonas, presentan una señal fluorescente más abundante.

Algunos estudios (Tessadori et al. 2007, Exner and Hennig 2008) indican que durante los procesos de diferenciación celular y maduración, se produce un incremento de heterocromatina que disminuye durante la proliferación.

Nuestros datos en *Brassica* demuestran que la organización de la cromatina cambia durante el desarrollo embriogénico del polen, como también se ha observado en otras especies (Testillano et al. 2000, Testillano et al. 2005) de manera que el incremento de los niveles de metilación global del DNA detectado durante el proceso, está asociado a la heterocromatinización que tiene lugar en la diferenciación celular en las etapas más avanzadas de la embriogénesis, mientras que tras la reprogramación de la microspora a embriogénesis, los niveles de metilación disminuyen asociado a los procesos de proliferación que se producen. Todo ello indica que existe un control epigenético de la reprogramación de la microspora a embriogénesis.

5.5.4 La metilación del DNA y su patrón de distribución es análoga en embriones de microsporas y embriones cigóticos

La inmunolocalización de 5mdC en embriones cotiledonares maduros obtenidos mediante dos tipos de programas diferentes, embriogénesis derivada de microsporas y embriogénesis cigótica, muestran unos niveles y distribución de citosinas metiladas similar, indicando la existencia de un patrón epigenético análogo en ambos programas embriogénicos.

En ambos casos se aprecia una diferente distribución de 5mdC asociado a las zonas de proliferación y diferenciación. En las regiones más proliferantes de los dos tipos de embriones, la señal de 5mdC es más débil, mientras que en las regiones más

diferenciadas, como son las células de las capas más externas del embrión, que forman la epidermis, la presencia de citosinas metiladas es mucho más abundante.

La embriogénesis cigótica en plantas, está controlada por varios genes, críticos para el desarrollo normal del embrión, de manera que alteraciones en estos genes, pueden producir la interrupción de la formación del embrión y el aborto de la semilla (Huh et al. 2008).

Trabajos recientes parecen indicar que cambios en el patrón de metilación durante la embriogénesis cigótica podrían estar implicados en la interrupción de la regulación o el mantenimiento del proceso de embriogénesis de híbridos interespecíficos de *Phaseolus*, apoyando hipótesis previas de la importancia de la metilación del DNA para la regulación de la embriogénesis de plantas y la expresión génica (Abid et al. 2011).

Varios trabajos han destacado las similitudes entre la embriogénesis de microsporas y la embriogénesis cigótica durante las últimas etapas del proceso (Yeung et al. 1996, Ilic-Grubor et al. 1998, Bueno et al. 2003, Barany et al. 2005, Barany et al. 2010a). Nuestros resultados de metilación del DNA aportan nuevas evidencias de que la embriogénesis del polen sigue un programa similar a la embriogénesis cigótica.

La metilación del DNA juega un papel esencial en el desarrollo vegetal como mecanismo epigenético de control de los procesos de diferenciación y proliferación celular. La monitorización de la dinámica de la metilación del DNA durante el desarrollo gametofítico y embriogénico del polen en este trabajo indica la existencia de un control epigenético de ambos procesos, siendo la organización de la cromatina un factor decisivo para su coordinación. Al mismo tiempo, estos resultados constituyen nuevas evidencias de que la metilación del DNA no es un proceso estático, sino que se trata de un mecanismo epigenético muy dinámico durante el desarrollo y la reprogramación celular en plantas.

5.5.5 La expresión del gen *MET1* está regulada durante el desarrollo y embriogénesis del polen

En esta Tesis se ha analizado la expresión y dinámica del gen que codifica para la proteína DNA metiltransferasa *MET1*, principal responsable de la metilación de los residuos de citosinas del DNA en plantas (Chan, Henderson and Jacobsen 2005), en las especies de *Brassica napus* y *Nicotiana tabacum*, identificados en las bases de datos como AB251937.1 y AB280788, respectivamente.

El análisis del patrón de expresión temporal y espacial de *MET1* durante los procesos de desarrollo y embriogénesis del polen se ha llevado a cabo mediante RT-PCR y FISH, con objeto de determinar si los cambios de metilación de DNA observados previamente, están asociados a cambios en la expresión del gen *MET1*.

Trabajos anteriores indican que *MET1* es activa en la línea germinal masculina vegetal (Jullien et al. 2006, Jullien et al. 2008). (Saze, Scheid and Paszkowski 2003), observaron que *MET1* es necesaria para el mantenimiento de patrones de metilación durante la etapa de gametofito en el ciclo de vida vegetal. Por otro lado, se ha descrito que durante el desarrollo vegetativo y la gametogénesis masculina, *MET1* reprime la expresión de genes de impronta materna (Kinoshita et al. 2004, Jullien and Berger 2010).

Nuestro trabajo aporta evidencias de que la expresión de *MET1* está regulada durante el desarrollo gametofítico y embriogénico del polen; los cambios en su patrón de expresión, están asociados a los cambios de programa de desarrollo y a procesos de diferenciación y proliferación. Los resultados experimentales obtenidos mediante PCR semicuantitativa y FISH, revelan un incremento en los niveles de expresión de *MET1* durante el proceso de maduración del grano de polen, mientras que la reprogramación a embriogénesis, mantiene los niveles de expresión de *MET1* invariables respecto a la etapa de microspora vacuolada. En las dos especies de estudio, *Nicotiana tabacum* y *Brassica napus*, se observó un patrón de expresión de *MET1* similar durante la maduración del polen.

Experimentos en *Arabidopsis thaliana* con granos de polen de mutantes para *met1*, no muestran defectos evidentes en la célula vegetativa o en la función germinal, indicando que la metilación de los sitios GC no tiene un papel regulador esencial en la diferenciación de la célula vegetativa o división de células germinales (Twell 2011). Sin embargo, la metilación del DNA del polen juega un importante papel en el silenciamiento de elementos transponibles (Zilberman et al. 2007, Zilberman 2008).

Dos trabajos recientes han mostrado una interesante relación entre la metilación *de novo* del DNA durante la gametogénesis masculina y pequeños RNAs de interferencia (siRNAs). Se ha observado que en la célula vegetativa del grano de polen se produce un incremento de la actividad de algunos elementos transponibles, como consecuencia del menor grado de metilación del DNA, probablemente resultado de la ausencia de transcripción de MET1 (Jullien et al. 2008) y DDM1, factor remodelante de la cromatina, necesario para el mantenimiento de la metilación GC en la célula vegetativa (Slotkin et al. 2009). Se cree que los siRNA producidos en la célula vegetativa del polen, que no contribuye a la formación del cigoto, inducen el silenciamiento de transposones en los gametos masculinos (Slotkin et al. 2009). Aunque esta hipótesis es interesante, no hay todavía evidencias suficientes para demostrarlo (Jullien and Berger 2010). De acuerdo con (Baroux et al. 2011), esto sería un ejemplo en el que la célula vegetativa del polen “se sacrifica” para proteger la estabilidad del genoma de los gametos masculinos y su transmisión a la siguiente generación.

No obstante, serán necesarias más investigaciones para conocer los mecanismos implicados en la comunicación celular mediada por siRNA y su papel en el desarrollo del polen (Le Trionnaire and Twell 2010).

Por otro lado, la reprogramación de la microspora a embriogénesis también conlleva un cambio en el patrón de expresión de MET1, ya que según los resultados obtenidos en *Brassica napus* en este estudio, a los 4 días de cultivo, no se observa el incremento en la expresión de *BnMET1* detectado durante la maduración del polen.

Este cambio en el patrón de expresión de *MET1* podría estar en relación con el cambio en el patrón de metilación del DNA observado (apartado 5.53). El análisis de expresión en las etapas más avanzadas del desarrollo embriogénico, muestra un incremento en la expresión del gen *BnMET1*. Igualmente este incremento podría estar en relación con el incremento en los niveles de metilación del DNA detectados. Los resultados obtenidos mediante FISH, además de confirmar este incremento en la expresión de *BnMET1*, también muestran la localización de los transcritos de *BnMET1* preferentemente en las células de las capas más externas del embrión globular, con mayor grado de diferenciación. Esta distribución diferencial de los transcritos de *BnMET1*, se mantiene en las siguientes etapas del desarrollo embriogénico, hasta la formación del embrión cotiledonar maduro, donde se registran los valores de expresión de *MET1* más altos, juntos con un incremento de los niveles de metilación del DNA, sugiriendo que la actividad de MET1 estaría regulada durante este proceso fundamentalmente a nivel transcripcional.

La monitorización de la expresión del gen *MET1* durante el desarrollo y embriogénesis del polen, indica un patrón de expresión de *MET1* dinámico, que cambia en relación a los procesos de proliferación y diferenciación que tienen lugar, reafirmando además, la existencia de un control epigenético en las dos rutas de desarrollo del polen estudiadas en esta Tesis. (Yamauchi et al. 2008) describió este dinamismo en la expresión del gen que codifica para MET1 durante el desarrollo vegetal en muestras de tallos y raíces de arroz (*Oryza sativa* L.).

Asimismo, también existen trabajos que señalan la existencia de un mecanismo de regulación a nivel transcripcional de los genes que codifican metiltransferasas en arroz, pero sugieren al mismo tiempo la investigación de la posible existencia de mecanismos de control de la expresión adicionales, incluyendo proteólisis (Teerawanichpan et al. 2009).

Los resultados que aquí se presentan, muestran una concordancia entre la naturaleza dinámica de la metilación de citosinas en las diferentes etapas del desarrollo y embriogénesis del polen y la expresión del gen que codifica para MET1.

Algunos trabajos (Hsieh 2000, Iida et al. 2002)(P.M: vertino et al., 2002) han indicado que bajos niveles de metilación del DNA no se correlacionan con bajos niveles de expresión de *MET1*, sino lo contrario. Esto se debe a la existencia de mecanismos de desmetilación activos en la célula, que actúan disminuyendo los niveles de MET1 independientemente de los niveles de expresión del gen *MET1*.

La concordancia encontrada en nuestros resultados sugiere que MET1 cumple un papel esencial en el mantenimiento y metilación *de novo* del DNA en el polen y células del embrión, sin la actuación de mecanismos importantes de desmetilación.

5.5.6 Embriones derivados de microsporas y embriones cigóticos poseen un patrón de expresión de *MET1* común

El análisis de la expresión *in situ* de *BnMET1* mediante PCR semicuantitativa y FISH en embriones cotiledonares maduros obtenidos mediante dos tipos de programas diferentes, embriogénesis derivada de microsporas y embriogénesis cigótica, muestran unos niveles y distribución de transcritos similar, indicando la existencia de un patrón de expresión análogo en ambos programas embriogénicos.



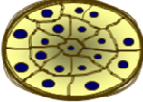




En ambos casos se aprecia la diferente distribución de transcritos de *MET1* asociado a las zonas de proliferación y diferenciación. En la parte cotiledonar de los dos tipos de embriones, se observa que en las regiones más proliferantes, la señal de hibridación con la sonda antisentido es más débil, mientras que en las regiones más diferenciadas, como son las células de las capas más externas del embrión, que forman la epidermis, la presencia de transcritos de *BnMET1* en el citoplasma es mucho más abundante. Por otro lado, en la parte radicular de estos embriones, la presencia de transcritos de *BnMET1* es muy elevada.

(Li 2002) y (FitzGerald et al. 2008) sugirieron que la *MET1* es un regulador central de los genes esenciales para el desarrollo y viabilidad de semillas

Por otro lado, también se ha descrito que *MET1* regula la expresión de los genes que influyen en la identidad celular durante la embriogénesis como *YODA* (*YDA*), gen implicado en la especialización de la identidad celular del embrión y del suspensor (Lukowitz et al. 2004). De hecho, mutantes de *met1* muestran divisiones celulares alteradas tanto en la parte del suspensor como en las células del embrión propiamente dicho, desde etapas tempranas de embriogénesis, acompañado de una viabilidad reducida (Xiao et al. 2006).

Trabajos anteriores (Yeung et al. 1996, Bueno et al. 2003, Barany et al. 2005) indicaron diversas analogías entre los embriones cigóticos cotiledonares y los embriones derivados de microsporas, como la organización de los meristemos radiculares y la presencia de almidón en las células de la cofia de la radícula, entre otras similitudes en el desarrollo.

Nuestros datos, proponen la participación de *MET1* en la diferenciación celular que tiene lugar en las últimas etapas del proceso de embriogénesis, al mismo tiempo que muestran un patrón de expresión de *MET1* similar para ambos programas de desarrollo embriogénicos en la etapa final del desarrollo, proporcionando una evidencia adicional a la idea de que la embriogénesis de microsporas mimetiza el proceso de embriogénesis cigótica, en este caso, respecto a la regulación epigenética de ambos procesos de desarrollo.

Proceso de desarrollo	Etapa- tipos celulares		Nivel de metilación global del DNA	Nivel de expresión de <i>MET1</i>		
Desarrollo gametofítico del polen	Microspora vacuolada		+	+	Células en proliferación	
	Polen maduro		+++	+++	Células en diferenciación	
Desarrollo embriogénico del polen	Proembrión		+	+	Células en proliferación	
	Embrión globular	Células interiores		++	++	Células en proliferación
		Células exteriores		+++	+++	Células en diferenciación
	Embrión cotiledonar	Células de zonas meristemáticas		++	++	Células en proliferación
		Células de zonas en diferenciación		+++	+++	Células en diferenciación

5.3. Cuadro resumen de los niveles de metilación global del DNA y el nivel de expresión de *MET1* durante los dos programas de desarrollo del polen.

5.6 MUERTE CELULAR PROGRAMADA Y METILACIÓN DEL DNA DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DEL POLEN *IN VIVO* Y DESARROLLO DEL TAPETUM

Durante la reprogramación *in vitro* de la microspora a embriogénesis inducida por estrés, cumplen un papel importante la metilación del DNA y la MCP. Por tanto, en esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo el estudio de la dinámica de estos dos procesos durante la diferenciación del polen *in vivo*, especialmente durante el desarrollo del tapetum, donde tiene lugar un conocido proceso de MCP.

En plantas superiores, la diferenciación de las células del tapetum es un proceso crítico durante las primeras etapas del desarrollo del polen, ya que el tapetum es el tejido nutricio de la antera. Sin embargo, la correcta culminación del proceso de maduración y formación de granos de polen viables, requiere la degradación de las células del tapetum en las últimas etapas del desarrollo gametofítico (Papini, Mosti and Brighigna 1999, Varnier et al. 2005, Li et al. 2006, Aya et al. 2009). De esta manera, las etapas finales del desarrollo de la antera y la liberación del polen, implica el cambio de un programa de diferenciación celular a un programa de muerte celular (Wilson et al. 2011).

Existen trabajos que indican que la maduración del tapetum y su muerte una vez finalizada su función, no es un proceso incontrolado, sino que tiene lugar mediante un proceso de muerte celular programada (MCP) (Bedinger 1992, Papini et al. 1999, Wu and Cheung 2000, Rogers 2006). Sin embargo, los mecanismos que subyacen en este proceso no se conocen bien.

En esta Tesis Doctoral se ha caracterizado la dinámica de reorganización subcelular durante el desarrollo del tapetum, aportando nuevos datos sobre el proceso de MCP que sufren las células tapetales, siendo de especial novedad la determinación de actividad enzimática tipo caspasa 3 y su localización *in situ*, así como los cambios en la metilación del DNA asociados a la progresión de la MCP.

5.6.1 La MCP del tapetum durante el desarrollo presenta características apoptóticas y actividad enzimática tipo caspasa 3

Características apoptóticas de la MCP del tapetum

El estudio realizado en esta Memoria ha permitido caracterizar la MCP del tapetum con una serie de cambios citoplásmicos y nucleares similares a los descritos en células animales en apoptosis.

En las dos especies empleadas para nuestro trabajo, *Nicotiana tabacum* y *Brassica napus*, el inicio de la MCP del tapetum se sitúa alrededor de la etapa de microspora vacuolada del desarrollo gametofítico. El inicio del proceso está marcado por una disminución de la actividad transcripcional, manifestado por una menor señal de inmunofluorescencia con anti-RNA. Las células del tapetum en MCP temprana, sufren un proceso de vacuolización citoplásmica, acompañado de condensación cromatínica y lobulación nuclear. La progresión del desarrollo gametofítico conlleva una acentuación de las características apoptóticas señaladas. Así en la etapa de polen bicelular, las células del tapetum han finalizado su función y presentan núcleos completamente lobulados con una acusada retracción citoplásmica, características propias de una apoptosis avanzada.

Existen trabajos que explican la importancia de la correcta coordinación temporal de la MCP del tapetum. (Kawanabe et al. 2006) propone que la señal de iniciación de MCP en el tapetum, podría iniciarse en las etapas correspondientes a la tétrada o microspora joven.

No obstante, a pesar de que las células del tapetum de las dos especies estudiadas presentaron rasgos de MCP similares, se puede apreciar un ligero desfase en el inicio de la misma en ambas especies. Así nuestros resultados parecen indicar que el proceso de MCP en las células tapetales de tabaco, se inicia cuando las microsporas alcanzan la etapa de microspora vacuolada en el desarrollo gametofítico, mientras que en la colza, los cambios subcelulares observados señalan que la MCP del tapetum se inicia más tempranamente, cuando las microsporas inician el proceso de vacuolización. Este pequeño desfase podría estar relacionado con la diferente

condición del desarrollo del polen de ambas especies, ya que el polen de la colza madura en la antera hasta la fase final de formación de las células espermáticas, liberando polen tricelular, mientras que en tabaco, el polen maduro es bicelular y sólo tras la germinación del tubo polínico tiene lugar la división de la célula generativa. Esta diferencia en el desarrollo, podría implicar un adelanto en el proceso de MCP que tiene lugar durante el desarrollo del tapetum de *Brassica napus*.

Localización in situ de proteína tipo caspasa 3

Además de las características apoptóticas señaladas durante el proceso de MCP en el tapetum, se ha identificado por primera vez la actividad enzimática y presencia de una proteína tipo caspasa 3 durante el desarrollo del tapetum, aportando nuevos datos del proceso de MCP que sufren las células del tapetum.

La función de las caspasas está muy bien descrita en animales como mediadores en la iniciación y ejecución de la apoptosis (Bonneau et al. 2008). La proteína ejecutora predominante en células animales es la caspasa 3, responsable de la mayor parte de los efectos desencadenantes de muerte celular. Caspasa 3 se sintetiza como proenzima inactiva o zimógeno, el cual se activa a través de uno o dos pasos proteolíticos que cortan el péptido precursor generando dos fragmentos, uno de los cuales, contiene el centro catalítico de la enzima y constituye la forma activa de la proteína. No obstante, la ruta de señalización de MCP en plantas es menos conocida, de hecho, no se han encontrado genes homólogos de caspasas en plantas, aunque existen evidencias que sugieren la existencia de enzimas “caspasa-like” que inducen la muerte celular (Thomas and Franklin-Tong 2004, Lam 2004, Bosch and Franklin-Tong 2007, Serrano, Pelliccione and Olmedilla 2010).

En este trabajo, se ha detectado y localizado por primera vez una proteína tipo caspasa 3 (“caspasa 3-like”) en el citoplasma de las células del tapetum en estadios tempranos de MCP en *Brassica napus* mediante el empleo de un anticuerpo específico para la forma activa de la caspasa 3 “anti-cleaved caspase-3”.

Los resultados obtenidos en el “Immunoblot” realizado para la comprobación de la especificidad del anticuerpo en el material de estudio, demostraron que el anticuerpo reconocía la presencia de una proteína, proporcionando una única banda de peso molecular equivalente al de la forma activa de caspasa 3.

Nuestros resultados de inmunolocalización de caspasa 3 indicaron la presencia de esta enzima en el citoplasma de las células del tapetum en MCP temprana, acompañando a los cambios subcelulares característicos de MCP señalados anteriormente. Sin embargo, en etapas avanzadas del proceso de MCP, la presencia de esta enzima disminuyó significativamente, sugiriendo que la participación de caspasa 3 en el proceso de MCP del tapetum es en las primeras etapas de la misma y acontece rápidamente. Por otro lado, en etapas anteriores del desarrollo gametofítico en las que las células del tapetum están activas no se observó señal fluorescente correspondiente a caspasa 3.

Existen varios trabajos en los que se ha detectado la presencia de caspasa 3 en el citoplasma de células animales en apoptosis, mediante análisis inmunohistoquímicos (Gown and Willingham 2002, Olney et al. 2002, Kaiser et al. 2008), sin embargo, en células vegetales, los primeros trabajos que existen se corresponden a los estudios realizados por nuestro grupo en meristemos radiculares de *Allium cepa* en los que se indujo MCP mediante un estrés salino (Cortes-eslava, J et al., 2005) y estudios preliminares en células del tapetum de *Nicotina tabacum* y *Capsicum anunn* (Chakrabarti N et al., 2006), los cuales indicaron una mayor presencia de “caspasa 3-like” en el citoplasma de las células del tapetum correspondientes a la etapa de MCP temprana, tras el incremento detectado en la liberación de citocromo C al citoplasma, debido a una alteración de la permeabilidad de la mitocondria, típico suceso característico de apoptosis en células animales.

Dinámica de la actividad enzimática caspasa 3

Además de la localización la proteína, nuestros resultados demuestran una actividad enzimática caspasa 3. La determinación de la actividad enzimática caspasa 3, realizada en esta Memoria, se llevó a cabo en *Nicotiana tabacum* y *Brassica napus*, así como en un sistema experimental modelo para la inducción de MCP mediante tratamientos de estrés salino, como son los meristemos radiculares de *Allium cepa*. El tratamiento salino provocó la inducción de MCP de las células meristemáticas, caracterizadas en este momento por la presencia de numerosas vacuolas en el citoplasma, así como un descenso del número de mitosis y núcleos lobulados con un mayor grado de condensación cromatínica, rasgos característicos de etapas tempranas de MCP.

Además, los experimentos realizados en este trabajo en presencia de inhibidor específico de la actividad caspasa 3, Ac-DEVD-CHO, mostraron ausencia total de la actividad de esta proteína como resultado de una inhibición efectiva.

El empleo de la proteína p35 de baculovirus (inhibidor de caspasas general) y otros inhibidores sintéticos diseñados para bloquear las actividades caspasa, han ocasionado la interrupción de la muerte celular en varios sistemas experimentales de plantas como: la MCP inducida por *Agrobacterium tumefaciens* en callos embriogénicos en maíz (Hansen et al. 2000), la muerte celular inducida por la toxina *AlterRNAiA altetRNAa* f. sp. *lycopersici* (Lincoln et al. 2002), la muerte celular como consecuencia de la respuesta de hipersensibilidad en plantas de tabaco infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* o virus del mosaico del tabaco (del Pozo and Lam 2003) y la MCP inducida por luz UV en *Arabidopsis* (Danon et al. 2004).

Estos estudios también han hecho posible la identificación de varias actividades “caspasa-like” en plantas como por ejemplo, la actividad VEIDasa ó caspasa-6, activada durante el desarrollo de embriones (Bozhkov et al. 2004, Boren et al. 2006), la de enzimas de procesamiento de vacuolas ó caspasa-1, que actúan en la MCP de la respuesta de hipersensibilidad de plantas frente a patógenos (Hatsugai et al. 2004, Rojo et al. 2004), así como la actividad “saspasa”, serin proteasas aspartato específicas (Woltering 2004, Coffeen and Wolpert 2004). Estos trabajos indican que

las actividades “caspasa-like” están implicadas en la progresión de MCP en plantas y forman parte del proceso (Bonneau et al. 2008).

Acoplamiento temporal de localización in situ y actividad enzimática caspasa 3 máxima al inicio de la MCP

En nuestro estudio, la comparación de meristemos radiculares tratados a tiempos cortos con solución salina frente a meristemos sin tratar mostró un incremento en los niveles de actividad enzimática caspasa 3 asociado al proceso de MCP inducido tras el estrés salino aplicado. Estos resultados complementan los datos de las inmunolocalizaciones de caspasa 3 realizadas en trabajos previos de nuestro grupo en este sistema experimental de MCP inducida en meristemos radiculares de *Allium cepa*, donde se localizó esta proteasa (Cortes-Eslava, J et al., 2005).

Asimismo, la determinación de la actividad caspasa 3 en las distintas etapas del desarrollo del tapetum estudiadas, en colza y tabaco, proporcionó un pico de máxima actividad enzimática en la etapa correspondiente a tapetum en MCP temprana de ambas especies.

Trabajos previos en células animales, indican que la activación de la enzima caspasa 3 tiene lugar rápidamente, una vez que se inicia el proceso de MCP (Tyas et al. 2000). Por otro lado, trabajos en otras especies vegetales, indican que la actividad caspasa 3 precede a la degradación de DNA en células en MCP (Lam 2004, Serrano et al. 2010).

La comparación de los resultados de actividad enzimática y de inmunolocalización, indica que los niveles máximos de actividad coinciden con la etapa en la que se detectó una mayor presencia de la enzima en forma activa, lo cual sugiere que una enzima “caspasa 3-like” interviene en las etapas tempranas del proceso de MCP de las células del tapetum, momento en los que las células muestran núcleos lobulados con cromatina muy condensada, pero en los que todavía no se ha producido fragmentación del DNA. Sin embargo, con la progresión del proceso de MCP de las células del tapetum, la presencia y actividad de la enzima disminuye. Asimismo, los

resultados obtenidos en el sistema experimental modelo de *Allium cepa* con tratamientos cortos apoyan esta hipótesis.

Identificación de proteínas tipo caspasa en plantas

La identificación de actividad enzimática caspasa 3 en un nuevo proceso de MCP durante el desarrollo en plantas superiores, como se ha realizado en esta Memoria, aporta nuevas evidencias a la hipótesis de que existan en plantas proteínas con características similares a la enzima caspasa 3 de células animales mediando la MCP en plantas.

Estos datos apoyan la existencia de proteasas necesarias para conducir el proceso de MCP, que rompen sustratos de caspasa y que son inhibidos por inhibidores de caspasas, aunque al no haberse identificado genes homólogos a los de caspasas en ningún genoma vegetal, su existencia en plantas continúa siendo controvertida.

En un principio, se sugirió que la familia de las metacaspasas contiene homólogos funcionales de caspasas (Uren, A. et al, 2000). No obstante, se ha observado que a pesar de que se parecen estructuralmente a caspasas animales, se han identificado en hongos, protozoos y plantas (Woltering 2004, Madeo et al. 2002) y los datos sugieren su implicación en MCP (Madeo et al. 2002, Bozhkov et al. 2004, Vercammen et al. 2004), sin embargo, la caracterización bioquímica muestra que las metacaspasas no rompen sustratos específicos de caspasas (Vercammen et al. 2004, Reape and McCabe 2010, Reape and McCabe 2008).

Nuestros resultados demuestran que las células del tapetum de *Brassica napus* y *Nicotiana tabacum* sufren un proceso de MCP durante su desarrollo a través de una ruta dependiente de proteínas tipo “caspasa-like” con características propias de los procesos de apoptosis en células animales, como retracción citoplásmica, condensación cromatínica y degradación del DNA. No obstante, los mecanismos de la transmisión de la señal de MCP y la naturaleza molecular de la maquinaria apoptótica en la antera, aún no han sido identificados.

5.6.2 Durante la MCP del tapetum en el desarrollo gametofítico aumentan la metilación del DNA y la expresión de la DNA metiltransferasa, *MET1*.

Muchos procesos del desarrollo vegetal, como la floración, la gametogénesis, la respuesta a estrés, son modulados directa o indirectamente por marcas epigenéticas (Feng and Jacobsen 2011). Con objeto de conocer la posible implicación de la metilación del DNA en el proceso de desarrollo y MCP del tapetum, se llevó a cabo la monitorización de los niveles de metilación global del DNA y la expresión de la DNA metiltransferasa, *MET1*, encargada de catalizar la reacción de metilación del DNA, durante el desarrollo y MCP de las células del tapetum.

El estudio realizado en esta Tesis Doctoral, indica que durante el proceso de desarrollo y MCP del tapetum, se produce un aumento de los niveles de metilación global del DNA acompañado de un incremento del patrón de expresión de *MET1*.

Los resultados experimentales obtenidos mediante HPCE, mostraron un incremento progresivo de los niveles de metilación global del DNA durante la progresión de la MCP. Así, la etapa correspondiente al tapetum activo se corresponde con los niveles más bajos de metilación del DNA, mientras que la etapa de tapetum en MCP avanzada muestra los niveles de metilación más altos. Por otro lado, el estudio de expresión del gen *NtMET1* mediante PCR semicuantitativa, reveló un incremento de expresión con el desarrollo y MCP del tapetum, de manera que los valores más altos de expresión, se obtuvieron en la etapa correspondiente a las células de tapetum en MCP avanzada.

En paralelo, los experimentos de FISH, proporcionaron además, la localización de los transcritos de *NtMET1* en el citoplasma de las células del tapetum, observándose diferencias significativas entre cada una de las etapas estudiadas: escasa localización de transcritos en el citoplasma de las células del tapetum activo y un incremento significativo en la etapa correspondiente a tapetum en MCP temprana, en la que se observa una intensa señal de hibridación citoplasmática. En etapas de MCP avanzada, se puede apreciar señal de hibridación no sólo en el tapetum sino también en células somáticas de la pared de la antera. Este incremento de transcritos de *NtMET1* en las

capas de tejido somático de la pared de la antera, podría estar relacionado con los resultados descritos en *Lilium* por (Varnier et al. 2005), que indican que la MCP en la antera se inicia en las células del tapetum y después se extiende a las capas esporofíticas de la antera más externas, incluyendo las capas intermedias, y después de la dehiscencia de la antera, también sufren MCP las células del endotecio y el tejido conectivo.

Nuestros resultados, mostraron por lo tanto, que el proceso de MCP del tapetum transcurre con un incremento de los niveles de expresión del gen *MET1* y de los niveles de metilación global del DNA genómico.

La relación observada entre proceso de MCP del tapetum y los cambios en la metilación global del DNA y la expresión de *MET1*, podrían indicar la existencia de un posible control epigenético del proceso de MCP de las células del tapetum.

El programa de desarrollo de cualquier individuo implica la represión o activación regulada de determinados genes. Se ha sugerido que el proceso de MCP está relacionado con la activación de genes específicos que inducen la senescencia y la muerte celular junto con la inactivación de otros (Vanyushin and Kirnos 1988, Vanyushin and Ashapkin 2011). En este contexto, la metilación del DNA podría actuar como uno de los mecanismos de inactivación y silenciamiento génico durante el desarrollo y MCP de las células del tapetum, sugiriendo un control epigenético del proceso. Por otro lado, (Mazin 2009), sugiere que el proceso de metilación del DNA, es un potente generador de mutaciones que podría inducir daños en el DNA y la desintegración del genoma, hechos que suceden durante la apoptosis celular, el envejecimiento de los organismos y la muerte.

El empleo en este trabajo de un sistema experimental modelo para el estudio de procesos de muerte celular, como los meristemas radiculares de *Allium cepa* tratados con una solución salina como agente inductor de MCP, proporcionó nuevas evidencias que apoyan la posible implicación de la metilación del DNA en el proceso

de MCP. Tras el tratamiento empleado, las células de los meristemos radiculares de *Allium cepa* presentaron características morfológicas propias de etapas tempranas del proceso de MCP. Los resultados experimentales obtenidos mediante HPCE en este sistema modelo, mostraron un incremento en los niveles de metilación global del DNA en los meristemos tratados frente a los meristemos sin tratar. Este dato apoya los resultados obtenidos en el tapetum, sugiriendo que los procesos de MCP en plantas, se acompañan de un incremento de los niveles de metilación global del DNA tanto durante el desarrollo como en sistemas inducidos experimentalmente.

La relación entre metilación del DNA y MCP indicada por primera vez, por los resultados obtenidos en este trabajo, aporta nuevos datos sobre el control epigenético de los procesos de MCP durante el desarrollo e inducida por estrés.

4.1.2 Cambios en la actividad y arquitectura nuclear durante el desarrollo y MCP del tapetum

Hay trabajos que sugieren que la metilación del DNA está directamente implicada en el mantenimiento de la posición cromosómica y la organización funcional a gran escala del núcleo (Espadaa and Esteller 2010). Trabajos recientes, indican que la maquinaria necesaria para establecer los patrones de metilación del DNA en el genoma, es también necesaria para el mantenimiento a gran escala de la organización del compartimento nuclear (Espada and Esteller 2010).

La organización nuclear contribuye de forma substancial a la actividad nuclear, de manera que las modificaciones posicionales o estructurales de dominios cromatínicos de esta organización tienen un efecto directo sobre la función celular, la diferenciación y la transformación (Francastel et al. 2000, Kosak and Groudine 2004, Foster and Bridger 2005, Misteli 2007). La creciente cantidad de datos científicos obtenidos en los últimos años muestra que la organización de la estructura nuclear, cromosómica y del DNA no es un evento al azar en la célula, sino que existe una delicada superestructura de grandes dominios de cromatina, cromosomas y

compartimentos subnucleares que necesitan una fiable, pero dinámica estructura que la controle. Las marcas epigenéticas como la metilación del DNA y la modificación de histonas son excelentes candidatos para asumir este crítico papel. Sin embargo, todavía queda mucho por conocer sobre los mecanismos responsables del establecimiento global de los patrones de metilación del DNA y de su correcta interpretación (Espada and Esteller, 2010).

En plantas, se han descrito cambios de la arquitectura nuclear unidos a cambios en el patrón de metilación del DNA en el desarrollo de meristemos apicales de melocotón (Bitonti et al. 2002), así como también se han revelado cambios en los patrones de metilación global asociados con la reestructuración nuclear durante la diferenciación de células madre embrionarias (Kobayakawa et al. 2007, Bibikova et al. 2008).

Los estudios sobre metilación del DNA realizados en esta Tesis, aportan nuevas evidencias de la relación entre el patrón de distribución de 5mdC en el núcleo y la organización y actividad del mismo.

Los resultados obtenidos mostraron un incremento de los niveles de metilación del DNA durante el desarrollo y MCP del tapetum, además, de un cambio en el patrón de distribución de la señal fluorescente de 5mdC asociado al proceso de MCP. Así, en la etapa de tapetum activo, los residuos metilados en la fibra de cromatina se localizan en masas heterocromáticas discretas o “spots”, ubicados en la proximidad de la envoltura nuclear y el centro del núcleo. Sin embargo, en etapas de MCP más avanzada, la señal de 5mdC se localiza sobre las grandes regiones heterocromáticas que ocupan prácticamente toda la superficie de los núcleos lobulados.

El estudio ultraestructural realizado mostró también una reorganización de la arquitectura nuclear durante la MCP del tapetum, la cual implica una progresiva condensación cromatínica y segregación de estructuras RNPs.

Estos resultados muestran que el cambio en el patrón de metilación del DNA durante el desarrollo y MCP del tapetum, va asociado a una reorganización de la

arquitectura nuclear, sugiriendo el posible control epigenético de esta remodelación estructural.

Marcadores nucleares de síntesis y degradación de RNA

Para complementar los datos obtenidos y su relación en la actividad del núcleo en esta Tesis sobre la metilación del DNA durante el desarrollo y MCP del tapetum, se realizó una estancia en el Laboratorio de “Biología Cellulare” de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Pavía, dirigido por el Profesor Marco Biggiogera, donde se analizaron los cambios en la organización estructural del núcleo y localización *in situ* de elementos de la maquinaria de síntesis, procesamiento y degradación del RNA, como indicadores de la actividad nuclear, durante el proceso de MCP del tapetum.

Estudios previos realizados con células Hela tratadas con actinomicina D, demostraron que la síntesis alterada de rRNA junto con la maduración defectuosa de pre-mRNA eran características del proceso de apoptosis temprana inducida por actinomicina D (Fraschini et al. 2005). Asimismo, otros trabajos, han descrito una disminución de factores de transcripción y de splicing en procesos de hibernación y envejecimiento celular (Frasca et al. 2003, Biggiogera et al. 2008).

El estudio realizado en esta Memoria demuestra que el proceso de MCP del tapetum se acompaña de una alteración de la maquinaria de síntesis y procesamiento de mRNA. Las observaciones ultraestructurales de las células del tapetum, muestran cambios en la presencia y distribución de marcadores nucleares de estos procesos, en relación con cambios en los niveles de actividad transcripcional. Así, los niveles de los marcadores nucleares implicados en la síntesis y el procesamiento de RNA, híbridos DNA:RNA, CstF y poli A, se ven disminuidos durante el desarrollo y MCP del tapetum, frente a aquellos implicados en la degradación de RNA, como RNasa A, que aumentan sus niveles durante el proceso.

A nivel ultraestructural se pueden reconocer tres principales dominios nucleares: cromatina en diferentes grados de condensación, región peri e intercromatínica y nucleolo, cuya organización estructural y funcional cambia drásticamente según el estado de actividad de la célula (González-Melendi et al. 1996, González-Melendi 1996a) El silenciamiento de ciertos genes y la expresión de otros implica un cambio en el estado de actividad que se ve reflejado en la ultraestructura y la organización de los distintos dominios nucleares que cambian durante los procesos de desarrollo y reprogramación celular (Seguí-Simarro 2001). En células eucariotas, los transcritos primarios o pre-mRNAs deben sufrir varios pasos de transformación para generar un RNA mensajero (mRNA) maduro preparado para ser exportado al citoplasma (Malatesta, Zancanaro and Biggiogera 2011). Después de la eliminación de intrones, proceso de “splicing”, se debe completar la maduración del extremo 3’ y esto requiere la implicación de varios factores de rotura y poliadenilación (Wahle and Ruegsegger 1999). Las fibrillas pericromatínicas (FP) son marcadores de actividad nuclear, no sólo para la monitorización de procesos de transcripción y procesamiento de pre-mRNA (Biggiogera et al. 2008), sino también para la identificación del nivel de maduración de transcritos, lo cual mantiene una correlación con el estado metabólico celular (Malatesta et al. 2008).

El anticuerpo anti-híbrido DNA:RNA detecta los híbridos transitorios formados durante la transcripción, proporcionando un marcado en fibrillas pericromatínicas (Testillano, Gorab and Risueño 1994b). Se ha empleado como indicador de actividad transcripcional en diferentes sistemas animales y vegetales (Trentani et al. 2003, Testillano et al. 1995). La secuencia de poli (A) está presente en las moléculas de MRNA maduras (Gray and Wickens 1998), por lo que se asume que la señal observada en el núcleo representa los transcritos recién sintetizados, justo después de su procesamiento, mientras que la señal citoplásmica indica las partículas de MRNA durante la traducción y/o almacenadas en el citoplasma. Por otro lado, CstF (“Cleavage Stimulation Factor”) es un factor esencial para el procesamiento del

extremo 3' del mRNA, ya que interviene en el proceso de poliadenilación o adición de la cola poli A al transcrito primario.

Nuestros resultados, muestran claramente la relación entre la presencia de transcritos poliadenilados y los niveles de CstF registrados durante el desarrollo de las células del tapetum. La disminución de las moléculas de híbridos DNA:RNA, transcritos poliadenilados y de los factores de splicing como CstF en comparación con células transcripcionalmente activas, indican una disminución de dicha actividad transcripcional asociada al proceso de MCP que sufren las células del tapetum.

Durante el proceso de apoptosis, podrían estar implicados fenómenos de degradación de RNA en la restructuración de RNP (Perrin et al. 2004, Hoat et al. 2006). De hecho, hay trabajos que describen una disminución de la cantidad de RNA total en etapas tempranas de MCP en células vegetales (Xu and Hanson 2000). Asimismo, también se ha observado la degradación de mRNA antes de la activación de factores de iniciación dependientes de caspasas (Bushell et al. 2004).

Trabajos anteriores indican la activación de diferentes nucleasas de degradación de RNA, como la RNasa L y endonucleasa G, durante procesos de apoptosis (Bisbal and Silverman 2007), así como también se ha registrado un incremento de la actividad RNasa asociado al proceso de MCP de la senescencia de pétalos en plantas (Panavas and Rubinstein 1998, Xu and Hanson 2000).

Asimismo, con objeto de conocer la posible degradación enzimática de RNAs durante el proceso de MCP del tapetum, en nuestro estudio también se analizó la presencia de RNasa A mediante estudios de inmunolocalización ultraestructural, empleando un anticuerpo específico anti-RNasa A, que reconoce la presencia de RNasa A total.

Los resultados mostraron un incremento de RNasa A durante el desarrollo y MCP del tapetum en las dos especies de estudio, *Brassica napus* y *Nicotiana tabacum*. No

obstante, existen algunas diferencias en cuanto a los tiempos del proceso de desarrollo, ya que en tabaco este incremento en los niveles de RNasa A parece ser más tardío. Este pequeño desfase de tiempo, puede estar relacionado con la diferente maduración del polen de ambas especies, ya que como se indicó anteriormente, el polen de la colza madura en la antera hasta la fase final de formación de las células espermáticas, liberando polen tricelular, mientras que en tabaco, el polen maduro es bicelular. La presencia de RNasa A, no informa directamente de existencia de actividad RNasa, pero si es un buen indicador del estado metabólico de la célula en cuanto a degradación del RNA.

Estos datos sugieren la participación de la RNasa A en la degradación de RNA en etapas tempranas de la MCP del tapetum. Al mismo tiempo estos resultados apoyan la idea de que durante el desarrollo y MCP del tapetum se produce una disminución de la síntesis y procesamiento de MRNA, acompañado de un proceso de degradación masiva de RNA.

Caracterización de HERDS por primera vez en plantas asociado a MCP y marcadores de parada transcripcional

El estudio ultraestructural realizado también reveló la aparición en etapas avanzadas de MCP, de unas estructuras semejantes a las estructuras ectópicas y heterogéneas derivadas de RNP (HERDS) descritas en células animales apoptóticas, que se forman fuera del núcleo como agregados de estructuras RNPs segregadas (Biggiogera and Pellicciari 2000). Estas estructuras, observadas por primera vez en células vegetales, podrían considerarse como marcadores de parada transcripcional, de la misma forma que ocurre en mamíferos.

Durante la apoptosis, la célula sufre retracción y fragmentación en cuerpos apoptóticos como consecuencia de una serie de eventos proteolíticos que tienen lugar casi de forma simultánea en el citoplasma y en el núcleo, al mismo tiempo que se produce una redistribución dinámica de factores proteicos que se mueven desde

regiones de almacenamiento hacía el citoplasma y /o posiciones nucleares (Ferrando-May 2005, Tembe and Henderson 2007).

Los HERDS, estructuras ectópicas y heterogéneas derivadas de RNP, se han propuesto como marcadores de parada transcripcional representando lugares de almacenamiento temporales o terminales para factores proteicos implicados en el procesamiento de RNAs en células animales (Biggiogera and Pellicciari 2000, Biggiogera et al. 2004).

En nuestro estudio, la observación de estructuras similares a HERDS en células del tapetum en MCP avanzada en dos especies de estudio diferentes, también podría indicar el desmantelamiento de la maquinaria de procesamiento de RNA en la célula.

Trabajos anteriores mostraron que la traslocación al citoplasma de ribonucleoproteínas (RNPs) precede a la degradación de DNA y condensación cromatínica, indicando que la reorganización del dominio intercromatínico implica la formación de HERDS, como marcador de apoptosis temprana, que parece tener lugar antes de la activación de caspasas (Schiller et al. 2008). La identificación de estas estructuras similares a HERDS en nuestro estudio, constituye un hallazgo importante, asociado con etapas más avanzadas del proceso de MCP de las células del tapetum, siendo posterior también a la actuación de la enzima caspasa 3.

Por otro lado, el incremento de los niveles de RNasa A detectados en nuestro trabajo, parecen señalar un aumento en la degradación de RNA durante el proceso de MCP del tapetum. Como consecuencia, se produciría una alteración del balance existente en condiciones normales entre la cantidad de RNAs nacientes y la cantidad de proteínas asociadas que son necesarias para su procesamiento.

Hay indicaciones que sugieren que la formación de HERDS podría verse promovida por una degradación temprana de RNAs, teniendo al mismo tiempo, un efecto causal en el bloqueo de la síntesis de proteínas durante la apoptosis (Scovassi et al. 2008).

Trabajos pioneros de nuestro grupo han caracterizado la organización funcional de las estructuras intercromatínicas en células vegetales, proliferantes y en diferenciación, localizando a nivel ultraestructural diferentes elementos de la

maquinaria de transcripción y “splicing” (Testillano et al., 1993, González Melendi 1995 ó 96 Testillano et al., 2000, 2005).

Nuestros resultados aportan nuevos datos sobre la organización estructural y funcional del núcleo durante los procesos de MCP que tienen lugar durante el desarrollo del tapetum.

La localización de HERDS, junto con la existencia de caracteres morfológicos comunes en los procesos de MCP vegetal y apoptosis animal y la existencia de proteasas con actividad caspasa, parecen indicar que se trata de un proceso muy conservado evolutivamente.

Asimismo, los resultados del estudio de los niveles y patrón de metilación del DNA, junto con los resultados sobre marcadores de actividad transcripcional y degradación del RNA durante el desarrollo y MCP del tapetum, establecen una relación entre el patrón de metilación del DNA, la actividad nuclear y la progresión de la MCP.

5.6.3 Cambios en la actividad y arquitectura nuclear durante la diferenciación del polen

Los datos que se aportan en esta Tesis revelan grandes cambios en la metilación del DNA durante la diferenciación del polen y embriogénesis. Por otro lado, también se sabe que el proceso de metilación del DNA forma parte del mecanismo de la remodelación y modificación de la estructura de la cromatina y afecta a la actividad y estructura nuclear (Dyachenko, Shevchuk and Buryanov 2010). Por ello, se han estudiado los cambios en la actividad y arquitectura nuclear durante la diferenciación del polen.

En esta Tesis, se ha analizado la distribución de algunos elementos de la maquinaria de síntesis y procesamiento de transcritos primarios, junto con la de moléculas implicadas en la degradación de RNAs durante el desarrollo del polen, con objeto de determinar y caracterizar la relación entre estos marcadores nucleares, la organización estructural del núcleo y su actividad transcripcional durante el desarrollo del polen.

Existen evidencias que indican que la RNA polimerasa II y la maquinaria de splicing están acoplados tanto física como funcionalmente (Misteli 2000, Zorio and Bentley 2004, Kornblihtt et al. 2004, Belostotsky and Rose 2005). La coordinación y conexión molecular de estos dos procesos nucleares esenciales, se refleja en la organización espacial de la maquinaria de transcripción y de splicing en el núcleo celular, ya que cambios a nivel de transcripción provocan cambios en la redistribución de los factores de procesamiento (Carmofonseca et al. 1992, Misteli 2000). Sin embargo, la mayor parte de los estudios de la distribución espacial de los factores de procesamiento en relación con la actividad transcripcional de la célula proceden de células animales, existiendo muy pocos datos disponibles en células vegetales.

Los granos de polen representan un modelo excepcional y muy conveniente para el estudio de la transcripción y el almacén de transcritos maduros desde la microspora hasta el polen maduro. Sin embargo, hay muy poca información sobre la organización espacial de la maquinaria de procesamiento de RNA en el polen. Mediante el empleo de técnicas de inmunofluorescencia e inmunomarcados con oro, nuestro grupo mostró por primera vez, la presencia y distribución de snRNPs en el núcleo de la microspora de *Capsicum annum* (Testillano et al. 1995). En el núcleo de la microspora de *Brassica napus*, la proteína de splicing Sm, se localizó uniformemente en el nucleoplasma así como altamente concentrada en los cuerpos de Cajal (Straatman and Schel 2001). (Seguí-Simarro et al. 2006), observaron un incremento en la presencia de cuerpos de Cajal mediante inmunodetección con anti-TMG, anticuerpo frente a la trimetilguanosa de los snRNAs, en células proliferantes transcripcionalmente activas durante el desarrollo de embriogénesis en *Brassica napus* y *Capsicum annum*. Estudios previos del grupo mostraron que la activación de procesos de proliferación, provocaba cambios en la redistribución de moléculas de señalización del dominio intercromatínico (Testillano et al. 2005). Por otro lado, (Fang, Hearn and Spector 2004) detectó la presencia de proteínas SR en el polen tricelular de *Arabidopsis thaliana* en los dos núcleos espermáticos. Más recientemente,

se ha analizado la distribución de TMG (snRNAs), Sm y proteínas SR (Zienkiewicz et al. 2008a), así como de RNA polimerasa II y transcritos poliadenilados durante el desarrollo del polen en *H.orientalis*, demostrando una disminución progresiva de los mismos con el proceso de diferenciación (Zienkiewicz et al. 2008b).

Los cambios detectados en la presencia y distribución de los diversos marcadores nucleares empleados en nuestro estudio, sugieren modificaciones sustanciales en la actividad transcripcional durante la maduración del polen de *Nicotiana tabacum* y *Brassica napus*. Así, los niveles de los marcadores nucleares implicados en el procesamiento y síntesis de RNA como híbridos DNA:RNA (Testillano et al., 1991), CstF (Cardinale et al. 2007) y transcritos poliadenilados (Zienkiewicz, Smolinski and Bednarska 2006), disminuyen durante el desarrollo y maduración del polen, a la vez que disminuyen los niveles de RNasa A (Biggiogera M, 2009), enzima que actúa de forma fisiológica en células metabólicamente activas como parte de la maquinaria que degrada RNAs defectuosos o cuya vida útil en la célula ha terminado. El anticuerpo anti-híbrido, marca el RNA recién transcrito antes de separarse del molde de DNA, representando lugares de transcripción, mientras que el marcado de CstF representa los lugares de procesamiento de MRNA.

En la primera fase analizada, la fase de microspora vacuolada, el patrón de la cromatina es bastante descondensado, con una abundante región intercromatínica muy rica en estructuras fibrillogranulares. Esta organización está relacionada con una alta actividad transcripcional (Bachelierie, Puvion and Zalta 1975)(Bachelierie *et al.*, 1975; Testillano *et al.*, 1995b). En esta etapa del desarrollo del polen, nuestros resultados muestran un marcado específico con los anticuerpos anti-híbrido DNA:RNA y anti-CstF, en la periferia de masas de cromatina condensada y fibrillas pericromatínicas, señalando los lugares que albergan RNAs recién transcritos en distintos estados de procesamiento. Los elevados niveles detectados de estos antígenos nucleares, se relaciona de forma positiva con la elevada actividad transcripcional de estas células.

La fase de microspora vacuolada ha sido descrita como de alta actividad transcripcional en pimiento y tabaco, mediante marcadores como el anti-híbrido, entre otros (González-Melendi 1996b, González-Melendi et al. 1996). Asimismo, en la hibridación *in situ* con Poli d(T), se observó una señal de hibridación específica en el núcleo, localizada en fibrillas pericromatínicas y en regiones ricas en ribosomas del citoplasma. Esta presencia de transcritos poliadenilados en el núcleo y citoplasma de la microspora vacuolada, está señalando que los mRNAs sintetizados en el núcleo y que son activamente exportados al citoplasma. Trabajos anteriores, mostraron altos niveles de síntesis de RNA acompañado de un alto grado de descondensación cromatínica en la microspora vacuolada de *H.orientalis* (Zienkiewicz et al. 2008a). Asimismo, trabajos previos de localización de transcritos poliadenilados en esta misma especie indicaron una elevada presencia de los mismos en esta etapa (Zienkiewicz et al. 2008b).

Cuando progresa el desarrollo, la microspora vacuolada divide y ya en etapas más avanzadas como el polen bicelular, los núcleos presentan una diferente organización nuclear, que también se refleja en la organización de la región intercromatínica.

Estudios anteriores del grupo realizados en pimiento y tabaco, mostraron un cambio progresivo en la organización estructural del núcleo generativo del grano de polen durante su maduración hacia un mayor grado de condensación cromatínica y una disminución de estructuras fibrilogramulares (González-Melendi et al. 1996, Coronado 2002).

Nuestros resultados en el núcleo generativo del grano de polen durante las etapas maduras del polen bicelular de *Brassica napus*, tras la separación de la célula generativa de la pared del polen, solo revelan algunos pequeños gránulos pericromatínicos, los cuales se han relacionado con el almacenamiento y transporte de RNA heterogéneo y pre-mRNA, en estados de baja actividad, aumentando su número en núcleos en los que se ha bloqueado el procesamiento y por tanto el transporte de RNAs mensajero al citoplasma (Fakan and Puvion, 1980b; Puvion et al., 1984; Puvion-Dutilleul et al., 1981).

En el núcleo vegetativo del polen bicelular, nuestros resultados muestran una drástica disminución del marcado con anti-híbrido DNA:RNA, y anti-CstF, indicativo de una significativa disminución de la síntesis de RNA y de los procesos de maduración de MRNA en el núcleo vegetativo del polen bicelular maduro. Sin embargo, los niveles de RNA poliadenilado en el núcleo vegetativo no se ven muy afectados en esta fase. Según (Zienkiewicz et al. 2006) los transcritos poliadenilados del polen bicelular de la especie *H.orientalis* serán empleados como transcritos maduros de reserva almacenados en el citoplasma de la célula vegetativa para la síntesis de proteínas implicadas en, al menos, las primeras etapas del desarrollo del tubo polínico.

Análisis de microarrays de *Arabidopsis thaliana* revelaron que el transcriptoma del polen maduro se caracteriza por mRNAs que codifican proteínas implicadas en el metabolismo de la pared celular, citoesqueleto, transducción de señal y ciclo celular (Becker et al. 2003, Honys and Twell 2003, Honys and Twell 2004, Pina et al. 2005).

La disminución de la actividad transcripcional en ambas células del polen maduro, se ha observado en otras especies angiospermas (Mascarenhas 1975, Tupy et al. 1983, Bednarska 1984). Se ha propuesto que esta inhibición de la síntesis de RNA está positivamente relacionada con la condensación cromatínica (Bednarska and Gorskabrylass 1987). Zienkiewicz et al. (2008a) observaron que en la etapa final de maduración del grano de polen de *H.orientalis*, se produce una fuerte disminución de snRNAs marcados con TMG, proteínas Sm y SC35, después de la separación de la célula generativa del esporoderma, en relación con el silenciamiento transcripcional de esta etapa (Zienkiewicz et al. 2008a).

Recientemente, (Honys and Twell 2004) utilizando tecnología de microarrays mostraron también una significativa disminución en el número mRNAs codificantes de proteínas durante las etapas finales del desarrollo del polen de *Arabidopsis*, en comparación con lo observado en el polen joven.

Nuestros resultados mostraron además una disminución de RNasa A durante el desarrollo gametofítico del polen de *Brassica napus* asociada a la disminución de la actividad transcripcional que acompaña al proceso de maduración del grano de polen.

En las dos etapas del desarrollo estudiadas se detectaron partículas de oro con anti-RNasa A en núcleo, localizándose principalmente en la periferia de las masas de cromatina condensada y en el citoplasma, con marcado abundante en la etapa de microspora vacuolada, apreciándose las partículas de oro dispersas en zonas ricas en ribosomas. Sin embargo, en la etapa de polen bicelular, se apreció una disminución en el marcado citoplásmico, mientras que el marcado en núcleo se mantuvo con respecto a la etapa anterior. En tabaco, las diferencias en los niveles de RNasa A durante la maduración del polen fueron mucho menores. Al igual que en la colza, se observaron partículas de oro en núcleo y citoplasma, siendo la presencia de estas más abundante en el citoplasma.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que la disminución de la síntesis de RNA y de su procesamiento conlleva a su vez una disminución de los niveles de RNasa A, posiblemente debido a que en esta situación de baja actividad transcripcional, la célula necesita degradar menores cantidades de RNA.

Comparando estos datos con los resultados obtenidos sobre la metilación del DNA, parece que el incremento de los niveles de metilación registrados en este estudio durante la maduración del polen, podrían relacionarse con la disminución de la actividad transcripcional.

Babbar SB, Agarwal PK, Sahay S, Bhojwani SS (2004) Isolated microspore culture of Brassica: An experimental tool for developmental studies and crop improvement. *Indian Journal of Biotechnology* 3: 185-202

Raghavan V (2001) Life and times of the suspensor of angiosperm embryos. *Trends in Plant Science Phytomorphology Golden Jubilee Issue*: 251–276

Zhang G, Zhang D, Tang G, He Y, Zhou W (2006) Plant development from microspore-derived embryos in oilseed rape as affected by chilling, desiccation and cotyledon excision. *Biologia Plantarum* 50: 180-186

V. Raghavan, *Embryogenesis in Angiosperms*, Cambridge University Press, Cambridge, London, NY, 1986.

V. Raghavan, *Developmental Biology of Flowering Plants*, Springer-Verlag, New York, 2000.

G. Hause, B. Hause, *Induction of embryogenesis in isolated microspores and pollen of Brassica napus L.* PhD thesis, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, 1996.

Coventy, J.;Kott, L.; Beversdorf, W. D. *Manual for microspore culture technique for Brassica napus*. Dep. Crop Sci. Technol. Bull. OAC Publication 0489; Guelph, Ontario, Canada: University of Guelph; 1988.

Ramírez C, Testillano PS, Risueño MC. 2003a. Differential pectin distribution during cell wall formation in root meristems. In: Mistrik I, ed. *Plant development and adaptation to stress. Proceedings of the 6th International Symposium on Structure and Function of Roots*. Bratislava: Slovak Academy of Sciences 27.

Raghavan V. 2000. Developmental biology of flowering plants. Springer-Verlag.

Chen Z (1985) A study on induction of plants from Citrus pollen.

Fruit Var J 39:44–50

Hidaka T, Yamada Y, Shichijo T (1979) *In vitro* differentiation of haploid plants by anther culture in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Jpn J Breed 29:248–254.

Hidaka T, Yamada Y, Shichijo T (1981) Plantlet formation from anthers of *Citrus aurantium* L.. Proc Int Soc Citriculture 1:153–155.

Heberle-Bors E (1989) Isolated pollen culture in tobacco: plant reproductive development in a nutshell. Sex Plant Reprod 2:1–10

IX Congresso Luso-Espanhol de Fisiologia Vegetal, Evora, Portugal, 18-21 de Septiembre 2005. Salt stress-induced apoptosis in proliferating root meristems: expression of caspase 3-like proteins and nuclear changes. CORTÉS-ESLAVA J, TESTILLANO PS, GÓMEZ-ARROYO S, RISUEÑO MC.

V Congreso de la Sociedad Española de Biología del Desarrollo (VCSEBD), 21-23 de septiembre de 2006, Alicante. Cambios apoptóticos y expresión de “caspasa-3-like” en la muerte celular del tapetum durante el desarrollo del polen. CHAKRABARTI N., CORTÉS-ESLAVA J., RODRÍGUEZ-HUETE A., TESTILLANO P.S., RISUEÑO M.C.

Sunderland N, Dunwell JM (1977) Anther and pollen culture. In: Street HE (ed) Plant tissue and cell culture. Oxford, Blackwell, pp 223–265

Keller WA, Stringham GR (1978) Production and utilization of microspore derived plants. In: Thorpe TA (ed) *Frontiers of plant tissue culture*. Calgary University Press, Calgary, pp 113–122

Deepak Prem, María-Teresa Solís, María C. Risueño, Pilar S. Testillano (2011). “A new microspore embryogenesis system which mimics zygotic embryogenesis initials and efficiently regenerates doubled-haploid plants in *Brassica napus*”(enviado)

B.F. Vanyushin, V.V. Ashapkin, DNA methylation in higher plants: Past, present and future, *Biochim. Biophys. Acta* (2011), doi:10.1016/j.bbagr.2011.04.006

Dafni, A, Hesse, M, and Pacini, E (2000). "Pollen and pollination," Springer, New York.

Fadón, B. (1993). Estudio ultraestructural y detección *in situ* de macromoléculas durante el desarrollo del polen de *Capsicum annuum* L. en relación con el proceso de inducción de la androgénesis. *Tesis Doctoral Univ Compl Madrid*1-377.

XIII Congress of the Spanish Society for Cell Biology (SEBC), 16-18 de Diciembre de 2009, Murcia. “Changes in transcriptional activity induce alterations in the nuclear functional architecture”. Biggiogera M.

Barany I. Begoña Fadón, María C. Risueño and Pilar S. Testillano (2010b). Microspore reprogramming to embryogenesis induces changes in cell wall and starch accumulation dynamics associated with proliferation and differentiation events. Short Communication. *Plant Signaling & Behavior*, 5:4.

Rodríguez-Serrano M, Bárány I, Prem D, Coronado MJ, Risueño MC, Testillano PS (2011). NO, ROS and cell death associated with caspase-like activity increase in stress-induced microspore embryogenesis of barley. *Journal Experimental Botany*, Aceptado, In press.

Raghavan V (2001) Life and times of the suspensor of angiosperm embryos. Trends in Plant Science Phytomorphology Golden Jubilee Issue: 251–276

Reinert J, Bajaj YPS (1977) Anther culture: haploid production and its significance. In: Reinert J, Bajaj YPS (eds) Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer, Berlin, pp 251–267.

Hause, G. and Hause, B. Induction of embryogenesis in isolated microspores and pollen of *Brassica napus* L. 1996. Wageningen Agricultural University, Wageningen, T Netherlands. Thesis/Dissertation.

McCormick, S., Twell, D., Vancanneyt, G., and Yamaguchi, J. (1991). Molecular analysis of gene regulations and function during male gametophyte development. In "Molecular Biology of Plant Development" (G. I. Jenkins and W. Schuch, Eds.), pp. 229-244, Company of Biologists, London.

Risueño, M. C. (1990). Pollen biology: structure and function. In "Polen, esporas y sus aplicaciones" (G. Blanca, M. Garrido, d. I. G. Diaz, M. C. Fernández, M. I. Rodríguez-García, and G. í. Romero, Eds.), pp. 31-41, Universidad de Granada, Granada. España.

Testillano, P. S. and Risueño, M. C. (1998). Hibridación in situ a nivel ultraestructural (con ribosondas marcadas no radiactivamente) para localizar genes y ARNs. In "Manual de Técnicas de microscopía electrónica (M.E.T.). Aplicaciones biológicas." (J. Renau-Piqueras and L. Megías, Eds.), pp. 319-338, Universidad de Granada, Granada.

Testillano, P. S., González-Melendi, P., Fadón, B., Sánchez-Pina, M. A., Olmedilla, A., and Risueño, M. C. (1993a). Immunolocalization of nuclear antigens and ultrastructural cytochemistry on tapetal cells of *Scilla peruviana* and *Capsicum annuum*. *Pl Syst Evol suppl.* 7:75-90.

Fakan, S. and Puvion, E. (1980a). The ultrastructural visualization of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and distribution. *Int Rev Cytol* **65**:255-299.

Risueño, M. C. and Medina, F. J. (1986b). The nucleolar structure in plant cells. *Cell Biol Rev* **7**:1-140.

- Abid, G., Y. Muhoviski, J. M. Jacquemin, D. Mingeot, K. Sassi, A. Toussaint & J. P. Baudoin (2011) Changes in DNA-methylation during zygotic embryogenesis in interspecific hybrids of beans (*Phaseolus* spp.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 105, 383-393.
- Anandarajah, K., L. Kott, W. D. Beversdorf & B. D. McKersie (1991) INDUCTION OF DESICCATION TOLERANCE IN MICROSPORE-DERIVED EMBRYOS OF BRASSICA-NAPUS L BY THERMAL-STRESS. *Plant Science*, 77, 119-123.
- Atanassov, A., N. Zagorska, P. Boyadjiev & D. Djilianov (1995) IN-VITRO PRODUCTION OF HAPLOID PLANTS. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11, 400-408.
- Aya, K., M. Ueguchi-Tanaka, M. Kondo, K. Hamada, K. Yano, M. Nishimura & M. Matsuoka (2009) Gibberellin Modulates Anther Development in Rice via the Transcriptional Regulation of GAMYB. *Plant Cell*, 21, 1453-1472.
- Babbar SB, A. P., Sahay S, Bhojwani SS. 2004. Isolated microspore culture of Brassica: An experimental tool for developmental studies and crop improvement. ed. I. J. o. Biotechnology. Indian Journal of Biotechnology 3.
- Back, F. (1976) VARIABLE CONDITION OF EUCHROMATIN AND HETEROCHROMATIN. *International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology*, 45, 25-64.
- Bachellerie, J. P., E. Puvion & J. P. Zalta (1975) ULTRASTRUCTURAL ORGANIZATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF CHROMATIN-RNA-PROTEIN COMPLEXES ISOLATED FROM MAMMALIAN-CELL NUCLEI. *European Journal of Biochemistry*, 58, 327-337.
- Bajaj, Y. P. S. (1977) SURVIVAL OF ATROPA AND NICOTIANA POLLEN-EMBRYOS FROZEN AT -196DEGREESC. *Current Science*, 46, 305-307.
- (1990) CRYOPRESERVATION OF GERMPLASM OF VEGETATIVELY PROPAGATED CROPS. *Bulletin De La Societe Botanique De France-Actualites Botaniques*, 137, 99-114.
- Barany, I., B. Fadon, M. C. Risueño & P. S. Testillano (2010a) Cell wall components and pectin esterification levels as markers of proliferation and differentiation events during pollen development and pollen embryogenesis in *Capsicum annuum* L. *Journal of Experimental Botany*, 61, 1159-1175.
- Barany, I., P. Gonzalez-Melendi, B. Fadon, J. Mityko, M. C. Risueño & P. S. Testillano (2005) Microspore-derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.): subcellular rearrangements through development. *Biology of the Cell*, 97, 709-722.
- Baroux, C., M. T. Raissig & U. Grossniklaus (2011) Epigenetic regulation and reprogramming during gamete formation in plants. *Current Opinion in Genetics & Development*, 21, 124-133.
- Becker, J. D., L. C. Boavida, J. Carneiro, M. Haury & J. A. Feijo (2003) Transcriptional profiling of *Arabidopsis* tissues reveals the unique characteristics of the pollen transcriptome. *Plant Physiology*, 133, 713-725.

- Bedinger, P. (1992) THE REMARKABLE BIOLOGY OF POLLEN. *Plant Cell*, 4, 879-887.
- Bednarska, E. (1984) ULTRASTRUCTURAL AND METABOLIC TRANSFORMATIONS OF DIFFERENTIATING HYACINTHUS-ORIENTALIS L POLLEN GRAIN CELLS .1. RNA AND PROTEIN-SYNTHESIS. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 53, 145-&.
- Bednarska, E. & A. Gorskabrylass (1987) ULTRASTRUCTURAL TRANSFORMATIONS OF NUCLEI IN DIFFERENTIATING HYACINTHUS-ORIENTALIS L POLLEN GRAIN CELLS. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 56, 667-685.
- Belostotsky, D. A. & A. B. Rose (2005) Plant gene expression in the age of systems biology: integrating transcriptional and post-transcriptional events. *Trends in Plant Science*, 10, 347-353.
- Benedito, V. A., I. Torres-Jerez, J. D. Murray, A. Andriankaja, S. Allen, K. Kakar, M. Wandrey, J. Verdier, H. Zuber, T. Ott, S. Moreau, A. Niebel, T. Frickey, G. Weiller, J. He, X. Dai, P. X. Zhao, Y. Tang & M. K. Udvardi (2008) A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Journal*, 55, 504-513.
- Bibikova, M., L. C. Laurent, B. Ren, J. F. Loring & J.-B. Fan (2008) Unraveling epigenetic regulation in embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2, 123-134.
- Biggiogera, M., M. G. Bottone, A. I. Scovassi, C. Soldani, L. Vecchio & C. Pellicciari (2004) Rearrangement of nuclear ribonucleoprotein (RNP)-containing structures during apoptosis and transcriptional arrest. *Biology of the Cell*, 96, 603-615.
- Biggiogera, M., B. Cisterna, A. Spedito, L. Vecchio & M. Malatesta (2008) Perichromatin fibrils as early markers of transcriptional alterations. *Differentiation*, 76, 57-65.
- Biggiogera, M. & C. Pellicciari (2000) Heterogeneous ectopic RNP-derived structures (HERDS) are markers of transcriptional arrest. *Faseb Journal*, 14, 828-834.
- Bisbal, C. & R. H. Silverman (2007) Diverse functions of RNase L and implications in pathology. *Biochimie*, 89, 789-798.
- Bitonti, M. B., R. Cozza, A. Chiappetta, D. Giannino, M. R. Castiglione, W. Dewitte, D. Mariotti, H. Van Onckelen & A. M. Innocenti (2002) Distinct nuclear organization, DNA methylation pattern and cytokinin distribution mark juvenile, juvenile-like and adult vegetative apical meristems in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Journal of Experimental Botany*, 53, 1047-1054.
- Bonneau, L., Y. Ge, G. E. Drury & P. Gallois (2008) What happened to plant caspases? *Journal of Experimental Botany*, 59, 491-499.
- Boren, M., A.-S. Hoglund, P. Bozhkov & C. Jansson (2006) Developmental regulation of a VEIDase caspase-like proteolytic activity in barley caryopsis. *Journal of Experimental Botany*, 57, 3747-3753.
- Bosch, M., A. Y. Cheung & P. K. Hepler (2005) Pectin methylesterase, a regulator of pollen tube growth. *Plant Physiology*, 138, 1334-1346.

- Bosch, M. & V. E. Franklin-Tong (2007) Temporal and spatial activation of caspase-like enzymes induced by self-incompatibility in *Papaver* pollen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 18327-18332.
- Bosch, M. & P. K. Hepler (2005) Pectin methylesterases and pectin dynamics in pollen tubes. *Plant Cell*, 17, 3219-3226.
- Bozhkov, P. V., L. H. Filonova, M. F. Suarez, A. Helmersson, A. P. Smertenko, B. Zhivotovsky & S. von Arnold (2004) VEIDase is a principal caspase-like activity involved in plant programmed cell death and essential for embryonic pattern formation. *Cell Death and Differentiation*, 11, 175-182.
- Bueno, M. A., A. Gomez, F. Sepulveda, J. M. Segui, P. S. Testillano, J. A. Manzanera & M. C. Risueño (2003) Microspore-derived embryos from *Quercus suber* anthers mimic zygotic embryos and maintain haploidy in long-term anther culture. *Journal of Plant Physiology*, 160, 953-960.
- Bueno, M. A., B. Pintos, M. Hofer & A. Martin (2005) Pro-embryos induction from *Olea europaea* L. isolated microspore culture. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27, 695-701.
- Burgess, J. (1970) CELL SHAPE AND MITOTIC SPINDLE FORMATION IN GENERATIVE CELL OF ENDYMION-NON-SCRIPTUS. *Planta*, 95, 72-&.
- Bushell, M., M. Stoneley, P. Sarnow & A. E. Willis (2004) Translation inhibition during the induction of apoptosis: RNA or protein degradation? *Biochemical Society Transactions*, 32, 606-610.
- Cardinale, S., B. Cisterna, P. Bonetti, C. Aringhieri, M. Biggiogera & S. M. L. Barabino (2007) Subnuclear localization and dynamics of the pre-mRNA 3' end processing factor mammalian cleavage factor I 68-kDa subunit. *Molecular Biology of the Cell*, 18, 1282-1292.
- Carmofonseca, M., R. Pepperkok, M. T. Carvalho & A. I. Lamond (1992) TRANSCRIPTION-DEPENDENT COLOCALIZATION OF THE U1, U2, U4/U6, AND U5 SNRNPS IN COILED BODIES. *Journal of Cell Biology*, 117, 1-14.
- Catoire, L., M. Pierron, C. Morvan, C. H. du Penhoat & R. Goldberg (1998) Investigation of the action patterns of pectinmethylesterase isoforms through kinetic analyses and NMR spectroscopy - Implications in cell wall expansion. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 33150-33156.
- Coffeen, W. C. & T. J. Wolpert (2004) Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa*. *Plant Cell*, 16, 857-873.
- Cordewener, J. H. G., G. Hause, E. Gorgen, R. Busink, B. Hause, H. J. M. Dons, A. A. M. Vanlammeren, M. M. V. Campagne & P. Pechan (1995) CHANGES IN SYNTHESIS AND LOCALIZATION OF MEMBERS OF THE 70-KDA CLASS OF HEAT-SHOCK PROTEINS ACCOMPANY THE INDUCTION OF EMBRYOGENESIS IN BRASSICA-NAPUS L MICROSPORES. *Planta*, 196, 747-755.

- Coronado, M. 2002. Desarrollo y embriogénesis del polen en *Nicotiana tabacum* L: localización y expresión in situ de proteínas implicadas en la transducción de señales. Universidad Complutense de Madrid.
- Costa, S. & P. Shaw (2006) Chromatin organization and cell fate switch respond to positional information in *Arabidopsis*. *Nature*, 439, 493-496.
- Costa, S. & P. Shaw (2007) 'Open minded' cells: how cells can change fate. *Trends in Cell Biology*, 17, 101-106.
- Coventy, J., Kott, L., Beversdorf, W.D. 1988. Manual formicrospore culture technique for *Brassica napus*. In *Dep. Crop Sci. Technol. Bull.* Guelph, Ontario, Canada: University of Guelph.
- Custers, J. B. M., J. H. G. Cordewener, Y. Nollen, H. J. M. Dons & M. M. V. Campagne (1994) TEMPERATURE CONTROLS BOTH GAMETOPHYTIC AND SPOROPHYTIC DEVELOPMENT IN MICROSPORE CULTURES OF BRASSICA-NAPUS. *Plant Cell Reports*, 13, 267-271.
- Chan, S. W. L., I. R. Henderson & S. E. Jacobsen (2005) Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics*, 6, 351-360.
- Charne, D. G. & W. D. Beversdorf (1988) IMPROVING MICROSPORE CULTURE AS A RAPESEED BREEDING TOOL - THE USE OF AUXINS AND CYTOKININS IN AN INDUCTION MEDIUM. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, 66, 1671-1675.
- Chen, J. L. & W. D. Beversdorf (1992) CRYOPRESERVATION OF ISOLATED MICROSPORES OF SPRING RAPESEED (*BRASSICA-NAPUS* L) FOR INVITRO EMBRYO PRODUCTION. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 31, 141-149.
- Chinnusamy, V. & J.-K. Zhu (2009) RNA-directed DNA methylation and demethylation in plants. *Science in China Series C-Life Sciences*, 52, 331-343.
- Chuong, P. V., C. Deslauriers, L. S. Kott & W. D. Beversdorf (1988) EFFECTS OF DONOR GENOTYPE AND BUD SAMPLING ON MICROSPORE CULTURE OF BRASSICA-NAPUS. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, 66, 1653-1657.
- Chupeau, Y., Caboche, M., and Henry, Y. 1998. "Androgenesis and haploid plants,.". Heidelberg: Springer-Verlag.
- Dahleen, L. S. (1999) Donor-plant environment Effects on regeneration from barley embryo-derived callus. *Crop Science*, 39, 682-685.
- Danon, A., V. I. Rotari, A. Gordon, N. Mailhac & P. Gallois (2004) Ultraviolet-C overexposure induces programmed cell death in *Arabidopsis*, which is mediated by caspase-like activities and which can be suppressed by caspase inhibitors, p35 and Defender against Apoptotic Death. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 779-787.
- Datta, S. K. (2005) Androgenic haploids: Factors controlling development and its application in crop improvement. *Current Science*, 89, 1870-1878.
- del Pozo, O. & E. Lam (2003) Expression of the baculovirus p35 protein in tobacco affects cell death progression and compromises N gene-mediated disease

- resistance response to tobacco mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16, 485-494.
- Dolan, L., P. Linstead & K. Roberts (1997) Developmental regulation of pectic polysaccharides in the root meristem of *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 48, 713-720.
- Dubois, T., M. Guedira, J. Dubois & J. Vasseur (1991) DIRECT SOMATIC EMBRYOGENESIS IN LEAVES OF CICHORIUM - A HISTOLOGICAL AND SEM STUDY OF EARLY STAGES. *Protoplasma*, 162, 120-127.
- Dunwell, J. M. (2010) Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnology Journal*, 377-424.
- Dunwell, J. M., M. Cornish & A. G. L. Decourcel (1985) INFLUENCE OF GENOTYPE, PLANT-GROWTH TEMPERATURE AND ANTHHER INCUBATION-TEMPERATURE ON MICROSPORE EMBRYO PRODUCTION IN BRASSICA-NAPUS SSP OLEIFERA. *Journal of Experimental Botany*, 36, 679-689.
- Dunwell, J. M. & N. Thurling (1985) ROLE OF SUCROSE IN MICROSPORE EMBRYO PRODUCTION IN BRASSICA-NAPUS SSP OLEIFERA. *Journal of Experimental Botany*, 36, 1478-1491.
- Dyachenko, O. V., T. V. Shevchuk & Y. I. Buryanov (2010) Structural and functional features of the 5-methylcytosine distribution in the eukaryotic genome. *Molecular Biology*, 44, 171-185.
- Espadaa, J. & M. Esteller (2010) DNA methylation and the functional organization of the nuclear compartment. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21, 238-246.
- Exner, V. & L. Hennig (2008) Chromatin rearrangements in development. *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 64-69.
- Fan, Z., K. C. Armstrong & W. A. Keller (1988) DEVELOPMENT OF MICROSPORES INVIVO AND INVITRO IN BRASSICA-NAPUS L. *Protoplasma*, 147, 191-199.
- Fang, Y. D., S. Hearn & D. L. Spector (2004) Tissue-specific expression and dynamic organization of SR splicing factors in *Arabidopsis*. *Molecular Biology of the Cell*, 15, 2664-2673.
- Feng, S. H. & S. E. Jacobsen (2011) Epigenetic modifications in plants: an evolutionary perspective. *Current Opinion in Plant Biology*, 14, 179-186.
- Ferrando-May, E. (2005) Nucleocytoplasmic transport in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 12, 1263-1276.
- Ferrie, A. M. R. & K. L. Caswell (2011) Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 104, 301-309.
- FitzGerald, J., M. Luo, A. Chaudhury & F. Berger (2008) DNA Methylation Causes Predominant Maternal Controls of Plant Embryo Growth. *Plos One*, 3.
- Foroughiwehr, B., G. Mix, H. Gaul & H. M. Wilson (1976) Plant production from cultured anthers of *Hordeum-Vulgare-L.* *Zeitschrift Fur Pflanzenzuchtung-Journal of Plant Breeding*, 77, 198-204.

- Fortes, A. M., P. S. Testillano, M. D. Risueño & M. S. Pais (2002) Studies on callose and cutin during the expression of competence and determination for organogenic nodule formation from internodes of *Humulus lupulus* var. Nugget. *Physiologia Plantarum*, 116, 113-120.
- Foster, H. A. & J. M. Bridger (2005) The genome and the nucleus: a marriage made by evolution - Genome organisation and nuclear architecture. *Chromosoma*, 114, 212-229.
- Francastel, C., D. Schubeler, D. I. K. Martin & M. Groudine (2000) Nuclear compartmentalization and gene activity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1, 137-143.
- Franchi, G. G., L. Bellani, M. Nepi & E. Pacini (1996) Types of carbohydrate reserves in pollen: Localization, systematic distribution and ecophysiological significance. *Flora*, 191, 143-159.
- Frasca, D., D. Nguyen, R. L. Riley & B. B. Blomberg (2003) Decreased E12 and/or E47 transcription factor activity in the bone marrow as well as in the spleen of aged mice. *Journal of Immunology*, 170, 719-726.
- Fraschini, A., M. G. Bottone, A. I. Scovassi, M. Denegri, M. C. Risueño, P. S. Testillano, T. E. Martin, M. Biggiogera & C. Pellicciari (2005) Changes in extranucleolar transcription during actinomycin D-induced apoptosis. *Histology and Histopathology*, 20, 107-117.
- Fry, S. C., S. Aldington, P. R. Hetherington & J. Aitken (1993) OLIGOSACCHARIDES AS SIGNALS AND SUBSTRATES IN THE PLANT-CELL WALL. *Plant Physiology*, 103, 1-5.
- Galbraith, D. W. (1981) MICROFLUORIMETRIC QUANTITATION OF CELLULOSE BIOSYNTHESIS BY PLANT-PROTOPLASTS USING CALCOFLUOR WHITE. *Physiologia Plantarum*, 53, 111-116.
- Germana, M. A. (2011) Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 104, 283-300.
- Gland, A., R. Lichter & H. G. Schweiger (1988) GENETIC AND EXOGENOUS FACTORS AFFECTING EMBRYOGENESIS IN ISOLATED MICROSPORE CULTURES OF BRASSICA-NAPUS L. *Journal of Plant Physiology*, 132, 613-617.
- Goldberg, R., C. Morvan & J. C. Roland (1986) COMPOSITION, PROPERTIES AND LOCALIZATION OF PECTINS IN YOUNG AND MATURE CELLS OF THE MUNG BEAN HYPOCOTYL. *Plant and Cell Physiology*, 27, 417-429.
- González-Melendi, P. 1996a. Caracterización in situ mediante sondas moleculares del proceso de inducción de embriogénesis del polen en *Capsicum annum* L. Universidad Complutense de Madrid.
- . 1996b. Caracterización in situ mediante sondas moleculares del proceso de inducción de embriogénesis del polen en *Capsicum annum* L. Universidad Complutense de Madrid.
- Gonzalez-Melendi, P., P. S. Testillano, C. G. Mena, S. Muller, I. Raska & M. C. Risueño (1998) Histones and DNA ultrastructural distribution in plant cell

- nucleus: A combination of immunogold and cytochemical methods. *Experimental Cell Research*, 242, 45-59.
- González-Melendi, P., P. S. Testillano, P. Ahmadian, B. Fadon & M. C. Risueño (1996) New in situ approaches to study the induction of pollen embryogenesis in *Capsicum annuum* L. *European Journal of Cell Biology*, 69, 373-386.
- González-Melendi, P., P. S. Testillano, P. Ahmadian, B. Fadon, O. Vicente & M. C. Risueño (1995) IN-SITU CHARACTERIZATION OF THE LATE VACUOLATE MICROSPORE AS A CONVENIENT STAGE TO INDUCE EMBRYOGENESIS IN CAPSICUM. *Protoplasma*, 187, 60-71.
- Gown, A. M. & M. C. Willingham (2002) Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: Immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 50, 449-454.
- Gray, N. K. & M. Wickens (1998) Control of translation initiation in animals. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 14, 399-458.
- Gu, H. H., P. Hagberg & W. J. Zhou (2004) Cold pretreatment enhances microspore embryogenesis in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Growth Regulation*, 42, 137-143.
- Guglielmino, N., M. Liberman, A. M. Catesson, A. Mareck, R. Prat, S. Mutaftschiev & R. Goldberg (1997) Pectin methylesterases from poplar cambium and inner bark: Localization, properties and seasonal changes. *Planta*, 202, 70-75.
- Guo, Y. D. & S. Pulli (1996) High-frequency embryogenesis in *Brassica campestris* microspore culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 46, 219-225.
- Hansen, C. M., D. Hansen, P. K. Holm, R. Larsson & L. Binderup (2000) Cyanoguanidine CHS 828 induces programmed cell death with apoptotic features in human breast cancer cells *in vitro*. *Anticancer Research*, 20, 4211-4220.
- Hasbun, R., L. Valledor, E. Santamaria, M. J. Canal, R. Rodriguez, M. Berdasco & E. Grp. 2007. Dynamics of DNA methylation in chestnut trees development. In *Proceedings of the Second International Symposium on Plant Genetic Resources of Horticultural Crops, Vols 1 and 2*, ed. K. E. Hummer, 563-566.
- Hasegawa, Y., S. Nakamura, E. Uheda & N. Nakamura (2000) Immunolocalization and possible roles of pectins during pollen growth and callose plug formation in angiosperms. *Grana*, 39, 46-55.
- Hatsugai, N., M. Kuroyanagi, K. Yamada, T. Meshi, S. Tsuda, M. Kondo, M. Nishimura & I. Hara-Nishimura (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science*, 305, 855-858.
- Hause, B., W. L. H. Vanveenendaal, G. Hause & A. A. M. Vanlammeren (1994) EXPRESSION OF POLARITY DURING EARLY DEVELOPMENT OF MICROSPORE-DERIVED AND ZYGOTIC EMBRYOS OF BRASSICA-NAPUS L CV TOPAS. *Botanica Acta*, 107, 407-415.
- Heberle-Bors, E., Benito-Moreno, R. M., Alwen, A., Stöger, E., and Vicente, O. 1990. Transformation of pollen. In "Progress in Plant Cellular and Molecular Biology" (H. J. Nijkamp, L. H. Van Der Plaas, and J. Van Aartrijk, Eds.). Dordrecht, Boston, London: Kluwer.

- Heberlebor, E. (1985) INVITRO HAPLOID FORMATION FROM POLLEN - A CRITICAL-REVIEW. *Theoretical and Applied Genetics*, 71, 361-374.
- Hidaka T, Y. Y., Shichijo T. 1979. *In vitro differentiation of haploid plants by anther culture in Poncirus trifoliata*.
- . 1981. *Plantlet formation from anthers of Citrus aurantium L.*
- Hoat, T. X., H. Nakayashiki, Y. Tosa & S. Mayama (2006) Specific cleavage of ribosomal RNA and mRNA during victorin-induced apoptotic cell death in oat. *Plant Journal*, 46, 922-933.
- Honys, D. & D. Twell (2003) Comparative analysis of the *Arabidopsis* pollen transcriptome. *Plant Physiology*, 132, 640-652.
- (2004) Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Genome Biology*, 5.
- Hosp, J., S. de Faria Maraschin, A. Touraev & K. Boutilier (2007) Functional genomics of microspore embryogenesis. *Euphytica*, 158, 275-285.
- Hsieh, C. L. (2000) Dynamics of DNA methylation pattern. *Current Opinion in Genetics & Development*, 10, 224-228.
- Huh, J. H., M. J. Bauer, T.-F. Hsieh & R. L. Fischer (2008) Cellular programming of plant gene imprinting. *Cell*, 132, 735-744.
- Iida, T., I. Suetake, S. Tajima, H. Morioka, S. Ohta, C. Obuse & T. Tsurimoto (2002) PCNA clamp facilitates action of DNA cytosine methyltransferase 1 on hemimethylated DNA. *Genes to Cells*, 7, 997-1007.
- Ilic-Grubor, K., S. M. Attree & L. C. Fowke (1998) Comparative morphological study of zygotic and microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. as revealed by scanning electron microscopy. *Annals of Botany*, 82, 157-165.
- JBM, C. 2003. Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus*).
- Jones, L., J. L. Milne, D. Ashford, M. C. McCann & S. J. McQueen-Mason (2005) A conserved functional role of pectic polymers in stomatal guard cells from a range of plant species. *Planta*, 221, 255-264.
- Jones, L., J. L. Milne, D. Ashford & S. J. McQueen-Mason (2003) Cell wall arabinan is essential for guard cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 11783-11788.
- Joosen, R., J. Cordewener, E. D. J. Supena, O. Vorst, M. Lammers, C. Maliepaard, T. Zeilmaker, B. Miki, T. America, J. Custers & K. Boutilier (2007) Combined transcriptome and proteome analysis identifies pathways and markers associated with the establishment of rapeseed microspore-derived embryo development. *Plant Physiology*, 144, 155-172.
- Jullien, P. E. & F. Berger (2010) DNA methylation reprogramming during plant sexual reproduction? *Trends in Genetics*, 26, 394-399.
- Jullien, P. E., T. Kinoshita, N. Ohad & F. Berger (2006) Maintenance of DNA methylation during the *Arabidopsis* life cycle is essential for parental imprinting. *Plant Cell*, 18, 1360-1372.
- Jullien, P. E., A. Mosquana, M. Ingouff, T. Sakata, N. Ohad & F. Berger (2008) Retinoblastoma and its binding partner MSI1 control imprinting in *Arabidopsis*. *Plos Biology*, 6, 1693-1705.

- Kaiser, C. L., B. J. Chapman, J. L. Guidi, C. E. Terry, D. A. Mangiardi & D. A. Cotanche (2008) Comparison of activated caspase detection methods in the gentamicin-treated chick cochlea. *Hearing Research*, 240, 1-11.
- Kawanabe, T., T. Ariizumi, M. Kawai-Yamada, H. Uchimiya & K. Toriyama (2006) Abolition of the tapetum suicide program ruins microsporogenesis. *Plant and Cell Physiology*, 47, 784-787.
- Kermode, A. R. (1990) Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 9, 155-195.
- Kinoshita, T., A. Miura, Y. H. Choi, Y. Kinoshita, X. F. Cao, S. E. Jacobsen, R. L. Fischer & T. Kakutani (2004) One-way control of FWA imprinting in *Arabidopsis* endosperm by DNA methylation. *Science*, 303, 521-523.
- Knox, J. P. (2008) Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 308-313.
- Kobayakawa, S., K. Miike, M. Nakao & K. Abe (2007) Dynamic changes in the epigenomic state and nuclear organization of differentiating mouse embryonic stem cells. *Genes to Cells*, 12, 447-460.
- Kornblihtt, A. R., M. De la Mata, J. P. Fededa, M. J. Munoz & G. Noguez (2004) Multiple links between transcription and splicing. *Rna-a Publication of the Rna Society*, 10, 1489-1498.
- Kosak, S. T. & M. Groudine (2004) Form follows function: the genomic organization of cellular differentiation. *Genes & Development*, 18, 1371-1384.
- Kott, L. S. & W. D. Beversdorf (1990) ENHANCED PLANT-REGENERATION FROM MICROSPORE-DERIVED EMBRYOS OF BRASSICA-NAPUS BY CHILLING, PARTIAL DESICCATION AND AGE SELECTION. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 23, 187-192.
- Kott, L. S., L. Polsoni & W. D. Beversdorf (1988a) CYTOLOGICAL ASPECTS OF ISOLATED MICROSPORE CULTURE OF BRASSICA-NAPUS. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, 66, 1658-1664.
- Kott, L. S., L. Polsoni, B. Ellis & W. D. Beversdorf (1988b) AUTOTOXICITY IN ISOLATED MICROSPORE CULTURES OF BRASSICA-NAPUS. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, 66, 1665-1670.
- Kouzarides, T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128, 693-705.
- Kranz, E., P. Vonwiegen & H. Lorz (1995) EARLY CYTOLOGICAL EVENTS AFTER INDUCTION OF CELL-DIVISION IN EGG CELLS AND ZYGOTE DEVELOPMENT FOLLOWING IN-VITRO FERTILIZATION WITH ANGIOSPERM GAMETES. *Plant Journal*, 8, 9-23.
- Lam, E. (2004) Controlled cell death, plant survival and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5, 305-315.
- Lanzuolo, C. & V. Orlando (2007) The function of the epigenome in cell reprogramming. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 1043-1062.
- Law, R. D. & J. C. Suttle (2005) Chromatin remodeling in plant cell culture: patterns of DNA methylation and histone H3 and H4 acetylation vary during growth

- of asynchronous potato cell suspensions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 527-534.
- Lazar, M. D., P. S. Baenziger & G. W. Schaeffer (1984) COMBINING ABILITIES AND HERITABILITY OF CALLUS FORMATION AND PLANTLET REGENERATION IN WHEAT (*TRITICUM-AESTIVUM* L) ANTHHER CULTURES. *Theoretical and Applied Genetics*, 68, 131-134.
- Le Trionnaire, G. & D. Twell (2010) Small RNAs in angiosperm gametophytes: from epigenetics to gamete development. *Genes & Development*, 24, 1081-1085.
- Li, E. (2002) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature Reviews Genetics*, 3, 662-673.
- Li, N., D. S. Zhang, H. S. Liu, C. S. Yin, X. X. Li, W. Q. Liang, Z. Yuan, B. Xu, H. W. Chu, J. Wang, T. Q. Wen, H. Huang, D. Luo, H. Ma & D. B. Zhang (2006) The rice tapetum degeneration retardation gene is required for tapetum degradation and anther development. *Plant Cell*, 18, 2999-3014.
- Lichter, R. (1982) INDUCTION OF HAPLOID PLANTS FROM ISOLATED POLLEN OF BRASSICA-NAPUS. *Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie*, 105, 427-434.
- (1989) EFFICIENT YIELD OF EMBRYOIDS BY CULTURE OF ISOLATED MICROSPORES OF DIFFERENT BRASSICACEAE SPECIES. *Plant Breeding*, 103, 119-123.
- Lincoln, J. E., C. Richael, B. Overduin, K. Smith, R. Bostock & D. G. Gilchrist (2002) Expression of the antiapoptotic baculovirus p35 gene in tomato blocks programmed cell death and provides broad-spectrum resistance to disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 15217-15221.
- Lo, K. H. & K. P. Pauls (1992) PLANT-GROWTH ENVIRONMENT EFFECTS ON RAPESEED MICROSPORE DEVELOPMENT AND CULTURE - A FLOW CYTOMETRIC STUDY. *Plant Physiology*, 99, 468-472.
- Lukowitz, W., A. Roeder, D. Parmenter & C. Somerville (2004) A MAPKK kinase gene regulates extra-embryonic cell fate in *Arabidopsis*. *Cell*, 116, 109-119.
- Madeo, F., E. Herker, C. Maldener, S. Wissing, S. Lachelt, M. Herian, M. Fehr, K. Lauber, S. J. Sigris, S. Wesselborg & K. U. Frohlich (2002) A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Molecular Cell*, 9, 911-917.
- Malatesta, M., M. Biggiogera, B. Baldelli, S. M. L. Barabino, T. E. Martin & C. Zancanaro (2008) Hibernation as a far-reaching program for the modulation of RNA transcription. *Microscopy Research and Technique*, 71, 564-572.
- Malatesta, M., C. Zancanaro & M. Biggiogera (2011) Immunoelectron Microscopic Characterization of Nucleolus-Associated Domains During Hibernation. *Microscopy Research and Technique*, 74, 47-53.
- Malik, M. R., F. Wang, J. M. Dirpaul, N. Zhou, P. L. Polowick, A. M. R. Ferrie & J. E. Krochko (2007) Transcript profiling and identification of molecular markers for early microspore embryogenesis in *Brassica napus*. *Plant Physiology*, 144, 134-154.

- Maraschin, S. d. F., M. Caspers, E. Potokina, F. Wuelfert, A. Graner, H. P. Spaink & M. Wang (2006) CDNA array analysis of stress-induced gene expression in barley androgenesis. *Physiologia Plantarum*, 127, 535-550.
- Maraschin, S. F., W. de Priester, H. P. Spaink & M. Wang (2005) Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *Journal of Experimental Botany*, 56, 1711-1726.
- Martin, G. G., M. C. Risueño & J. M. Sogo (1970) DEVELOPMENT OF VEGETATIVE CELL IN POLLEN GRAIN. *Cytologia*, 35, 77-&.
- Mascarenhas, J. P. (1975) Biochemistry of angiosperm pollen development. *Botanical Review*, 41, 259-314.
- (1992) POLLEN GENE-EXPRESSION - MOLECULAR EVIDENCE. *International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology*, 140, 3-18.
- Mazin, A. L. (2009) Suicidal function of DNA methylation in age-related genome disintegration. *Ageing Research Reviews*, 8, 314-327.
- McCormick, S. (1993) MALE GAMETOPHYTE DEVELOPMENT. *Plant Cell*, 5, 1265-1275.
- Medina, F. J., M. C. Risueño, M. I. Rodriguezgarcia & M. A. Sanchezpina (1983) THE NUCLEOLAR ORGANIZER (NOR) AND FIBRILLAR CENTERS DURING PLANT GAMETOGENESIS. *Journal of Ultrastructure Research*, 85, 300-310.
- Meijon, M., I. Feito, L. Valledor, R. Rodriguez & M. J. Canal (2010) Dynamics of DNA methylation and Histone H4 acetylation during floral bud differentiation in azalea. *Bmc Plant Biology*, 10.
- Meijon, M., L. Valledor, E. Santamaria, P. S. Testillano, M. C. Risueño, R. Rodriguez, I. Feito & M. J. Canal (2009) Epigenetic characterization of the vegetative and floral stages of azalea buds: Dynamics of DNA methylation and histone H4 acetylation. *Journal of Plant Physiology*, 166, 1624-1636.
- Mena, C. G., P. S. Testillano, P. González-Melendi, E. Gorab & M. C. Risueño (1994) IMMUNOELECTRON MICROSCOPY OF RNA COMBINED WITH NUCLEIC-ACID CYTOCHEMISTRY IN PLANT NUCLEOLI. *Experimental Cell Research*, 212, 393-408.
- Miguel, C. & L. Marum (2011) An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. *Journal of Experimental Botany*, 62, 3713-3725.
- Misteli, T. (2000) Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. *Journal of Cell Science*, 113, 1841-1849.
- Misteli, T. (2007) Beyond the sequence: Cellular organization of genome function. *Cell*, 128, 787-800.
- Morgan, H. D., F. Santos, K. Green, W. Dean & W. Reik (2005) Epigenetic reprogramming in mammals. *Human Molecular Genetics*, 14, R47-R58.
- Nitsch, C. & B. Norreel (1973) EFFECT OF THERMAL SHOCK ON EMBRYOGENIC POWER OF POLLEN OF DATURA-INNOXIA CULTURED IN ANTHER OR ISOLATED FROM ANTHER. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences Serie D*, 276, 303-&.

- Olney, J. W., T. Tenkova, K. Dikranian, L. J. Muglia, W. J. Jermakowicz, C. D'Sa & K. A. Roth (2002) Ethanol-induced caspase-3 activation in the *in vivo* developing mouse brain. *Neurobiology of Disease*, 9, 205-219.
- Pacini, E. (1996) Types and meaning of pollen carbohydrate reserves. *Sexual Plant Reproduction*, 9, 362-366.
- Panavas, T. & B. Rubinstein (1998) Oxidative events during programmed cell death of daylily (*Hemerocallis* hybrid) petals. *Plant Science*, 133, 125-138.
- Papini, A., S. Mosti & L. Brighigna (1999) Programmed-cell death events during tapetum development of angiosperms. *Protoplasma*, 207, 213-221.
- Pechan, P. M. & W. A. Keller (1988) IDENTIFICATION OF POTENTIALLY EMBRYOGENIC MICROSPORES IN BRASSICA-NAPUS. *Physiologia Plantarum*, 74, 377-384.
- Pelloux, J., C. Rusterucci & E. J. Mellerowicz (2007) New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in Plant Science*, 12, 267-277.
- Perrin, R., H. Lange, J. M. Grienenberger & D. Gagliardi (2004) AtmtPNPase is required for multiple aspects of the 18S rRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana* mitochondria. *Nucleic Acids Research*, 32, 5174-5182.
- Petricka, J. J., J. M. Van Norman & P. N. Benfey (2009) Symmetry Breaking in Plants: Molecular Mechanisms Regulating Asymmetric Cell Divisions in *Arabidopsis*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1.
- Petrussa, E., A. Bertolini, V. Casolo, J. Krajkova, F. Macri & A. Vianello (2009) Mitochondrial bioenergetics linked to the manifestation of programmed cell death during somatic embryogenesis of *Abies alba*. *Planta*, 231, 93-107.
- Pfluger, J. & D. Wagner (2007) Histone modifications and dynamic regulation of genome accessibility in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 645-652.
- Pina, C., F. Pinto, J. A. Feijo & J. D. Becker (2005) Gene family analysis of the *Arabidopsis* pollen transcriptome reveals biological implications for cell growth, division control, and gene expression regulation. *Plant Physiology*, 138, 744-756.
- Prem, D., K. Gupta & A. Agnihotri (2005) Effect of various exogenous and endogenous factors on microspore embryogenesis in Indian mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern and Coss). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41, 266-273.
- Raghavan, V. (1990) FROM MICROSPORE TO EMBRYOID - FACES OF THE ANGIOSPERM POLLEN GRAIN. *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*, 9, 213-221.
- . 2000. *Developmental Biology of Flowering Plants*. New York.
- Ramirez, C., B. Chiancone, P. S. Testillano, B. Garcia-Fojeda, M. A. Germana & M. C. Risueño (2003) First embryogenic stages of Citrus microspore-derived embryos. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 45, 53-58.
- Ramirez, C., P. S. Testillano, B. Pintos, M. A. Moreno-Risueño, M. A. Bueno & M. C. Risueño (2004) Changes in pectins and MAPKs related to cell development during early microspore embryogenesis in *Quercus suber* L. *European Journal of Cell Biology*, 83, 213-225.

- Reape, T. J. & P. F. McCabe (2008) Apoptotic-like programmed cell death in plants. *New Phytologist*, 180, 13-26.
- Reape, T. J. & P. F. McCabe (2010) Apoptotic-like regulation of programmed cell death in plants. *Apoptosis*, 15, 249-256.
- Reik, W., W. Dean & J. Walter (2001) Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 293, 1089-1093.
- Reyes, J. C. (2006) Chromatin modifiers that control plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 21-27.
- Reynolds, T. L. (1997) Pollen embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, 33, 1-10.
- Ribeiro, T., W. Viegas & L. Morais-Cecilio (2009) Epigenetic marks in the mature pollen of *Quercus suber* L. (Fagaceae). *Sexual Plant Reproduction*, 22, 1-7.
- Ridley, B. L., M. A. O'Neill & D. A. Mohnen (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57, 929-967.
- Rogers, H. J. (2006) Programmed cell death in floral organs: How and why do flowers die? *Annals of Botany*, 97, 309-315.
- Rojo, E., R. Martin, C. Carter, J. Zouhar, S. Q. Pan, J. Plotnikova, H. L. Jin, M. Paneque, J. J. Sanchez-Serrano, B. Baker, F. M. Ausubel & N. V. Raikhel (2004) VPE gamma exhibits a caspase-like activity that contributes to defense against pathogens. *Current Biology*, 14, 1897-1906.
- Sanger, J. M. & W. T. Jackson (1971) FINE STRUCTURE STUDY OF POLLEN DEVELOPMENT IN HAEMANTHUS-KATHERINAE BAKER .3. CHANGES IN ORGANELLES DURING DEVELOPMENT OF VEGETATIVE CELL. *Journal of Cell Science*, 8, 317-&.
- Santamaria, M. E., R. Hasbun, M. J. Valera, M. Meijon, L. Villedor, J. L. Rodriguez, P. E. Toorop, M. J. Canal & R. Rodriguez (2009) Acetylated H4 histone and genomic DNA methylation patterns during bud set and bud burst in *Castanea sativa*. *Journal of Plant Physiology*, 166, 1360-1369.
- Satpute, G. K., H. Long, J. M. Seguí-Simarro, M. C. Risueño & P. S. Testillano (2005) Cell architecture during gametophytic and embryogenic microspore development in *Brassica napus* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27, 665-674.
- Saze, H., O. M. Scheid & J. Paszkowski (2003) Maintenance of CpG methylation is essential for epigenetic inheritance during plant gametogenesis. *Nature Genetics*, 34, 65-69.
- Scovassi, A. I., M. G. Bottone, M. Biggiogera & C. Pellicciari (2008) Dynamic relocation of nuclear proteins during the execution phase of apoptosis. *Biochemical Pharmacology*, 76, 1440-1450.
- Schiller, M., I. Bekeredjian-Ding, P. Heyder, N. Blank, A. D. Ho & H. M. Lorenz (2008) Autoantigens are translocated into small apoptotic bodies during early stages of apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 15, 183-191.
- Schulze, D. & K. P. Pauls (2002) Flow cytometric analysis of cellulose tracks development of embryogenic *Brassica* cells in microspore cultures. *New Phytologist*, 154, 249-254.
- Seguí-Simarro, J. 2001. Inducción a embriogénesis en polen: Caracterización celular y expresión de proteínas de estrés. Universidad Complutense de Madrid.

- Seguí-Simarro, J., P. Testillano, S. Jouannic, Y. Henry & M. Risueño (2005) Mitogen-activated protein kinases are developmentally regulated during stress-induced microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. *Histochemistry and Cell Biology*, 123, 541-551.
- Seguí-Simarro, J. M., I. Barany, R. Suarez, B. Fadon, P. Testillano & M. C. Risueño (2006) Nuclear bodies domain changes with microspore reprogramming to embryogenesis. *European Journal of Histochemistry*, 50, 35-44.
- Seguí-Simarro, J. M., P. S. Testillano & M. C. Risueño (2003) Hsp70 and Hsp90 change their expression and subcellular localization after microspore embryogenesis induction in *Brassica napus* L. *Journal of Structural Biology*, 142, 379-391.
- Senaratna, T., L. Kott, W. D. Beversdorf & B. D. McKersie (1991) DESICCATION OF MICROSPORE DERIVED EMBRYOS OF OILSEED RAPE (BRASSICA-NAPUS L). *Plant Cell Reports*, 10, 342-344.
- Serrano, I., S. Pelliccione & A. Olmedilla (2010) Programmed-cell-death hallmarks in incompatible pollen and papillar stigma cells of *Olea europaea* L. under free pollination. *Plant Cell Reports*, 29, 561-572.
- Shull, J. K. & M. Y. Menzel (1977) STUDY OF RELIABILITY OF SYNCHRONY IN DEVELOPMENT OF POLLEN MOTHER CELLS OF LILIUM-LONGIFLORUM AT 1ST MEIOTIC PROPHASE. *American Journal of Botany*, 64, 670-679.
- Slotkin, R. K., M. Vaughn, F. Borges, M. Tanurdzic, J. D. Becker, J. A. Feijo & R. A. Martienssen (2009) Epigenetic Reprogramming and Small RNA Silencing of Transposable Elements in Pollen. *Cell*, 136, 461-472.
- Smykal, P. (2000) Pollen embryogenesis - the stress mediated switch from gametophytic to sporophytic development. Current status and future prospects. *Biologia Plantarum*, 43, 481-489.
- Solis, M. T., B. Pintos, M. J. Prado, M. A. Bueno, I. Raska, M. C. Risueño & P. S. Testillano (2008) Early markers of *in vitro* microspore reprogramming to embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.). *Plant Science*, 174, 597-605.
- Somerville, C., S. Bauer, G. Brininstool, M. Facette, T. Hamann, J. Milne, E. Osborne, A. Paredez, S. Persson, T. Raab, S. Vorwerk & H. Youngs (2004) Toward a systems approach to understanding plant-cell walls. *Science*, 306, 2206-2211.
- Stepka, M., F. Ciampolini, M. Charzynska & M. Cresti (2000) Localization of pectins in the pollen tube wall of *Ornithogalum virens* L.-does the pattern of pectin distribution depend on the growth rate of the pollen tube? *Planta*, 210, 630-635.
- Straatman, K. R. & J. H. N. Schel (2001) Distribution of splicing proteins and putative coiled bodies during pollen development and androgenesis in *Brassica napus* L. *Protoplasma*, 216, 191-200.
- Stuart, D. A. & M. K. Redenbaugh (1987) Use of somatic embryogenesis for the regeneration of plants. *Acs Symposium Series*, 334, 87-96.

- Suarez-Cervera, M., E. Arcalis, A. Le Thomas & J. A. Seoane-Camba (2002) Pectin distribution pattern in the apertural intine of *Euphorbia peplus* L. (Euphorbiaceae) pollen. *Sexual Plant Reproduction*, 14, 291-298.
- Supena, E. D. J., B. Winarto, T. Riksen, E. Dubas, A. Van Lammeren, R. Offringa, K. Boutilier & J. Custers (2008) Regeneration of zygotic-like microspore-derived embryos suggests an important role for the suspensor in early embryo patterning. *Journal of Experimental Botany*, 59, 803-814.
- Sylvester, A. W. (2000) Division decisions and the spatial regulation of cytokinesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 58-66.
- Takahata, Y., D. C. W. Brown & W. A. Keller (1991) EFFECT OF DONOR PLANT-AGE AND INFLORESCENCE AGE ON MICROSPORE CULTURE OF BRASSICA-NAPUS L. *Euphytica*, 58, 51-55.
- Teerawanichpan, P., P. Krittanai, N. Chauvatcharin & J. Narangajavana (2009) Purification and characterization of rice DNA methyltransferase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 671-680.
- Telmer, C. A., W. Newcomb & D. H. Simmonds (1995) CELLULAR-CHANGES DURING HEAT-SHOCK INDUCTION AND EMBRYO DEVELOPMENT OF CULTURED MICROSPORES OF BRASSICA-NAPUS CV TOPAS. *Protoplasma*, 185, 106-112.
- Telmer, C. A., D. H. Simmonds & W. Newcomb (1992) DETERMINATION OF DEVELOPMENTAL STAGE TO OBTAIN HIGH-FREQUENCIES OF EMBRYOGENIC MICROSPORES IN BRASSICA-NAPUS. *Physiologia Plantarum*, 84, 417-424.
- Tembe, V. & B. R. Henderson (2007) Protein trafficking in response to DNA damage. *Cellular Signalling*, 19, 1113-1120.
- Terasaka, O. & T. Niitsu (1990) Unequal cell-division and chromatin differentiation in pollen grain cells .2. Microtubule dynamics associated with the unequal cell-division. *Botanical Magazine-Tokyo*, 103, 133-142.
- Tessadori, F., R. K. Schulkes, R. van Driel & P. Fransz (2007) Light-regulated large-scale reorganization of chromatin during the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 50, 848-857.
- Testillano, P. S., M. J. Coronado, J. M. Segui, J. Domenech, P. Gonzalez-Melendi, I. Raska & M. C. Risueño (2000) Defined nuclear changes accompany the reprogramming of the microspore to embryogenesis. *Journal of Structural Biology*, 129, 223-232.
- Testillano, P. S., P. Gonzalez-Melendi, M. J. Coronado, J. M. Segui-Simarro, M. A. Moreno-Risueño & M. C. Risueño (2005) Differentiating plant cells switched to proliferation remodel the functional organization of nuclear domains. *Cytogenetic and Genome Research*, 109, 166-174.
- Testillano, P. S., P. González-Melendi, P. Ahmadian, B. Fadon & M. C. Risueño (1995) THE IMMUNOLocalIZATION OF NUCLEAR ANTIGENS DURING THE POLLEN DEVELOPMENTAL PROGRAM AND THE INDUCTION OF POLLEN EMBRYOGENESIS. *Experimental Cell Research*, 221, 41-54.

- Testillano, P. S., P. González-Melendi, J. Reyes, K. Koberna, C. G. Mena & M. C. Risueño (1994a) The MA method used as nucleic acid cytochemistry for immunogold studies of plant and animal cell nuclei. *Electron Microscopy 1994, Vols 3a and 3b*, 487-488.
- Testillano, P. S., E. Gorab & M. C. Risueño (1994b) A NEW APPROACH TO MAP TRANSCRIPTION SITES AT THE ULTRASTRUCTURAL LEVEL. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 42, 1-10.
- Testillano, P. S., C. Ramirez, J. Domenech, M. J. Coronado, P. Vergne, E. Matthys-Rochon & M. C. Risueño (2002) Young microspore-derived maize embryos show two domains with defined features also present in zygotic embryogenesis. *International Journal of Developmental Biology*, 46, 1035-1047.
- Testillano, P. S., M. A. Sanchezpina, A. Olmedilla, J. P. Fuchs & M. C. Risueño (1993) CHARACTERIZATION OF THE INTERCHROMATIN REGION AS THE NUCLEAR DOMAIN-CONTAINING SNRNPS IN PLANT-CELLS - A CYTOCHEMICAL AND IMMUNOELECTRON MICROSCOPY STUDY. *European Journal of Cell Biology*, 61, 349-361.
- Thomas, S. G. & V. E. Franklin-Tong (2004) Self-incompatibility triggers programmed cell death in Papaver pollen. *Nature*, 429, 305-309.
- Touraev, A., A. Ilham, O. Vicente & E. HeberleBors (1996a) Stress-induced microspore embryogenesis in tobacco: An optimized system for molecular studies. *Plant Cell Reports*, 15, 561-565.
- Touraev, A., A. Indrianto, I. Wratschko, O. Vicente & E. HeberleBors (1996b) Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L) induced by starvation at high temperature. *Sexual Plant Reproduction*, 9, 209-215.
- Touraev, A., M. Pfosser, O. Vicente & E. HeberleBors (1996c) Stress as the major signal controlling the developmental fate of tobacco microspores: Towards a unified model of induction of microspore/pollen embryogenesis. *Planta*, 200, 144-152.
- Touraev, A., O. Vicente & E. HeberleBors (1997) Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends in Plant Science*, 2, 297-302.
- Trentani, A., P. S. Testillano, M. C. Risueño & M. Biggiogera (2003) Visualization of transcription sites at the electron microscope. *European Journal of Histochemistry*, 47, 195-200.
- Tupy, J., J. Suss, E. Hrabetova & L. Rihova (1983) DEVELOPMENTAL-CHANGES IN GENE-EXPRESSION DURING POLLEN DIFFERENTIATION AND MATURATION IN NICOTIANA-TABACUM-L. *Biologia Plantarum*, 25, 231-237.
- Twell, D. (2011) Male gametogenesis and germline specification in flowering plants. *Sexual Plant Reproduction*, 24, 149-160.
- Twell, D., S. K. Park & E. Lalanne (1998) Asymmetric division and cell-fate determination in developing pollen. *Trends in Plant Science*, 3, 305-310.
- Tyas, L., V. A. Brophy, A. Pope, A. J. Rivett & J. M. Tavaré (2000) Rapid caspase-3 activation during apoptosis revealed using fluorescence-resonance energy transfer. *Embo Reports*, 1, 266-270.

- Ueda, K. & I. Tanaka (1995) MALE GAMETIC NUCLEUS-SPECIFIC H2B AND H3 HISTONES, DESIGNATED GH2B AND GH3, IN LILIUM-LONGIFLORUM. *Planta*, 197, 289-295.
- Uren, A. G., K. O'Rourke, L. Aravind, M. T. Pisabarro, S. Seshagiri, E. V. Koonin & V. M. Dixit (2000) Identification of paracaspases and metacaspases: Two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Molecular Cell*, 6, 961-967.
- V, R. 2001. Life and times of the suspensor of angiosperm embryos. In *Life and times of the suspensor of angiosperm embryos*, ed. T. i. P. S. P. G. J. Issue, 251-276.
- Valledor, L., R. Hasbun, M. Meijon, J. L. Rodriguez, E. Santamaria, M. Viejo, M. Berdasco, I. Feito, M. F. Fraga, M. J. Canal & R. Rodriguez (2007) Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 91, 75-86.
- Valledor, L., R. Hasbun, R. Rodriguez & M. J. Canal (2009) RNA-free DNA Extraction Protocol from Pinus Tissues for Molecular Biology or HPCE/HPLC Analyses. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 18, 229-232.
- Vanaelst, A. C. & J. L. Vanwent (1992) ULTRASTRUCTURAL IMMUNO-LOCALIZATION OF PECTINS AND GLYCOPROTEINS IN ARABIDOPSIS-THALIANA POLLEN GRAINS. *Protoplasma*, 168, 14-19.
- Vanlammeren, A. A. M., C. J. Keijzer, M. T. M. Willemse & H. Kieft (1985) Structure and function of the microtubular cytoskeleton during pollen development in *Gasteria-Verrucosa* (MILL) H DUVAL. *Planta*, 165, 1-11.
- Vanyushin, B. F. & V. V. Ashapkin (2011) DNA methylation in higher plants: Past, present and future. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms*, 1809, 360-368.
- Vanyushin, B. F. & M. D. Kirnos (1988) DNA methylation in plants. *Gene*, 74, 117-121.
- Varnier, A. L., C. Jacquard & C. Clement (2009) Programmed Cell Death and Microspore Embryogenesis. *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, 147-154.
- Varnier, A. L., F. Mazeyrat-Cloubeyre, R. S. Sangwan & C. Clement (2005) Programmed cell death progressively models the development of anther sporophytic tissues from the tapetum and is triggered in pollen grains during maturation. *Journal of Structural Biology*, 152, 118-128.
- Vasil, I. K. (1967) Physiology and cytology of anther development. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 42, 327-&.
- Vercammen, D., B. van de Cotte, G. De Jaeger, D. Eeckhout, P. Casteels, K. Vandepoele, I. Vandenberghe, J. Van Beeumen, D. Inze & F. Van Breusegem (2004) Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 45329-45336.
- Wahle, E. & U. Riegsegger (1999) 3'-End processing of pre-mRNA in eukaryotes. *Fems Microbiology Reviews*, 23, 277-295.

- Wan, Y., R. L. Poole, A. K. Huttly, C. Toscano-Underwood, K. Feeney, S. Welham, M. J. Gooding, C. Mills, K. J. Edwards, P. R. Shewry & R. A. C. Mitchell (2008) Transcriptome analysis of grain development in hexaploid wheat. *Bmc Genomics*, 9.
- Wang, M., S. van Bergen & B. Van Duijn (2000) Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding. *Plant Physiology*, 124, 523-530.
- Wilson, Z. A., J. Song, B. Taylor & C. Yang (2011) The final split: the regulation of anther dehiscence. *Journal of Experimental Botany*, 62, 1633-1649.
- Willats, W. G. T., L. McCartney, W. Mackie & J. P. Knox (2001a) Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*, 47, 9-27.
- Willats, W. G. T., C. Orfila, G. Limberg, H. C. Buchholt, G. van Alebeek, A. G. J. Voragen, S. E. Marcus, T. Christensen, J. D. Mikkelsen, B. S. Murray & J. P. Knox (2001b) Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls - Implications for pectin methyl esterase action, matrix properties, and cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 19404-19413.
- Wolf, S., G. Mouille & J. Pelloux (2009) Homogalacturonan Methyl-Esterification and Plant Development. *Molecular Plant*, 2, 851-860.
- Woltering, E. J. (2004) Death proteases come alive. *Trends in Plant Science*, 9, 469-472.
- Wu, H. M. & A. Y. Cheung (2000) Programmed cell death in plant reproduction. *Plant Molecular Biology*, 44, 267-281.
- Xiao, W. Y., K. D. Custard, R. C. Brown, B. E. Lemmon, J. J. Harada, R. B. Goldberg & R. L. Fischer (2006) DNA methylation is critical for *Arabidopsis* embryogenesis and seed viability. *Plant Cell*, 18, 805-814.
- Xu, Y. & M. R. Hanson (2000) Programmed cell death during pollination-induced petal senescence in petunia. *Plant Physiology*, 122, 1323-1333.
- Yamauchi, T., S. Moritoh, Y. Johzuka-Hisatomi, A. Ono, R. Terada, I. Nakamura & S. Iida (2008) Alternative splicing of the rice OsMET1 genes encoding maintenance DNA methyltransferase. *Journal of Plant Physiology*, 165, 1774-1782.
- Yeung, E. C., M. H. Rahman & T. A. Thorpe (1996) Comparative development of zygotic and microspore-derived embryos in *Brassica napus* L cv Topas .1. Histodifferentiation. *International Journal of Plant Sciences*, 157, 27-39.
- Z., C. 1985. *A study on induction of plants from Citrus pollen.*
- Zaki, M. A. M. & H. G. Dickinson (1990) STRUCTURAL-CHANGES DURING THE 1ST DIVISIONS OF EMBRYOS RESULTING FROM ANTHER AND FREE MICROSPORE CULTURE IN BRASSICA-NAPUS. *Protoplasma*, 156, 149-162.
- (1991) MICROSPORE-DERIVED EMBRYOS IN BRASSICA - THE SIGNIFICANCE OF DIVISION SYMMETRY IN POLLEN MITOSIS-I TO EMBRYOGENIC DEVELOPMENT. *Sexual Plant Reproduction*, 4, 48-55.
- Zhang, X., J. Yazaki, A. Sundaresan, S. Cokus, S. W. L. Chan, H. Chen, I. R. Henderson, P. Shinn, M. Pellegrini, S. E. Jacobsen & J. R. Ecker (2006)

- Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell*, 126, 1189-1201.
- Zhao, X. Y., Y. H. Su, Z. J. Cheng & X. S. Zhang (2008) Cell fate switch during *in vitro* plant organogenesis. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50, 816-824.
- Zhou, W. J., G. X. Tang & P. Hagberg (2002) Efficient production of doubled haploid plants by immediate colchicine treatment of isolated microspores in winter *Brassica napus*. *Plant Growth Regulation*, 37, 185-192.
- Zienkiewicz, K., D. J. Smolinski & E. Bednarska (2006) Distribution of poly(A) RNA and splicing machinery elements in mature *Hyacinthus orientalis* L. pollen grains and pollen tubes growing *in vitro*. *Protoplasma*, 227, 95-103.
- Zienkiewicz, K., A. Zienkiewicz, D. J. Smolinski, M. Swidzinski & E. Bednarska (2008a) Intracellular organization of the pre-mRNA splicing machinery during *Hyacinthus orientalis* L. pollen development. *Sexual Plant Reproduction*, 21, 217-231.
- Zienkiewicz, K., A. Zienkiewicz, D. J. Smolinski, K. Rafinska, M. Swidzinski & E. Bednarska (2008b) Transcriptional state and distribution of poly(A) RNA and RNA polymerase II in differentiating *Hyacinthus orientalis* L. pollen grains. *Sexual Plant Reproduction*, 21, 233-245.
- Zilberman, D. (2008) The evolving functions of DNA methylation. *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 554-559.
- Zilberman, D., M. Gehring, R. K. Tran, T. Ballinger & S. Henikoff (2007) Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nature Genetics*, 39, 61-69.
- Zluvova, J., B. Janousek & B. Vyskot (2001) Immunohistochemical study of DNA methylation dynamics during plant development. *Journal of Experimental Botany*, 52, 2265-2273.
- Zorio, D. A. R. & D. L. Bentley (2004) The link between mRNA processing and transcription: communication works both ways. *Experimental Cell Research*, 296, 91-97.
- Zur, I., E. Dubas, E. Golemic, M. Szechynska-Hebda, G. Golebiowska & M. Wedzony (2009) Stress-related variation in antioxidative enzymes activity and cell metabolism efficiency associated with embryogenesis induction in isolated microspore culture of triticale (x *Triticosecale* Wittm.). *Plant Cell Reports*, 28, 1279-1287.

6 CONCLUSIONES.

- 1 Se ha optimizado el sistema de cultivo *in vitro* de microsporas aisladas de *Brassica napus* para una mayor eficiencia de inducción a embriogénesis junto con el desarrollo de una metodología óptima para la germinación de embriones y su conversión a plantas adultas.
- 2 Se ha desarrollado un nuevo sistema de cultivo *in vitro* de microsporas para la inducción eficiente de embriogénesis a 18°C en *Brassica napus*, en el cual, las microsporas siguen dos tipos de rutas embriogénicas, sistema que bajo las mismas condiciones de inducción, permitirá el estudio comparativo de diferentes dinámicas celulares.
- 3 Se han determinado los niveles de muerte celular durante las primeras etapas de cultivo de microsporas y se han analizado otras respuestas celulares al estrés inductor de embriogénesis. Algunas células que no responden al tratamiento de estrés inductor de embriogénesis siguen una ruta de muerte celular dependiente de actividad tipo caspasa 3, indicando la existencia de muerte celular programada.
- 4 Se han establecido marcadores moleculares y celulares de los procesos de maduración y embriogénesis del polen comunes a dos especies diferentes: el olivo y la colza, como son: la organización estructural de los núcleos, la población ribosómica, la tabicación citoplásmica, la acumulación de almidón y la composición de pectinas y celulosa de la pared celular.
- 5 Durante el desarrollo y embriogénesis del polen, la diferenciación celular conlleva la presencia mayoritaria de pectinas no esterificadas en la pared y altos niveles de expresión del gen de la pectinmetilesterasa (*BnPME*), mientras que la proliferación celular se asocia con una mayor proporción de pectinas altamente esterificadas y una expresión baja de *BnPME*. Embriones cotiledonares cigóticos y derivados de microsporas presentan una distribución de transcritos de *BnPME* similar.
- 6 La proteína de fusión PME-GFP se localiza en las paredes celulares diferenciadas de las células del mesófilo y de las células epidérmicas de hojas de *Nicotiana tabacum*, indicando que la proteína después de ser transcrita y procesada es dirigida a la pared donde presumiblemente realiza su actividad enzimática sobre las pectinas *in muro*.

- 7 Los niveles de metilación global del DNA y la expresión del gen de la DNA metiltransferasa (*BnMET1*) están regulados durante el desarrollo gametofítico y embriogénico del polen, en relación a los cambios en la estructura de la cromatina que tienen lugar con los procesos de diferenciación y proliferación, de tal manera que el polen maduro y las células diferenciadas del embrión presentan mayores niveles de 5mdC y mayor expresión de *BnMET1* que la microspora inmadura y las células del embrión en etapas de alta proliferación. Los patrones de distribución de la metilación del DNA y de la expresión de *BnMET1* son similares en embriones derivados de microsporas y embriones cigóticos.
- 8 Las células del tapetum de *Brassica napus* y *Nicotiana tabacum* sufren un proceso de MCP durante su desarrollo a través de una ruta dependiente de proteínas tipo caspasa 3, caracterizada por contracción citoplásmica, condensación cromatínica y degradación del DNA, características propias de los procesos de apoptosis de células animales.
- 9 Durante el desarrollo y MCP del tapetum, se produce un incremento de los niveles de metilación global del DNA y un cambio en el patrón de distribución de 5mdC, desde pequeños “spots” en etapas metabólicamente activas hasta su concentración en grandes masas de cromatina muy condensada en MCP avanzada. La DNA metiltransferasa 1 (*NtMET1*) aumenta su expresión durante el desarrollo y MCP del tapetum.
- 10 Se han identificado estructuras similares a los HERDS (Heterogeneous ectopic ribonucleoprotein derived structures), descritos en células animales apoptóticas y marcadores de parada transcripcional, en el tapetum en MCP avanzada de dos especies diferentes, *Brassica napus* y *Nicotiana tabacum*.
- 11 Los patrones de distribución ultraestructural de marcadores de síntesis, procesamiento y degradación de RNA indican una disminución de la actividad transcripcional y un aumento de la degradación de RNAs durante la MCP del tapetum. La diferenciación del polen *in vivo* va acompañada de un descenso en los marcadores de actividad transcripcional y de degradación de RNA.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Abid, G., Y. Muhoviski, J. M. Jacquemin, D. Mingeot, K. Sassi, A. Toussaint & J. P. Baudoin** (2011) Changes in DNA-methylation during zygotic embryogenesis in interspecific hybrids of beans (*Phaseolus* ssp.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 105, 383-393.
- Ahmad, A., Y. Zhang & X. F. Cao** (2010) Decoding the Epigenetic Language of Plant Development. *Molecular Plant*, 3, 719-728.
- Aleksandrushkina, N. I. & B. F. Vanyushin** (2009) Endonucleases and their involvement in plant apoptosis. *Russian Journal of Plant Physiology*, 56, 291-305.
- Anandarajah, K., L. Kott, W. D. Beversdorf & B. D. McKersie** (1991) Induction of desiccation tolerance in microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. by thermal stress. *Plant Science*, 77, 119-123.
- Arquiaga, T.** 1985. Análisis citofotométrico y ultraestructural de la interphase de la microspora de *Hyacinthoides non scripta*. Universidad Complutense de Madrid.
- Ashapkin, V. V., L. I. Kutueva & B. F. Vanyushin** (2011) Is the cytosine DNA methyltransferase gene MET1 regulated by DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* plants? *Russian Journal of Genetics*, 47, 279-288.
- Atanassov, A., N. Zagorska, P. Boyadjiev & D. Djilianov** (1995) *In vitro* production of haploid plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11, 400-408.
- Aufsatz, W., M. F. Mette, A. J. M. Matzke & M. Matzke** (2004) The role of MET1 in RNA-directed de novo and maintenance methylation of CG dinucleotides. *Plant Molecular Biology*, 54, 793-804.
- Aya, K., M. Ueguchi-Tanaka, M. Kondo, K. Hamada, K. Yano, M. Nishimura & M. Matsuoka** (2009) Gibberellin Modulates Anther Development in Rice via the Transcriptional Regulation of GAMYB. *Plant Cell*, 21, 1453-1472.
- Babbar SB, A. P., Sahay S, Bhojwani SS.** 2004. Isolated microspore culture of Brassica: An experimental tool for developmental studies and crop improvement. ed. I. J. o. Biotechnology. Indian Journal of Biotechnology 3.
- Bachelierie, J. P., E. Puvion & J. P. Zalta** (1975) Ultrastructural organization and biochemical characterization of chromatin-rna-protein complexes isolated from mammalian-cell nuclei. *European Journal of Biochemistry*, 58, 327-337.
- Back, F.** (1976) The variable condition of euchromatin and heterochromatin. *Int Rev Cytol*, 45, 25-64.
- Bajaj, Y. P. S.** (1977) Survival of atropa and Nicotiana pollen-embryos frozen at -196 degrees C. *Current Science*, 46, 305-307.
- Bajaj, Y. P. S.** (1990) Cryopreservation of germplasm of vegetatively propagated crops. *Bulletin De La Societe Botanique De France-Actualites Botaniques*, 137, 99-114.
- Baluska, F., F. Liners, A. Hlavacka, M. Schlicht, P. Van Cutsem, D. W. McCurdy & D. Menzel** (2005) Cell wall pectins and xyloglucans are internalized into dividing root cells and accumulate within cell plates during cytokinesis. *Protoplasma*, 225, 141-155.
- Barany, I., B. Fadon, M. C. Risueño & P. S. Testillano** (2010a) Cell wall components and pectin esterification levels as markers of proliferation and differentiation events during pollen development and pollen embryogenesis in *Capsicum annuum* L. *Journal of Experimental Botany*, 61, 1159-1175.
- Barany, I., P. Gonzalez-Melendi, B. Fadon, J. Mityko, M. C. Risueño & P. S. Testillano** (2005) Microspore-derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.): subcellular rearrangements through development. *Biology of the Cell*, 97, 709-722.

- Barany I., F. B., Risueño M.C. and Testillano P.** 2010b. Microspore reprogramming to embryogenesis induces changes in cell wall and starch accumulation dynamics associated with proliferation and differentiation events.
- Barnabas, B.** (1985) Effect of water-loss on germination ability of maize (ZEA-MAYS-L) pollen. *Annals of Botany*, 55, 201-204.
- Baroux, C., M. T. Raissig & U. Grossniklaus** (2011) Epigenetic regulation and reprogramming during gamete formation in plants. *Current Opinion in Genetics & Development*, 21, 124-133.
- Barton, M. K. & R. S. Poethig** (1993) Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*. An analysis of development in the wild-type and in the shoot meristemless mutant. *Development*, 119, 823-831.
- Bassani, M., E. Pacini & G. G. Franchi** (1994) Humidity stress responses in pollen of anemophilous and entomophilous species. *Grana*, 33, 146-150.
- Becker, J. D., L. C. Boavida, J. Carneiro, M. Haury & J. A. Feijo** (2003) Transcriptional profiling of *Arabidopsis* tissues reveals the unique characteristics of the pollen transcriptome. *Plant Physiology*, 133, 713-725.
- Bedinger, P.** (1992) The remarkable biology of pollen. *Plant Cell*, 4, 879-887.
- Bedinger, P. A., A. H. Broadwater, J. D. Conway, K. J. Hardeman, C. A. Loukides, R. T. N. Prata & A. L. Rubinstein** (1994) Molecular studies of pollen development in maize. *Pollen-Pistil Interactions and Pollen Tube Growth*, 12, 1-14.
- Bedinger, P. A. & M. D. Edgerton** (1990) Developmental staging of maize microspores reveals a transition in developing microspore proteins. *Plant Physiology*, 92, 474-479.
- Bednarska, E.** (1984) Ultrastructural and metabolic transformations of differentiating *Hyacinthus orientalis* L. pollen grain cells .1. RNA and protein-synthesis. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 53, 145-&.
- Bednarska, E. & A. Gorskabryllass** (1987) Ultrastructural transformations of nuclei in differentiating *Hyacinthus orientalis* L. pollen grain cells. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 56, 667-685.
- Belostotsky, D. A. & A. B. Rose** (2005) Plant gene expression in the age of systems biology: integrating transcriptional and post-transcriptional events. *Trends in Plant Science*, 10, 347-353.
- Bender, J.** (2004) DNA methylation and epigenetics. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 41-68.
- Benedito, V. A., I. Torres-Jerez, J. D. Murray, A. Andriankaja, S. Allen, K. Kakar, M. Wandrey, J. Verdier, H. Zuber, T. Ott, S. Moreau, A. Niebel, T. Frickey, G. Weiller, J. He, X. Dai, P. X. Zhao, Y. Tang & M. K. Udvardi** (2008) A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Journal*, 55, 504-513.
- Berdasco, M., R. Alcazar, M. Victoria Garcia-Ortiz, E. Ballestar, A. F. Fernandez, T. Roldan-Arjona, A. F. Tiburcio, T. Altabella, N. Buisine, H. Quesneville, A. Baudry, L. Lepiniec, M. Alaminos, R. Rodriguez, A. Lloyd, V. Colot, J. Bender, M. Jesus Canal, M. Esteller & M. F. Fraga** (2008) Promoter DNA Hypermethylation and Gene Repression in Undifferentiated *Arabidopsis* Cells. *PLoS One*, 3.
- Bestor, T. H.** (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Human Molecular Genetics*, 9, 2395-2402.
- Beven, A. F., G. G. Simpson, J. W. S. Brown & P. J. Shaw** (1995) The organization of spliceosomal components in the nuclei of higher-plants. *Journal of Cell Science*, 108, 509-518.
- Bhojwani, S. S., J. M. Dunwell & Sunderla.N** (1973) Nucleic-acid and protein contents of embryogenic tobacco pollen. *Journal of Experimental Botany*, 24, 863-871.

- Bibikova, M., L. C. Laurent, B. Ren, J. F. Loring & J.-B. Fan** (2008) Unraveling epigenetic regulation in embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2, 123-134.
- Biggiogera, M.** (2000) 1999: Overview. *European Journal of Histochemistry*, 44, 101-103.
- Biggiogera, M.** (2003) Thinking about the nucleus. *European Journal of Histochemistry*, 47, 91-92.
- Biggiogera, M., M. G. Bottone & C. Pellicciari** (1998) Nuclear RNA is extruded from apoptotic cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 46, 999-1005.
- Biggiogera, M., M. G. Bottone, A. I. Scovassi, C. Soldani, L. Vecchio & C. Pellicciari** (2004) Rearrangement of nuclear ribonucleoprotein (RNP)-containing structures during apoptosis and transcriptional arrest. *Biology of the Cell*, 96, 603-615.
- Biggiogera, M., B. Cisterna, A. Spedito, L. Vecchio & M. Malatesta** (2008) Perichromatin fibrils as early markers of transcriptional alterations. *Differentiation*, 76, 57-65.
- Biggiogera, M., L. Cocco & F. A. Manzoli** (2004) Structure and function of the cell nucleus. *European Journal of Histochemistry*, 48, 1-3.
- Biggiogera, M. & S. Fakan** (2008) Visualization of nuclear organization by ultrastructural cytochemistry. *Introduction to Electron Microscopy for Biologists*, 88, 431-449.
- Biggiogera, M., M. Malatesta, S. Abolhassani-Dadras, F. Amalric, L. I. Rothblum & S. Fakan** (2001) Revealing the unseen: the organizer region of the nucleolus. *Journal of Cell Science*, 114, 3199-3205.
- Biggiogera, M. & C. Pellicciari** (2000) Heterogeneous ectopic RNP-derived structures (HERDS) are markers of transcriptional arrest. *Faseb Journal*, 14, 828-834.
- Billen, D.** (1968) Methylation of bacterial chromosome - An event at replication point. *Journal of Molecular Biology*, 31, 477-&.
- Bird, A. P.** (1978) Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation .2. Symmetry of methylated sites supports semi-conservative copying of methylation pattern. *Journal of Molecular Biology*, 118, 49-60.
- Bisbal, C. & R. H. Silverman** (2007) Diverse functions of RNase L and implications in pathology. *Biochimie*, 89, 789-798.
- Bitonti, M. B., R. Cozza, A. Chiappetta, D. Giannino, M. R. Castiglione, W. Dewitte, D. Mariotti, H. Van Onckelen & A. M. Innocenti** (2002) Distinct nuclear organization, DNA methylation pattern and cytokinin distribution mark juvenile, juvenile-like and adult vegetative apical meristems in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Journal of Experimental Botany*, 53, 1047-1054.
- Blackmore, S., A. H. Wortley, J. J. Skvarla & J. R. Rowley** (2007) Pollen wall development in flowering plants. *New Phytologist*, 174, 483-498.
- Boavida, L. C., J. D. Becker & J. A. Feijo** (2005) The making of gametes in higher plants. *International Journal of Developmental Biology*, 49, 595-614.
- Bock, K. W., D. Honys, J. M. Ward, S. Padmanaban, E. P. Nawrocki, K. D. Hirschi, D. Twell & H. Sze** (2006) Integrating membrane transport with male gametophyte development and function through transcriptomics. *Plant Physiology*, 140, 1151-1168.
- Bogolyubov, D., I. Stepanova & V. Parfenov** (2009) Universal nuclear domains of somatic and germ cells: some lessons from oocyte interchromatin granule cluster and Cajal body structure and molecular composition. *Bioessays*, 31, 400-409.
- Bonet, F. J., L. Azbaid & A. Olmedilla** (1998) Pollen embryogenesis: atavism or totipotency? *Protoplasma*, 202, 115-121.
- Bonneau, L., Y. Ge, G. E. Drury & P. Gallois** (2008) What happened to plant caspases? *Journal of Experimental Botany*, 59, 491-499.

- Boren, M., A.-S. Hoglund, P. Bozhkov & C. Jansson** (2006) Developmental regulation of a VEIDase caspase-like proteolytic activity in barley caryopsis. *Journal of Experimental Botany*, 57, 3747-3753.
- Borg, M., L. Brownfield & D. Twell** (2009) Male gametophyte development: a molecular perspective. *Journal of Experimental Botany*, 60, 1465-1478.
- Bosch, M., A. Y. Cheung & P. K. Hepler** (2005) Pectin methylesterase, a regulator of pollen tube growth. *Plant Physiology*, 138, 1334-1346.
- Bosch, M. & V. E. Franklin-Tong** (2007) Temporal and spatial activation of caspase-like enzymes induced by self-incompatibility in Papaver pollen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 18327-18332.
- Bosch, M. & P. K. Hepler** (2005) Pectin methylesterases and pectin dynamics in pollen tubes. *Plant Cell*, 17, 3219-3226.
- Bozhkov, P. V., L. H. Filonova, M. F. Suarez, A. Helmersson, A. P. Smertenko, B. Zhivotovsky & S. von Arnold** (2004) VEIDase is a principal caspase-like activity involved in plant programmed cell death and essential for embryonic pattern formation. *Cell Death and Differentiation*, 11, 175-182.
- Bozhkov, P. V., A. P. Smertenko & B. Zhivotovsky** (2010) Asparing Out Metacaspases and Caspases: Proteases of Many Trades. *Science Signaling*, 3, 3.
- Bozhkov, P. V., M. F. Suarez, L. H. Filonova, G. Daniel, A. A. Zamyatnin, S. Rodriguez-Nieto, B. Zhivotovsky & A. Smertenko** (2005) Cysteine protease mcl1-Pa executes programmed cell death during plant embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 14463-14468.
- Bradford, M. M.** (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brettell, T. A., J. M. Butler & J. R. Almirall** (2009) Forensic Science. *Analytical Chemistry*, 81, 4695-4711.
- Brooks, J. & G. Shaw.** 1971. Recent developments in the chemistry, biochemistry, geochemistry, and post-tetrad ontogeny os sporopollenins derived from pollen and spore exines. In "Pollen:development and physiology" (J. Heslop-Harrison, Ed.). London: Butterworths.
- Brooks, J. a. S., G.** 1971. Recent developments in the chemistry, biochemistry, geochemistry, and post-tetrad ontogeny os sporopollenins derived from pollen and spore exines. In "Pollen:development and physiology" (J. Heslop-Harrison, Ed.). London: Butterworths.
- Buckner, B., D. Janick-Buckner, J. Gray & G. S. Johal** (1998) Cell-death mechanisms in maize. *Trends in Plant Science*, 3, 218-223.
- Bueno, M. A., A. Gomez, F. Sepulveda, J. M. Segui, P. S. Testillano, J. A. Manzanera & M. C. Risueño** (2003) Microspore-derived embryos from *Quercus suber* anthers mimic zygotic embryos and maintain haploidy in long-term anther culture. *Journal of Plant Physiology*, 160, 953-960.
- Bueno, M. A., B. Pintos, M. Hofer & A. Martin** (2005) Pro-embryos induction from *Olea europaea* L. isolated microspore culture. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27, 695-701.
- Burgess, J.** (1970) Cell shape and mitotic spindle formation in generative cell of endymion-non-scriptus. *Planta*, 95, 72-&.
- Bushell, M., M. Stoneley, P. Sarnow & A. E. Willis** (2004) Translation inhibition during the induction of apoptosis: RNA or protein degradation? *Biochemical Society Transactions*, 32, 606-610.

- Caffall, K. H. & D. Mohnen** (2009) The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344, 1879-1900.
- Callan, J. P., A. M. T. Kim, C. A. D. Roeser, E. Mazur, J. Solis, J. Siegel, C. N. Afonso & J. C. G. de Sande** (2001) Ultrafast Laser-Induced Phase Transitions in Amorphous GeSb Films. *Physical Review Letters*, 86, 3650.
- Calvanese, V., E. Lara, A. Kahn & M. F. Fraga** (2009) The role of epigenetics in aging and age-related diseases. *Ageing Research Reviews*, 8, 268-276.
- Camardella, L., V. Carratore, M. A. Ciardiello, L. Servillo, C. Balestrieri & A. Giovane** (2000) Kiwi protein inhibitor of pectin methylesterase - Amino-acid sequence and structural importance of two disulfide bridges. *European Journal of Biochemistry*, 267, 4561-4565.
- Canales, C., A. M. Bhatt, R. Scott & H. Dickinson** (2002) EXS, a putative LRR receptor kinase, regulates male germline cell number and tapetal identity and promotes seed development in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 12, 1718-1727.
- Cao, X. F., W. Aufsatz, D. Zilberman, M. F. Mette, M. S. Huang, M. Matzke & S. E. Jacobsen** (2003) Role of the DRM and CMT3 Methyltransferases in RNA-directed DNA methylation. *Current Biology*, 13, 2212-2217.
- Cao, X. F. & S. E. Jacobsen** (2002) Role of the *Arabidopsis* DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Current Biology*, 12, 1138-1144.
- Cardinale, S., B. Cisterna, P. Bonetti, C. Aringhieri, M. Biggiogera & S. M. L. Barabino** (2007) Subnuclear localization and dynamics of the pre-mRNA 3' end processing factor mammalian cleavage factor I 68-kDa subunit. *Molecular Biology of the Cell*, 18, 1282-1292.
- Carmofonseca, M., J. Ferreira & A. I. Lamond** (1993) Assembly of SNRNP containing coiled bodies is regulated in interphase and mitosis - Evidence that the coiled body is a kinetic nuclear-structure. *Journal of Cell Biology*, 120, 841-852.
- Carmofonseca, M., R. Pepperkok, M. T. Carvalho & A. I. Lamond** (1992) Transcription-dependent colocalization of the U1, U2, U4/U6, and U5 SNRNPs in coiled bodies. *Journal of Cell Biology*, 117, 1-14.
- Catoire, L., M. Pierron, C. Morvan, C. H. du Penhoat & R. Goldberg** (1998) Investigation of the action patterns of pectinmethylesterase isoforms through kinetic analyses and NMR spectroscopy - Implications in cell wall expansion. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 33150-33156.
- Causevic, A., A. Delaunay, S. Ounnar, M. Righezza, F. Delmotte, F. Brignolas, D. Hagege & S. Maury** (2005) DNA methylating and demethylating treatments modify phenotype and cell wall differentiation state in sugarbeet cell lines. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 681-691.
- Chan, S. W. L., I. R. Henderson & S. E. Jacobsen** (2005) Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics*, 6, 351-360.
- Charne, D. G. & W. D. Beversdorf** (1988) Improving microspore culture as a rapeseed breeding tool - The use of auxins and cytokinins in an induction medium. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, 66, 1671-1675.
- Chen, J. L. & W. D. Beversdorf** (1992) Cryopreservation of isolated microspores of spring rapeseed (*Brassica napus* L.) for *in vitro* embryo production. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 31, 141-149.
- Chen, M. H. & V. Citovsky** (2003) Systemic movement of a tobamovirus requires host cell pectin methylesterase. *Plant Journal*, 35, 386-392.
- Cheng, Z. M. & S. S. Korban** (2011) *In vitro* ploidy manipulation in the genomics era. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 104, 281-282.

- Chinnusamy, V. & J.-K. Zhu** (2009) RNA-directed DNA methylation and demethylation in plants. *Science in China Series C-Life Sciences*, 52, 331-343.
- Chiodi, I., M. Biggiogera, M. Denegri, M. Corioni, F. Weighardt, F. Cobianchi, S. Riva & G. Biamonti** (2000) Structure and dynamics of hnRNP-labelled nuclear bodies induced by stress treatments. *Journal of Cell Science*, 113, 4043-4053.
- Chrysomali, E., N. G. Nikitakis, K. Tosios, J. J. Sauk & S. I. Papanicolaou** (2003) Immunohistochemical evaluation of cell proliferation antigen Ki-67 and apoptosis-related proteins Bcl-2 and caspase-3 in oral granular cell tumor. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*, 96, 566-572.
- Chuong, P. V., C. Deslauriers, L. S. Kott & W. D. Beversdorf** (1988) Effects of donor genotype and bud sampling on microspore culture of *Brassica napus*. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, 66, 1653-1657.
- Chupeau, Y., Caboche, M., and Henry, Y.** 1998. "Androgenesis and haploid plants,.". Heidelberg: Springer-Verlag.
- Cioce, M. & A. I. Lamond** (2005) Cajal bodies: A long history of discovery. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, 105-131.
- Clement, C., Pacini, E., & J. C. Audran.** 2001. Anther and pollen: From biology to biotechnology. Berlin, Heidelberg.: Springer-Verlag.
- Clement, C., L. Chavant, M. Burrus & J. C. Audran** (1994) Anther starch variations in *Lilium* during pollen development. *Sexual Plant Reproduction*, 7, 347-356.
- Clement, C., P. Laporte & J. C. Audran** (1998) The loculus content and tapetum during pollen development in *Lilium*. *Sexual Plant Reproduction*, 11, 94-106.
- Clement, C. & E. Pacini** (2001) Anther plastids in angiosperms. *Botanical Review*, 67, 54-73.
- Cmarko, D., P. J. Verschure, T. E. Martin, M. E. Dahmus, S. Krause, X. D. Fu, R. van Driel & S. Fakan** (1999) Ultrastructural analysis of transcription and splicing in the cell nucleus after bromo-UTP microinjection. *Molecular Biology of the Cell*, 10, 211-223.
- Coffeen, W. C. & T. J. Wolpert** (2004) Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa*. *Plant Cell*, 16, 857-873.
- Cohen, J. J.** (1993) Apoptosis - The physiological pathway of cell death. *Hospital Practice*, 28, 35-43.
- Coimbra, S., M. Costa, B. Jones, M. A. Mendes & L. G. Pereira** (2009) Pollen grain development is compromised in *Arabidopsis* agp6 agp11 null mutants. *Journal of Experimental Botany*, 60, 3133-3142.
- Cokus, S. J., S. H. Feng, X. Y. Zhang, Z. G. Chen, B. Merriman, C. D. Haudenschild, S. Pradhan, S. F. Nelson, M. Pellegrini & S. E. Jacobsen** (2008) Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning. *Nature*, 452, 215-219.
- Coll, N. S., D. Vercammen, A. Smidler, C. Clover, F. Van Breusegem, J. L. Dangl & P. Epple** (2010) *Arabidopsis* Type I Metacaspases Control Cell Death. *Science*, 330, 1393-1397.
- Cordewener, J. H. G., G. Hause, E. Gorgen, R. Busink, B. Hause, H. J. M. Dons, A. A. M. Vanlammeren, M. M. V. Campagne & P. Pechan** (1995) Changes in synthesis and localization of members of the 70-KDA class of heat-shock proteins accompany the induction of embryogenesis in *Bassica-Napus* L microspores. *Planta*, 196, 747-755.

- Coronado, M.** 2002. Desarrollo y embriogénesis del polen en *Nicotiana tabacum* L.: localización y expresión in situ de proteínas implicadas en la transducción de señales. Universidad Complutense de Madrid.
- Coronado, M. J., P. Gonzalez-Melendi, J. M. Segui, C. Ramirez, I. Barany, P. S. Testillano & M. C. Risueño** (2002) MAPKs entry into the nucleus at specific interchromatin domains in plant differentiation and proliferation processes. *Journal of Structural Biology*, 140, 200-213.
- Costa, S. & P. Shaw** (2006) Chromatin organization and cell fate switch respond to positional information in *Arabidopsis*. *Nature*, 439, 493-496.
- Costa, S. & P. Shaw** (2007) 'Open minded' cells: how cells can change fate. *Trends in Cell Biology*, 17, 101-106.
- Coutinho, P. M., M. Starn, E. Blanc & B. Henrissat** (2003) Why are there so many carbohydrate-active enzyme-related genes in plants? *Trends in Plant Science*, 8, 563-565.
- Coventy, J., Kott, L., Beversdorf, W.D.** 1988. Manual formicrospore culture technique for *Brassica napus*. In *Dep. Crop Sci. Technol. Bull.* Guelph, Ontario, Canada: University of Guelph.
- Cremer, T. & C. Cremer** (2001) Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature Reviews Genetics*, 2, 292-301.
- Cremer, T., K. Kupper, S. Dietzel & S. Fakan** (2004) Higher order chromatin architecture in the cell nucleus: on the way from structure to function. *Biology of the Cell*, 96, 555-567.
- Cresti, M., F. Ciampolini & S. Sansavini** (1980) Ultrastructural and histochemical features of pistil of *Mauls communis* - The stylar transmitting tissue. *Scientia Horticulturae*, 12, 327-337.
- Cresti, M., Paccini, E., sarfatti, G., & C. Simoncioti.** 1975. Ultrastructural features and storage function of *Lycopersicum peruvianum* pollen. In "Gamete competition in plants and animals" (D. Mulcahy, Ed.). Amsterdam: North-Holland publ.
- Crompton, C.** 1981. Pollen grains and byosistematics. *Can J Bot* 60:294-300.
- Custers, J. B. M.** 2003. Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus*).
- Custers, J. B. M., J. H. G. Cordewener, Y. Nollen, H. J. M. Dons & M. M. V. Campagne** (1994) Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus*. *Plant Cell Reports*, 13, 267-271.
- Dafni, A., Hesse, M, and Pacini, E.** 2000. *Pollen and pollination*. New York.
- Dahleen, L. S.** (1999) Donor-plant environment Effects on regeneration from barley embryo-derived callus. *Crop Science*, 39, 682-685.
- D'Amato, G., L. Cecchi, S. Bonini, C. Nunes, I. Annesi-Maesano, H. Behrendt, G. Liccardi, T. Popov & P. van Cauwenberge** (2007) Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy*, 62, 976-990.
- Danon, A., V. I. Rotari, A. Gordon, N. Mailhac & P. Gallois** (2004) Ultraviolet-C overexposure induces programmed cell death in *Arabidopsis*, which is mediated by caspase-like activities and which can be suppressed by caspase inhibitors, p35 and Defender against Apoptotic Death. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 779-787.
- Datta, R., K. C. Chamusco & P. S. Chourey** (2002) Starch biosynthesis during pollen maturation is associated with altered patterns of gene expression in maize. *Plant Physiology*, 130, 1645-1656.
- Datta, S. K.** (2005) Androgenic haploids: Factors controlling development and its application in crop improvement. *Current Science*, 89, 1870-1878.

- de Halac, I. N., I. A. Cismondi, M. I. Rodríguez-García & G. Fama (2003) Distribution of pectins in the pollen apertures of *Oenothera hookeri*. velans ster/+ster. *Biocell*, 27, 11-18.
- del Pozo, O. & E. Lam (1998) Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Current Biology*, 8, 1129-1132.
- del Pozo, O. & E. Lam (2003) Expression of the baculovirus p35 protein in tobacco affects cell death progression and compromises N gene-mediated disease resistance response to tobacco mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16, 485-494.
- Delapena, A., H. Lorz & J. Schell (1987) Transgenic rye plants obtained by injecting DNA into young floral tillers. *Nature*, 325, 274-276.
- Dolan, L., P. Linstead & K. Roberts (1997) Developmental regulation of pectic polysaccharides in the root meristem of *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 48, 713-720.
- Dominguez, E., J. A. Mercado, M. A. Quesada & A. Heredia (1999) Pollen sporopollenin: degradation and structural elucidation. *Sexual Plant Reproduction*, 12, 171-178.
- Domozych, D. S., S. Kiemle, C. E. Domozych & M. R. Gretz (2006) How symmetrical are desmids? Cell wall chemistry and development in *Penium margaritaceum*. *Journal of Phycology*, 42, 47-47.
- Dubois, T., M. Guedira, J. Dubois & J. Vasseur (1991) Direct somatic embryogenesis in leaves of cichorium - A histological and sem study of early stages. *Protoplasma*, 162, 120-127.
- Dumas, C. & P. Rogowsky (2008) Fertilization and early seed formation. *Comptes Rendus Biologies*, 331, 715-725.
- Dundr, M. & T. Misteli (2001) Functional architecture in the cell nucleus. *Biochemical Journal*, 356, 297-310.
- Dunwell, J. M. 1985. Embryogenesis from pollen *in vitro*. In "Biotechnology in plant science, relevance to agriculture in the eighties" (M. Zaitlin, P. Day, and A. Hollaender, Eds.). San Diego, New York.: Academic Press Inc.
- Dunwell, J. M. (2010) Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnology Journal*, 377-424.
- Dunwell, J. M., M. Cornish & A. G. L. Decourcel (1985) Influence of genotype, plant-growth temperature and anther incubation-temperature on microspore embryo production in *Brassica napus* SSP oleifera. *Journal of Experimental Botany*, 36, 679-689.
- Dunwell, J. M. & N. Thurling (1985) Role of sucrose in microspore embryo production in *Brassica napus* SSP oleifera. *Journal of Experimental Botany*, 36, 1478-1491.
- Dunwell, J. M., M. J. Wilkinson, S. Nelson, S. Wening, A. C. Sitorus, D. Mienanti, Y. Alfiko, A. E. Croxford, C. S. Ford, B. P. Forster & P. D. S. Caligari (2010) Production of haploids and doubled haploids in oil palm. *Bmc Plant Biology*, 10.
- Dyachenko, O. V., T. V. Shevchuk & Y. I. Buryanov (2010) Structural and functional features of the 5-methylcytosine distribution in the eukaryotic genome. *Molecular Biology*, 44, 171-185.
- E, H.-B. 1989. *Isolated pollen culture in tobacco: plant reproductive development in a nutshell*.
- Eady, C., K. Lindsey & D. Twell (1995) The significance of microspore division and division symmetry for vegetative cell-specific transcription and generative cell-differentiation. *Plant Cell*, 7, 65-74.
- Echlin, P. (1972) Ultrastructure and ontogeny of pollen in *Helleborus-Foetidus* L. 4. Pollen grain maturation. *Journal of Cell Science*, 11, 111-&.

- Edlund, A. F., R. Swanson & D. Preuss** (2004) Pollen and stigma structure and function: The role of diversity in pollination. *Plant Cell*, 16, S84-S97.
- Elmore, S.** (2007) Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35, 495-516.
- Erdtman, G.** 1966. Pollen morphology and plant taxonomy, angiosperms. New York: Hafne.
- Erdtman, G.** 1969. Handbook of Palynology. Copenhagen: Munksgaard.
- Erdtman, H.** (1965) [Nobel prize in chemistry 1965 (Robert Burns Woodward)]. *Nord Med*, 74, 1277-81.
- Erdtman, H.** (1965) [Nobel Prize in chemistry, 1965 (Robert Burns Woodward)]. *Sven Farm Tidsskr*, 69, 1013-20.
- Espada, J., E. Ballestar, R. Santoro, M. F. Fraga, A. Villar-Garea, A. Nemeth, L. Lopez-Serra, S. Roper, A. Aranda, H. Orozco, V. Moreno, A. Juaranz, J. C. Stockert, G. Langst, I. Grummt, W. Bickmore & M. Esteller** (2007) Epigenetic disruption of ribosomal RNA genes and nucleolar architecture in DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) deficient cells. *Nucleic Acids Research*, 35, 2191-2198.
- Espada, J. & M. Esteller** (2007) Epigenetic control of nuclear architecture. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 449-457.
- Espada, J. & M. Esteller** (2010) DNA methylation and the functional organization of the nuclear compartment. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21, 238-246.
- Exner, V. & L. Hennig** (2008) Chromatin rearrangements in development. *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 64-69.
- Fabian, D., A. Bukovska, S. Juhas & J. Koppel** (2009) Apoptotic processes and DNA cytosine methylation in mouse embryos arrested at the 2-cell stage. *Zygote*, 17, 269-279.
- Fadón, B.** 1993. Estudio ultraestructural y detección in situ de macromoléculas durante el desarrollo del polen de *Capsicum annum* L. en relación con el proceso de inducción de la androgénesis. Universidad Complutense de Madrid.
- Faegry, K. & I. J.** 1964. Text book of pollen analysis. New York: Hafner.
- Faegry, K. a. I. J.** 1964. Text book of pollen analysis. New York: Hafner.
- Fakan, S.** (2004) The functional architecture of the nucleus as analysed by ultrastructural cytochemistry. *Histochemistry and Cell Biology*, 122, 83-93.
- Fakan, S.** (2004) Ultrastructural cytochemical analyses of nuclear functional architecture. *European Journal of Histochemistry*, 48, 5-14.
- Fakan, S. & R. Van Driel** (2004) Where do we go in the nucleus? *Biology of the Cell*, 96, 553-554.
- Fakan, S. a. P., E.** (1980a) The ultrastructural visualization of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and distribution.
- Fan, Z., K. C. Armstrong & W. A. Keller** (1988) Development of microspores *in vivo* and *in vitro* in *Brassica napus* L. *Protoplasma*, 147, 191-199.
- Fang, Y. D., S. Hearn & D. L. Spector** (2004) Tissue-specific expression and dynamic organization of SR splicing factors in *Arabidopsis*. *Molecular Biology of the Cell*, 15, 2664-2673.
- Feijo, J. A. & M. S. S. Pais** (1988) Ultrastructural modifications of plastids and starch metabolism during the microsporogenesis of *Ophrys-Lutea* (orchidaceae). *Annals of Botany*, 61, 215-219.
- Feng, S. H. & S. E. Jacobsen** (2011) Epigenetic modifications in plants: an evolutionary perspective. *Current Opinion in Plant Biology*, 14, 179-186.

- Ferguson, I. K. & J. Muller.** 1976. The evolutionary significance of exine. London: Academic press.
- Ferrando-May, E.** (2005) Nucleocytoplasmic transport in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 12, 1263-1276.
- Ferrie, A. M. R.** (2007) Doubled haploid production in nutraceutical species: a review. *Euphytica*, 158, 347-357.
- Ferrie, A. M. R.** (2009) Current Status of Doubled Haploids in Medicinal Plants. *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, 209-217.
- Ferrie, A. M. R., T. D. Bethune & M. Mykytyshyn** (2011) Microspore embryogenesis in Apiaceae. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 104, 399-406.
- Ferrie, A. M. R. & K. L. Caswell** (2011) Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 104, 301-309.
- Ferrie, A. M. R., J. Dirpaul, P. Krishna, J. Krochko & W. A. Keller** (2005) Effects of brassinosteroids on microspore embryogenesis in Brassica species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41, 742-745.
- Ferrie, A. M. R. & C. Mollers** (2011) Haploids and doubled haploids in Brassica spp. for genetic and genomic research. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 104, 375-386.
- Finnegan, E. J. & E. S. Dennis** (1993) Isolation and identification by sequence homology of a putative cytosine methyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research*, 21, 2383-2388.
- Finnegan, E. J., R. K. Genger, W. J. Peacock & E. S. Dennis** (1998) DNA methylation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 223-247.
- Finnegan, E. J. & K. A. Kovac** (2000) Plant DNA methyltransferases. *Plant Molecular Biology*, 43, 189-201.
- Finnegan, E. J., W. J. Peacock & E. S. Dennis** (1996) Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 8449-8454.
- Finnegan, E. J., W. J. Peacock & E. S. Dennis** (2000) DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 10, 217-223.
- FitzGerald, J., M. Luo, A. Chaudhury & F. Berger** (2008) DNA Methylation Causes Predominant Maternal Controls of Plant Embryo Growth. *Plos One*, 3.
- Foroughiwehr, B., G. Mix, H. Gaul & H. M. Wilson** (1976) Plant production from cultured anthers of *Hordeum-Vulgare-L.* *Zeitschrift Fur Pflanzenzuchtung-Journal of Plant Breeding*, 77, 198-204.
- Forster, B. P., E. Heberle-Bors, K. J. Kasha & A. Touraev** (2007) The resurgence of haploids in higher plants. *Trends in Plant Science*, 12, 368-375.
- Fortes, A. M., P. S. Testillano, M. D. Risueño & M. S. Pais** (2002) Studies on callose and cutin during the expression of competence and determination for organogenic nodule formation from internodes of *Humulus lupulus* var. Nugget. *Physiologia Plantarum*, 116, 113-120.
- Foster, H. A. & J. M. Bridger** (2005) The genome and the nucleus: a marriage made by evolution - Genome organisation and nuclear architecture. *Chromosoma*, 114, 212-229.
- Fraga, M. F.** (2009) Genetic and epigenetic regulation of aging. *Current Opinion in Immunology*, 21, 446-453.

- Fraga, M. F., E. Ballestar & M. Esteller** (2003) Capillary electrophoresis-based method to quantitate DNA-protein interactions. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 789, 431-435.
- Fraga, M. F. & M. Esteller** (2007) Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends in Genetics*, 23, 413-418.
- Fraga, M. F., R. Rodriguez & M. J. Canal** (2000) Rapid quantification of DNA methylation by high performance capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 21, 2990-2994.
- Fraga, M. F., E. Uriol, L. B. Diego, M. Berdasco, M. Esteller, M. J. Canal & R. Rodriguez** (2002) High-performance capillary electrophoretic method for the quantification of 5-methyl 2'-deoxycytidine in genomic DNA: Application to plant, animal and human cancer tissues. *Electrophoresis*, 23, 1677-1681.
- Francastel, C., D. Schubeler, D. I. K. Martin & M. Groudine** (2000) Nuclear compartmentalization and gene activity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1, 137-143.
- Franchi, G. G., L. Bellani, M. Nepi & E. Pacini** (1996) Types of carbohydrate reserves in pollen: Localization, systematic distribution and ecophysiological significance. *Flora*, 191, 143-159.
- Frankis, R. & J. P. Mascarenhas** (1980) Messenger-RNA in the ungerminated pollen grain - A direct demonstration of its presence. *Annals of Botany*, 45, 595-&.
- Frasca, D., D. Nguyen, R. L. Riley & B. B. Blomberg** (2003) Decreased E12 and/or E47 transcription factor activity in the bone marrow as well as in the spleen of aged mice. *Journal of Immunology*, 170, 719-726.
- Fraschini, A., M. G. Bottone, A. I. Scovassi, M. Denegri, M. C. Risueño, P. S. Testillano, T. E. Martin, M. Biggiogera & C. Pellicciari** (2005) Changes in extranucleolar transcription during actinomycin D-induced apoptosis. *Histology and Histopathology*, 20, 107-117.
- Fry, S. C.** (2004) Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytologist*, 161, 641-675.
- Fry, S. C., S. Aldington, P. R. Hetherington & J. Aitken** (1993) Oligosaccharides as signals and substrates in the plant-cell wall. *Plant Physiology*, 103, 1-5.
- Fuchs, J., D. Demidov, A. Houben & I. Schubert** (2006) Chromosomal histone modification patterns - from conservation to diversity. *Trends in Plant Science*, 11, 199-208.
- Fuks, F.** (2005) DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15, 490-495.
- Fullgrabe, J., N. Hajji & B. Joseph** (2010) Cracking the death code: apoptosis-related histone modifications. *Cell Death and Differentiation*, 17, 1238-1243.
- Furner, I. J. & M. Matzke** (2011) Methylation and demethylation of the *Arabidopsis* genome. *Current Opinion in Plant Biology*, 14, 137-141.
- G. Hause, B. H.** 1996. Induction of embryogenesis in isolated microspores and pollen of *Brassica napus* L. In *Wageningen*. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Agricultural University.
- Gadjev, I., J. M. Stone & T. S. Gechev** (2008) Programmed cell death in plants: New insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. *International Review of Cell and Molecular Biology*, Vol 270, 270, 87-144.
- Gaffal, K. P., G. J. Friedrichs & S. El-Gammal** (2007) Ultrastructural evidence for a dual function of the phloem and programmed cell death in the floral nectary of *Digitalis purpurea*. *Annals of Botany*, 99, 593-607.

- Galbraith, D. W.** (1981) Microfluorimetric quantitation of cellulose biosynthesis by plant-protoplasts using calcofluor white. *Physiologia Plantarum*, 53, 111-116.
- Gechev, T. S., F. Van Breusegem, J. M. Stone, I. Denev & C. Laloi** (2006) Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays*, 28, 1091-1101.
- Gehring, M., Y. Choi & R. L. Fischer** (2004) Imprinting and seed development. *Plant Cell*, 16, S203-S213.
- Gehring, M. & S. Henikoff** (2007) DNA methylation dynamics in plant genomes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Genes Structure and Expression*, 1769, 276-286.
- Gehring, M., W. Reik & S. Henikoff** (2009) DNA demethylation by DNA repair. *Trends in Genetics*, 25, 82-90.
- Geitmann, A., J. Hudak, F. Vennigerholz & B. Walles** (1995) Immunogold localization of pectin and callose in pollen grains and pollen tubes of *Brugmansia suaveolens* - Implications for the self-incompatibility reaction. *Journal of Plant Physiology*, 147, 225-235.
- Genger, R. K., K. A. Kovac, E. S. Dennis, W. J. Peacock & E. J. Finnegan** (1999) Multiple DNA methyltransferase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 41, 269-278.
- Germana, M. A.** (2009) Haploids and Doubled Haploids in Fruit Trees. *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, 241-263.
- Germana, M. A.** (2011) Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 104, 283-300.
- Germana, M. A.** (2011) Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Reports*, 30, 839-857.
- Germana, M. A., B. Chiancone, N. L. Guarda, P. S. Testillano & M. C. Risueño** (2006) Development of multicellular pollen of *Eriobotrya japonica* Lindl. through anther culture. *Plant Science*, 171, 718-725.
- Germana, M. A., B. Chiancone, D. Padoan, I. Barany, M.-C. Risueño & P. S. Testillano** (2011) First stages of microspore reprogramming to embryogenesis through anther culture in *Prunus armeniaca* L. *Environmental and Experimental Botany*, 71, 152-157.
- Germana, M. A., M. Micheli & A. Standardi** (2005) Preliminary results on ex-vitro conversion of encapsulated somatic embryos of *Citrus reticulata* Blanco (cv. Mandarin Tardivo di Ciaculli). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 47, 55-55.
- Gervais, F. G., N. A. Thornberry, S. C. Ruffolo, D. W. Nicholson & S. Roy** (1998) Caspases cleave focal adhesion kinase during apoptosis to generate a FRNK-like polypeptide. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 17102-17108.
- Gimenezm.G, M. C. Risueño & Lopezxae.Jf** (1969) Generative cell envelope in pollen grains as a secretion system, a postulate. *Protoplasma*, 67, 223-&.
- Giovane, A., L. Servillo, C. Balestrieri, A. Raiola, R. D'Avino, M. Tamburrini, M. A. Clardiello & L. Camardella** (2004) Pectin methylesterase inhibitor. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1696, 245-252.
- Gland, A., R. Lichter & H. G. Schweiger** (1988) Genetic and exogenous factors affecting embryogenesis in isolated microspore cultures of *Brassica napus* *Journal of Plant Physiology*, 132, 613-617.
- Gola, G., Negri, G, & C. Capelleti.** 1959. Tratado de Botánica. Barcelona: Labor.
- Goldberg, R., C. Morvan & J. C. Roland** (1986) Composition, properties and localization of pectins in young and mature cells of the mung bean hypocotyl. *Plant and Cell Physiology*, 27, 417-429.

- Goldberg, R. B.** (1988) Plants - Novel developmental processes. *Science*, 240, 1460-1467.
- Goldberg, R. B.** (2001) From cot curves to genomics. How gene cloning established new concepts in plant biology. *Plant Physiology*, 125, 4-8.
- Goldberg, R. B., S. J. Barker & L. Perezgrau** (1989) Regulation of gene-expression during plant embryogenesis. *Cell*, 56, 149-160.
- Goldberg, R. B., G. Depaiva & R. Yadegari** (1994) Plant embryogenesis - Zygote to seed. *Science*, 266, 605-614.
- González-Melendi, P.** 1996. Caracterización in situ mediante sondas moleculares del proceso de inducción de embriogénesis del polen en *Capsicum annuum* L. Universidad Complutense de Madrid.
- Gonzalez-Melendi, P., P. S. Testillano, P. Ahmadian, B. Fadon & M. C. Risueño** (1996) New in situ approaches to study the induction of pollen embryogenesis in *Capsicum annuum* L. *European Journal of Cell Biology*, 69, 373-386.
- Gonzalez-Melendi, P., P. S. Testillano, P. Ahmadian, B. Fadon, O. Vicente & M. C. Risueño** (1995) In-situ characterization of the late vacuolate microspore as a convenient stage to induce embryogenesis in capsicum. *Protoplasma*, 187, 60-71.
- Gonzalez-Melendi, P., P. S. Testillano, C. G. Mena, S. Muller, I. Raska & M. C. Risueño** (1998) Histones and DNA ultrastructural distribution in plant cell nucleus: A combination of immunogold and cytochemical methods. *Experimental Cell Research*, 242, 45-59.
- Gonzalez-Melendi, P., M. Uyttewaal, C. N. Morcillo, J. R. H. Mora, S. Fajardo, F. Budar & M. M. Lucas** (2008) A light and electron microscopy analysis of the events leading to male sterility in Ogu-INRA CMS of rapeseed (*Brassica napus*). *Journal of Experimental Botany*, 59, 827-838.
- Goodrich, J. & S. Tweedie** (2002) Remembrance of things past: Chromatin remodeling in plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 18, 707-746.
- Gorska-Btylass, A.** 1967. Transitory callose envelope surrounding the generative cell in pollen grains. *Acta Soc f3of Poloniae*, 38.
- Gown, A. M. & M. C. Willingham** (2002) Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: Immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 50, 449-454.
- Grafi, G., V. Chalifa-Caspi, T. Nagar, I. Plaschkes, S. Barak & V. Ransbotyn** (2011) Plant response to stress meets dedifferentiation. *Planta*, 233, 433-438.
- Grant-Downton, R. T. & H. G. Dickinson** (2005) Epigenetics and its implications for plant biology. 1. The epigenetic network in plants. *Annals of Botany*, 96, 1143-1164.
- Grant-Downton, R. T. & H. G. Dickinson** (2006) Epigenetics and its implications for plant biology 2. The 'epigenetic epiphany': Epigenetics, evolution and beyond. *Annals of Botany*, 97, 11-27.
- Gray, N. K. & M. Wickens** (1998) Control of translation initiation in animals. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 14, 399-458.
- Gruenbaum, Y., T. Navehmany, H. Cedar & A. Razin** (1981) Sequence specificity of methylation in higher-plant DNA. *Nature*, 292, 860-862.
- Gu, H. H., P. Hagberg & W. J. Zhou** (2004) Cold pretreatment enhances microspore embryogenesis in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Growth Regulation*, 42, 137-143.
- Guglielmino, N., M. Liberman, A. M. Catesson, A. Mareck, R. Prat, S. Mutafschiev & R. Goldberg** (1997) Pectin methylesterases from poplar cambium and inner bark: Localization, properties and seasonal changes. *Planta*, 202, 70-75.
- Guha, S. & S. C. Maheshwari** (1964) *In vitro* production of embryis form anthers of datura. *Nature*, 204, 497-&.

- Guo, Y. D. & S. Pulli** (1996) High-frequency embryogenesis in *Brassica campestris* microspore culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 46, 219-225.
- Hansen, C. M., D. Hansen, P. K. Holm, R. Larsson & L. Binderup** (2000) Cyanoguanidine CHS 828 induces programmed cell death with apoptotic features in human breast cancer cells *in vitro*. *Anticancer Research*, 20, 4211-4220.
- Hasbun, R., L. Valledor, M. Berdasco, E. Santamaria, M. J. Canal, R. Rodriguez, D. Rios & M. Sanchez**. 2005. *In vitro* proliferation and genome DNA methylation in adult chestnuts. In *Proceedings of the Third International Chestnut Congress*, eds. C. G. Abreu, E. Rosa & A. A. Monteiro, 333-339.
- Hasbun, R., L. Valledor, J. L. Rodriguez, E. Santamaria, D. Rios, M. Sanchez, M. J. Canal & R. Rodriguez** (2008) HPLC quantification of 5-methyl-2'-deoxycytidine in genomic DNA: Methodological optimization for chestnut and other woody species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46, 815-822.
- Hasbun, R., L. Valledor, E. Santamaria, M. J. Canal, R. Rodriguez, M. Berdasco & E. Grp** (2007) Dynamics of DNA methylation in chestnut trees development. *Proceedings of the Second International Symposium on Plant Genetic Resources of Horticultural Crops, Vols 1 and 2*, 563-566.
- Hasegawa, Y., S. Nakamura, E. Uheda & N. Nakamura** (2000) Immunolocalization and possible roles of pectins during pollen growth and callose plug formation in angiosperms. *Grana*, 39, 46-55.
- Hatsugai, N., M. Kuroyanagi, K. Yamada, T. Meshi, S. Tsuda, M. Kondo, M. Nishimura & I. Hara-Nishimura** (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science*, 305, 855-858.
- Hause, B., W. L. H. Vanveenendaal, G. Hause & A. A. M. Vanlammeren** (1994) Expression of polarity during early development of microspore-derived and zygotic embryos of *Brassica napus* L. CV topas. *Botanica Acta*, 107, 407-415.
- Hause, G. & H. Hahn** (1998) Cytological characterization of multicellular structures in embryogenic microspore cultures of *Brassica napus* L. *Botanica Acta*, 111, 204-211.
- Havlis, J. & M. Trbusek** (2002) 5-Methylcytosine as a marker for the monitoring of DNA methylation. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 781, 373-392.
- He, R., G. E. Drury, V. I. Rotari, A. Gordon, M. Willer, T. Farzaneh, E. J. Woltering & P. Gallois** (2008) Metacaspase-8 modulates programmed cell death induced by ultraviolet light and H₂O₂ in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 774-783.
- He, X. J., T. P. Chen & J. K. Zhu** (2011) Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Research*, 21, 442-465.
- Heberleborgs, E.** (1982) *In vitro* pollen embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L. and its relation to pollen sterility, sex balance, and floral induction of the pollen donor plants. *Planta*, 156, 396-401.
- Heberleborgs, E.** (1985) *In vitro* haploid formation from pollen - A critical review. *Theoretical and Applied Genetics*, 71, 361-374.
- Heberle-Bors, E., Benito-Moreno, R. M., Alwen, A., Stöger, E., & O. Vicente**. 1990. Transformation of pollen. In "Progress in Plant Cellular and Molecular Biology" (H. J. Nijkamp, L. H. Van Der Plaas, and J. Van Aartrijk, Eds.). Dordrecht, Boston, London: Kluwer.
- Heberle-Bors, E., V. Voronin, A. Touraev, P. S. Testillano, M. C. Risueño & C. Wilson** (2001) MAP kinase signaling during pollen development. *Sexual Plant Reproduction*, 14, 15-19.

- Hematy, K., C. Cherk & S. Somerville** (2009) Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 406-413.
- Henikoff, S. & L. Comai** (1998) A DNA methyltransferase homolog with a chromodomain exists in multiple polymorphic forms in *Arabidopsis*. *Genetics*, 149, 307-318.
- Henikoff, S. & F. Grosveld** (2008) Welcome to Epigenetics & Chromatin. *Epigenetics & Chromatin*, 1, 2.
- Henikoff, S., B. D. Strahl & P. E. Warburton** (2008) Epigenomics: A Roadmap to Chromatin. *Science*, 322, 853-853.
- Hermann, P. M. & B. E. Palser** (2000) Stamen development in the Ericaceae. I. Anther wall, microsporogenesis, inversion, and appendages. *American Journal of Botany*, 87, 934-957.
- Hernandez-Verdun, D.** (2006) Nucleolus: from structure to dynamics. *Histochemistry and Cell Biology*, 125, 127-137.
- Heslopha, J.** (1966) Cytoplasmic connexions between angiosperm meiocytes. *Annals of Botany*, 30, 221-&.
- Heslopha, J.** (1968) Pollen wall development. *Science*, 161, 230-&.
- Heslopha, J.** (1968) Tapetal origin of pollen-coat substances in *Lilium*. *New Phytologist*, 67, 779-&.
- Heslopharrison, J.** (1975) Physiology of pollen grain surface. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 190, 275-&.
- Heslopharrison, J.** (1979) Pollen walls as adaptive systems. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 66, 813-829.
- Heslopharrison, J.** (1987) Pollen germination and pollen-tube growth. *International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology*, 107, 1-78.
- Heslop-Harrison, J.** 1963. An ultrastructural study of pollen wall ontogeny in *Silene Pendula*. *Grana Palynol* 4.
- Heslop-Harrison, J.** 1971. The pollen wall: structure and development. In "Pollen: development and physiology" (J. Heslop-Harrison, Ed.). London.: Butterfield and Co.
- Heslop-Harrison, J.** 1979. Aspects of the structure, cytochemistry and germination of the pollen of rye (*Secale cereale* L.). *Ann Bot Suppl* 1:1-47.
- Hess, D.** (1987) Pollen-based techniques in genetic manipulation. *International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology*, 107, 367-395.
- Hess, M. W. & A. Frosch** (1994) Subunits of forming pollen exine and ubisch bodies as seen in freeze-substituted *Ldebouria-Socialis roth* (Hyacinthaceae). *Protoplasma*, 182, 10-14.
- Hesse, M.** (2000) Pollen wall stratification and pollination. *Plant Systematics and Evolution*, 222, 1-17.
- Hidaka T, Y. Y., Shichijo T.** 1979. *In vitro* differentiation of haploid plants by anther culture in *Poncirus trifoliata*.
- Hidaka T, Y. Y., Shichijo T.** 1981. *Plantlet formation from anthers of Citrus aurantium L.*
- Hidalgo, P. J., M. Hesse, J. L. Ubers & A. Frosch-Radivo** (1999) Microsporogenesis in male sterile *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae), an ultrastructural study. *Grana*, 38, 343-355.
- Hoat, T. X., H. Nakayashiki, Y. Tosa & S. Mayama** (2006) Specific cleavage of ribosomal RNA and mRNA during victorin-induced apoptotic cell death in oat. *Plant Journal*, 46, 922-933.

- Hong, M. J., D. Y. Kim, T. G. Lee, W. B. Jeon & Y. W. Seo (2010) Functional characterization of pectin methylesterase inhibitor (PMEI) in wheat. *Genes & Genetic Systems*, 85, 97-106.
- Honys, D., J. P. Combe, D. Twell & V. Capkova (2000) The translationally repressed pollen-specific ntp303 mRNA is stored in non-polysomal mRNPs during pollen maturation. *Sexual Plant Reproduction*, 13, 135-144.
- Honys, D., S.-A. Oh, D. Renak, M. Donders, B. Solcova, J. A. Johnson, R. Boudova & D. Twell (2006) Identification of microspore-active promoters that allow targeted manipulation of gene expression at early stages of microgametogenesis in *Arabidopsis*. *Bmc Plant Biology*, 6.
- Honys, D. & D. Twell (2003) Comparative analysis of the *Arabidopsis* pollen transcriptome. *Plant Physiology*, 132, 640-652.
- Honys, D. & D. Twell (2004) Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Genome Biology*, 5.
- Hosp, J., S. de Faria Maraschin, A. Touraev & K. Boutilier (2007) Functional genomics of microspore embryogenesis. *Euphytica*, 158, 275-285.
- Hosp, J., A. Tashpulatov, U. Roessner, E. Barsova, H. Katholnigg, R. Steinborn, B. Melikant, S. Lukyanov, E. Heberle-Bors & A. Touraev (2007) Transcriptional and metabolic profiles of stress-induced, embryogenic tobacco microspores. *Plant Molecular Biology*, 63, 137-149.
- Hotchkiss, R. D. (1948) The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *Journal of Biological Chemistry*, 175, 315-332.
- Hsieh, C. L. (2000) Dynamics of DNA methylation pattern. *Current Opinion in Genetics & Development*, 10, 224-228.
- Huh, J. H., M. J. Bauer, T.-F. Hsieh & R. L. Fischer (2008) Cellular programming of plant gene imprinting. *Cell*, 132, 735-744.
- Iida, T., I. Suetake, S. Tajima, H. Morioka, S. Ohta, C. Obuse & T. Tsurimoto (2002) PCNA clamp facilitates action of DNA cytosine methyltransferase 1 on hemimethylated DNA. *Genes to Cells*, 7, 997-1007.
- Ilic-Grubor, K., S. M. Attree & L. C. Fowke (1998) Comparative morphological study of zygotic and microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. as revealed by scanning electron microscopy. *Annals of Botany*, 82, 157-165.
- Inagaki, S. & T. Kakutani (2010) Control of genic DNA methylation in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Research*, 123, 299-302.
- Jacobs, T. (1992) Control of the cell-cycle. *Developmental Biology*, 153, 1-15.
- Jacquard, C., F. Nolin, C. Hecart, D. Grauda, I. Rashal, S. Dhondt-Cordelier, R. S. Sangwan, P. Devaux, F. Mazeyrat-Gourbeyre & C. Clement (2009) Microspore embryogenesis and programmed cell death in barley: effects of copper on albinism in recalcitrant cultivars. *Plant Cell Reports*, 28, 1329-1339.
- Jacquard C, W. G., Clement C. 2003. Anther culture in barley. In: Maluszynsky M, Kasha KJ, Forster BP, Szaejko I (eds) FAO-IAEA. Doubled haploid production in crop plants. A manual. Dordrecht: Kluwer.
- Jain SM, S. S., Veilleux RE. 1996. *In vitro* haploid production in higher plants. Dordrecht: Kluwer.
- Janousek, B., S. Matsunaga, E. Kejnovsky, J. Ziuvoval & B. Vyskot (2002) DNA methylation analysis of a male reproductive organ specific gene (MROS1) during pollen development. *Genome*, 45, 930-938.
- Janousek, B., J. Zluvoval & B. Vyskot (2000) Histone H4 acetylation and DNA methylation dynamics during pollen development. *Protoplasma*, 211, 116-122.

- Jeltsch, A.** (2002) Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases (Vol 3, pg 274, 2002). *ChemBiochem*, 3, 382-382.
- Jenuwein, T. & C. D. Allis** (2001) Translating the histone code. *Science*, 293, 1074-1080.
- Johansson, K., M. El-Ahmad, R. Friemann, H. Jornvall, O. Markovic & H. Eklund** (2002) Crystal structure of plant pectin methylesterase. *Febs Letters*, 514, 243-249.
- Johri, B. M.** 1984. Experimental embryology of angiosperms. Berlin: Springer-Verlag.
- Jolie, R. P., T. Duvetter, A. M. Van Loey & M. E. Hendrickx** (2010) Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review. *Carbohydrate Research*, 345, 2583-2595.
- Jones, L., J. L. Milne, D. Ashford, M. C. McCann & S. J. McQueen-Mason** (2005) A conserved functional role of pectic polymers in stomatal guard cells from a range of plant species. *Planta*, 221, 255-264.
- Jones, L., J. L. Milne, D. Ashford & S. J. McQueen-Mason** (2003) Cell wall arabinan is essential for guard cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 11783-11788.
- Joosen, R., J. Cordewener, E. D. J. Supena, O. Vorst, M. Lammers, C. Maliepaard, T. Zeilmaier, B. Miki, T. America, J. Custers & K. Boutilier** (2007) Combined transcriptome and proteome analysis identifies pathways and markers associated with the establishment of rapeseed microspore-derived embryo development. *Plant Physiology*, 144, 155-172.
- Juge, N.** (2006) Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes. *Trends in Plant Science*, 11, 359-367.
- Jullien, P. E. & F. Berger** (2010) DNA methylation reprogramming during plant sexual reproduction? *Trends in Genetics*, 26, 394-399.
- Jullien, P. E., T. Kinoshita, N. Ohad & F. Berger** (2006) Maintenance of DNA methylation during the *Arabidopsis* life cycle is essential for parental imprinting. *Plant Cell*, 18, 1360-1372.
- Jullien, P. E., A. Mosquna, M. Ingouff, T. Sakata, N. Ohad & F. Berger** (2008) Retinoblastoma and its binding partner MSI1 control imprinting in *Arabidopsis*. *PLoS Biology*, 6, 1693-1705.
- Jurgens, G.** (1995) Axis formation in plant embryogenesis - Cues and clues. *Cell*, 81, 467-470.
- Kaiser, C. L., B. J. Chapman, J. L. Guidi, C. E. Terry, D. A. Mangiardi & D. A. Cotanche** (2008) Comparison of activated caspase detection methods in the gentamicin-treated chick cochlea. *Hearing Research*, 240, 1-11.
- Kakutani, T., J. A. Jeddloh & E. J. Richards** (1995) Characterization of an *Arabidopsis thaliana* DNA hypomethylation mutant. *Nucleic Acids Research*, 23, 130-137.
- Kaufmann, S. H., S. Desnoyers, Y. Ottaviano, N. E. Davidson & G. G. Poirier** (1993) Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-Ribose) polymerase - An early marker of chemotherapy-Inducted apoptosis. *Cancer Research*, 53, 3976-3985.
- Kawanabe, T., T. Ariizumi, M. Kawai-Yamada, H. Uchimiya & K. Toriyama** (2006) Abolition of the tapetum suicide program ruins microsporogenesis. *Plant and Cell Physiology*, 47, 784-787.
- Kawashima, T. & R. B. Goldberg** (2010) The suspensor: not just suspending the embryo. *Trends in Plant Science*, 15, 23-30.
- Kermode, A. R.** (1990) Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 9, 155-195.

- Kim, H. J., A. Yano, Y. Wada & H. Sano** (2007) Properties of a tobacco DNA methyltransferase, NtMET1 and its involvement in chromatin movement during cell division. *Annals of Botany*, 99, 845-856.
- Kinoshita, T., A. Miura, Y. H. Choi, Y. Kinoshita, X. F. Cao, S. E. Jacobsen, R. L. Fischer & T. Kakutani** (2004) One-way control of FWA imprinting in *Arabidopsis* endosperm by DNA methylation. *Science*, 303, 521-523.
- KJ, K.** 1974. Haploids in higher plants: advances and potential. The Office of Continuing Education, . Guelph: University of Guelph Press.
- Knox, J. P.** (2008) Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 308-313.
- Knox, R.** 1984. The pollen grain. In "Embryology of angiosperms". Berlin: Springer-Verlag.
- Kobayakawa, S., K. Miike, M. Nakao & K. Abe** (2007) Dynamic changes in the epigenomic state and nuclear organization of differentiating mouse embryonic stem cells. *Genes to Cells*, 12, 447-460.
- Kornberg, R. D. & A. Klug** (1981) The nucleosome. *Scientific American*, 244, 48-60.
- Kornblihtt, A. R., M. De la Mata, J. P. Fededa, M. J. Munoz & G. Nogues** (2004) Multiple links between transcription and splicing. *Rna-a Publication of the Rna Society*, 10, 1489-1498.
- Kosak, S. T. & M. Groudine** (2004) Form follows function: the genomic organization of cellular differentiation. *Genes & Development*, 18, 1371-1384.
- Kott, L. S. & W. D. Beversdorf** (1990) Enhanced plant-regeneration from microspore-derived embryos of *Brassica napus* by chilling, partial desiccation and age selection. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 23, 187-192.
- Kott, L. S., L. Polsoni & W. D. Beversdorf** (1988) Cytological aspects of isolated microspore culture of *Brassica napus*. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, 66, 1658-1664.
- Kott, L. S., L. Polsoni, B. Ellis & W. D. Beversdorf** (1988) Autotoxicity in isolated microspore cultures of *Brassica napus*. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, 66, 1665-1670.
- Kouzarides, T.** (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128, 693-705.
- Kranz, E. & H. Lorz** (1993) *In vitro* fertilization with isolated, single gametes results in zygotic embryogenesis and fertile maize plants. *Plant Cell*, 5, 739-746.
- Kranz, E., P. Vonwiegen & H. Lorz** (1995) Early cytological events after induction of cell-division in egg cells and zygote development following *in vitro* fertilization with angiosperm gametes. *Plant Journal*, 8, 9-23.
- Krause, S., S. Fakan, K. Weis & E. Wahle** (1994) Immunodetection of poly(A) binding protein-II in the cell-nucleus. *Experimental Cell Research*, 214, 75-82.
- Krzyszowska, M.** (2011) The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 35-51.
- Kubis, S. E., A. Castilho, A. V. Vershinin & J. S. Heslop-Harrison** (2003) Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation. *Plant Molecular Biology*, 52, 69-79.
- Kudo, Y., T. Takata, I. Ogawa, T. Kaneda, S. Sato, T. Takekoshi, M. Zhao, M. Miyauchi & H. Nikai** (2000) p279(Kip1) accumulation by inhibition of proteasome function induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells. *Clinical Cancer Research*, 6, 916-923.
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature*, 227, 680-&.

- Lam, E.** (2004) Controlled cell death, plant survival and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5, 305-315.
- Lamond, A. I. & W. C. Earnshaw** (1998) Structure and function in the nucleus. *Science*, 280, 547-553.
- Lamond, A. I. & D. L. Spector** (2003) Nuclear speckles: A model for nuclear organelles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4, 605-612.
- Lanzuolo, C. & V. Orlando** (2007) The function of the epigenome in cell reprogramming. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 1043-1062.
- Lark, C.** (1968) Studies on *in vivo* methylation of DNA in Escherichia Coli 15T. *Journal of Molecular Biology*, 31, 389-&.
- Law, J. A. & S. E. Jacobsen** (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics*, 11, 204-220.
- Law, R. D. & J. C. Suttle** (2005) Chromatin remodeling in plant cell culture: patterns of DNA methylation and histone H3 and H4 acetylation vary during growth of asynchronous potato cell suspensions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 527-534.
- Lazar, M. D., P. S. Baenziger & G. W. Schaeffer** (1984) Combining abilities and heritability of callus formation and plantlet regeneration in wheat (*Triticum-Aestivum* L) anther cultures. *Theoretical and Applied Genetics*, 68, 131-134.
- Lazebnik, Y. A., S. H. Kaufmann, S. Desnoyers, G. G. Poirier & W. C. Earnshaw** (1994) Cleavage of poly(ADP-Ribose) polymerase by a proteinase with properties like ice. *Nature*, 371, 346-347.
- Le Trionnaire, G. & D. Twell** (2010) Small RNAs in angiosperm gametophytes: from epigenetics to gamete development. *Genes & Development*, 24, 1081-1085.
- Lee, J. Y. & D. H. Lee** (2003) Use of serial analysis of gene expression technology to reveal changes in gene expression in *Arabidopsis* pollen undergoing cold stress. *Plant Physiology*, 132, 517-529.
- Lesniewska, J., E. Simeonova, A. Sikora, A. Mostowska & M. Charzynska** (2000) Application of the comet assay in studies of programmed cell death (PCD) in plants. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 69, 101-107.
- Li, E.** (2002) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature Reviews Genetics*, 3, 662-673.
- Li, E., T. H. Bestor & R. Jaenisch** (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 69, 915-926.
- Li, F. T., S. M. Chen, F. D. Chen, N. J. Teng, W. M. Fang, F. Zhang & Y. M. Deng** (2010) Anther wall development, microsporogenesis and microgametogenesis in male fertile and sterile chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat., Asteraceae). *Scientia Horticulturae*, 126, 261-267.
- Li, N., D. S. Zhang, H. S. Liu, C. S. Yin, X. X. Li, W. Q. Liang, Z. Yuan, B. Xu, H. W. Chu, J. Wang, T. Q. Wen, H. Huang, D. Luo, H. Ma & D. B. Zhang** (2006) The rice tapetum degeneration retardation gene is required for tapetum degradation and anther development. *Plant Cell*, 18, 2999-3014.
- Li, Y. Q., C. Faleri, A. Geitmann, H. Q. Zhang & M. Cresti** (1995) Immunogold localization of Arabinogalactan proteins, unesterified and esterified pectins in pollen grains and pollen tubes of *Nicotiana tabacum* L. *Protoplasma*, 189, 26-36.
- Lichter, R.** (1982) Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie*, 105, 427-434.
- Lichter, R.** (1989) Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different Brassicaceae species. *Plant Breeding*, 103, 119-123.

- Lincoln, J. E., C. Richael, B. Overduin, K. Smith, R. Bostock & D. G. Gilchrist** (2002) Expression of the antiapoptotic baculovirus p35 gene in tomato blocks programmed cell death and provides broad-spectrum resistance to disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 15217-15221.
- Lo, K. H. & K. P. Pauls** (1992) Plant growth environment effects on rapeseed microspore development and culture - A flow cytometric study. *Plant Physiology*, 99, 468-472.
- Lukowitz, W., A. Roeder, D. Parmenter & C. Somerville** (2004) A MAPKK kinase gene regulates extra-embryonic cell fate in *Arabidopsis*. *Cell*, 116, 109-119.
- M.J.Cañal, M. F., M. Berdasco, L.B. Diego, M. Esteller and R.Rodríguez.** 2003. Epigenetics, the role of DNA methylation. Currents Topics in Plant Biology.
- Ma, H.** (2005) Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgametogenesis in flowering plants. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 393.
- Ma, H. & V. Sundaresan** (2010) Development of flowering plant gametophytes. *Plant Development*, 91, 379-412.
- Madeo, F., E. Herker, C. Maldener, S. Wissing, S. Lachelt, M. Herian, M. Fehr, K. Lauber, S. J. Sigrist, S. Wesselborg & K. U. Frohlich** (2002) A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Molecular Cell*, 9, 911-917.
- Magoon ML, K. K.** 1963. Haploids. *Caryologia*.
- Maheshwari, P.** 1959. An introduction to the embryology of angiosperms. ed. McGraw-Hill. New York.: McGraw-Hill.
- Maheshwari, P.** 1963. Recent advances in the embryology of angiosperms. ed. I. S. P. Morphologist. Delhi: IntL Soc Plant Morphologist.
- Maheshwari, P. & B. M. Johri** (1950) Development of the embryo sac, embryo and endosperm in *Helixanthera-Ligustrina* (wall) dans. *Nature*, 165, 978-979.
- Majewska-Sawka, A. & M. I. Rodriguez-Garcia** (2006) Immunodetection of pectin and arabinogalactan protein epitopes during pollen exine formation of *Beta vulgaris* L. *Protoplasma*, 228, 41-47.
- Malatesta, M., M. Biggiogera, B. Baldelli, S. M. L. Barabino, T. E. Martin & C. Zancanaro** (2008) Hibernation as a far-reaching program for the modulation of RNA transcription. *Microscopy Research and Technique*, 71, 564-572.
- Malatesta, M., M. Biggiogera, B. Cisterna, M. Baliatti, C. Bertoni-Freddari & P. Fattoretti** (2010) Perichromatin Fibrils Accumulation in Hepatocyte Nuclei Reveals Alterations of Pre-mRNA Processing During Aging. *DNA and Cell Biology*, 29, 49-57.
- Malatesta, M., M. Biggiogera & C. Zancanaro** (2008) Hibernation as a far-reaching programme for cell nucleus activity modulation. *Jbis-Journal of the British Interplanetary Society*, 61, 339-341.
- Malatesta, M., C. Zancanaro & M. Biggiogera** (2011) Immunoelectron Microscopic Characterization of Nucleolus-Associated Domains During Hibernation. *Microscopy Research and Technique*, 74, 47-53.
- Malatesta, M., C. Zancanaro, T. E. Martin, E. K. L. Chan, F. Amalric, R. Luhrmann, P. Vogel & S. Fakan** (1994) Is the coiled body involved in nucleolar functions. *Experimental Cell Research*, 211, 415-419.
- Malik, M. R., F. Wang, J. M. Dirpaul, N. Zhou, J. Hammerlindl, W. Keller, S. R. Abrams, A. M. R. Ferrie & J. E. Krochko** (2008) Isolation of an embryogenic line from non-embryogenic *Brassica napus* cv. Westar through microspore embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 59, 2857-2873.

- Malik, M. R., F. Wang, J. M. Dirpaul, N. Zhou, P. L. Polowick, A. M. R. Ferrie & J. E. Krochko (2007) Transcript profiling and identification of molecular markers for early microspore embryogenesis in *Brassica napus*. *Plant Physiology*, 144, 134-154.
- Maluszynski M, K. K., Forster BP, Szarejko I. 2003. Doubled haploid production in crop plants: a manual. Dordrecht: Kluwer.
- Maluszynski M, K. K., Szarejko I. 2003. Published double haploid protocols in plant species. In: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I (eds) Haploid production in crop plants: a manual. Dordrecht: Kluwer.
- Mancini, M., D. W. Nicholson, S. Roy, N. A. Thornberry, E. P. Peterson, L. A. Casciola-Rosen & A. Rosen (1998) The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: Implications for apoptotic signaling. *Journal of Cell Biology*, 140, 1485-1495.
- Mandaron, P., M. F. Niogret, R. Mache & F. Moneger (1990) *In vitro* protein-synthesis in isolated microspores of Zea-Mays at several stages of development. *Theoretical and Applied Genetics*, 80, 134-138.
- Mansfield, S. G., L. G. Briarty & S. Erni (1991) Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. 1. The mature embryo sac. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, 69, 447-460.
- Maraschin, S. d. F., M. Caspers, E. Potokina, F. Wuelfert, A. Graner, H. P. Spaink & M. Wang (2006) CDNA array analysis of stress-induced gene expression in barley androgenesis. *Physiologia Plantarum*, 127, 535-550.
- Maraschin, S. F., W. de Priester, H. P. Spaink & M. Wang (2005) Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *Journal of Experimental Botany*, 56, 1711-1726.
- Martin, G. G., M. C. Risueño & J. M. Sogo (1970) Development of vegetative cell in pollen grain. *Cytologia*, 35, 77-&.
- Mascarenhas, J. P. (1975) Biochemistry of angiosperm pollen development. *Botanical Review*, 41, 259-314.
- Mascarenhas, J. P. (1990) Gene activity during pollen development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41, 317-338.
- Mascarenhas, J. P. (1992) Pollen gene-expression - Molecular evidence. *International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology*, 140, 3-18.
- Massonneau, A., M. J. Coronado, A. Audran, A. Bagniewska, R. Mol, P. S. Testillano, G. Goralski, C. Dumas, M. C. Risueño & E. Matthys-Rochon (2005) Multicellular structures developing during maize microspore culture express endosperm and embryo-specific genes and show different embryogenic potentialities. *European Journal of Cell Biology*, 84, 663-675.
- Matera, A. G. (1999) Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends in Cell Biology*, 9, 302-309.
- Matveyeva, N. P. & I. P. Yermakov (1999) Physiology of development of male gametophyte in angiosperms (modern approaches). *Zhurnal Obshchei Biologii*, 60, 277-294.
- Mazin, A. L. (2009) Suicidal function of DNA methylation in age-related genome disintegration. *Ageing Research Reviews*, 8, 314-327.
- McCormick, S., Twell, D., Vancanneyt, G., and Yamaguchi, J. 1991. Molecular analysis of gene regulations and function during male gametophyte development. In "Molecular Biology of Plant Development". ed. L. Company of Biologists. G. I. Jenkins and W. Schuch, Eds.
- McCormick, S. (1993) Male gametophyte development. *Plant Cell*, 5, 1265-1275.

- McCormick, S.** (2004) Control of male gametophyte development. *Plant Cell*, 16, S142-S153.
- McGhee, J. D. & G. Felsenfeld** (1980) Nucleosome structure. *Annual Review of Biochemistry*, 49, 1115-1156.
- Medina, F. J., M. C. Risueño, M. I. Rodríguez-García & M. A. Sánchez-Pina** (1983) The nucleolar organizer (nor) and fibrillar centers during plant gametogenesis. *Journal of Ultrastructure Research*, 85, 300-310.
- Medina, F. J., E. L. Solanilla, M. A. Sánchez-Pina, M. E. Fernández-Gómez & M. C. Risueño** (1986) Cytological approach to the nucleolar functions detected by silver staining. *Chromosoma*, 94, 259-266.
- Meijon, M., M. J. Canal, L. Valledor, R. Rodríguez & I. Feito** (2011) Epigenetic and physiological effects of gibberellin inhibitors and chemical pruners on the floral transition of azalea. *Physiologia Plantarum*, 141, 276-288.
- Meijon, M., I. Feito, L. Valledor, R. Rodríguez & M. J. Canal** (2010) Dynamics of DNA methylation and Histone H4 acetylation during floral bud differentiation in azalea. *Bmc Plant Biology*, 10.
- Meijon, M., L. Valledor, E. Santamaría, P. S. Testillano, M. C. Risueño, R. Rodríguez, I. Feito & M. J. Canal** (2009) Epigenetic characterization of the vegetative and floral stages of azalea buds: Dynamics of DNA methylation and histone H4 acetylation. *Journal of Plant Physiology*, 166, 1624-1636.
- Mellerowicz, E. J. & B. Sundberg** (2008) Wood cell walls: biosynthesis, developmental dynamics and their implications for wood properties. *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 293-300.
- Mena, C. G., P. S. Testillano, P. González-Melendi, E. Gorab & M. C. Risueño** (1994) Immunoelectron microscopy of RNA combined with nucleic-acid cytochemistry in plant nucleoli. *Experimental Cell Research*, 212, 393-408.
- Meyer, P., I. Niedenhof & M. Tenlohuis** (1994) Evidence for cytosine methylation of nonsymmetrical sequences in transgenic *Petunia-Hybrida*. *Embo Journal*, 13, 2084-2088.
- Micheli, F.** (2001) Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science*, 6, 414-419.
- Micheli, F., B. Sundberg, R. Goldberg & L. Richard** (2000) Radial distribution pattern of pectin methylesterases across the cambial region of hybrid aspen at activity and dormancy. *Plant Physiology*, 124, 191-199.
- Miernyk, J. A., A. Pretova, A. Olmedilla, K. Klubicova, B. Obert & M. Hajdúch** (2011) Using proteomics to study sexual reproduction in angiosperms. *Sexual Plant Reproduction*, 24, 9-22.
- Miguel, C. & L. Marum** (2011) An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. *Journal of Experimental Botany*, 62, 3713-3725.
- Mirouze, M. & J. Paszkowski** (2011) Epigenetic contribution to stress adaptation in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 14, 267-274.
- Misteli, T.** (2000) Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. *Journal of Cell Science*, 113, 1841-1849.
- Misteli, T.** (2005) Concepts in nuclear architecture. *Bioessays*, 27, 477-487.
- Misteli, T.** (2007) Beyond the sequence: Cellular organization of genome function. *Cell*, 128, 787-800.
- Misteli, T. & D. L. Spector** (1998) The cellular organization of gene expression. *Current Opinion in Cell Biology*, 10, 323-331.

- Morgan, H. D., F. Santos, K. Green, W. Dean & W. Reik** (2005) Epigenetic reprogramming in mammals. *Human Molecular Genetics*, 14, R47-R58.
- Moustacas, A. M., J. Nari, M. Borel, G. Noat & J. Ricard** (1991) Pectin methylesterase, metal-ions and plant cell-wall extension - The role of metal-ions in plant cell-wall extension. *Biochemical Journal*, 279, 351-354.
- Munoz-Amatriain, M., J. T. Svensson, A.-M. Castillo, L. Cistue, T. J. Close & M.-P. Valles** (2006) Transcriptome analysis of barley anthers: effect of mannitol treatment on microspore embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 127, 551-560.
- Nakashima, J., K. Takabe, M. Fujita & H. Fukuda** (2000) Autolysis during *in vitro* tracheary element differentiation: Formation and location of the perforation. *Plant and Cell Physiology*, 41, 1267-1271.
- Nari, J., G. Noat, G. Diamantidis, M. Woudstra & J. Ricard** (1986) Electrostatic effects and the dynamics of enzyme-reactions at the surface of plant-cells .3. Interplay between limited cell-wall autolysis, pectin methyl esterase-activity and electrostatic effects in soybean cell-walls. *European Journal of Biochemistry*, 155, 199-202.
- Neale, D. B. & A. Kremer** (2011) Forest tree genomics: growing resources and applications. *Nature Reviews Genetics*, 12, 111-122.
- Neves, N., A. Castilho, M. Silva, J. S. HeslopHarrison & W. Viegas**. 1997. Genomic interactions: Gene expression, DNA methylation and nuclear architecture. In *Chromosomes Today, Vol 12*, eds. N. HenriquesGil, J. S. Parker & M. J. Puertas, 182-200. London: Chapman & Hall.
- Nitsch, C. & B. Norreel** (1973) Effect of thermal shock on embryogenic power of pollen of *Datura-Innoxia* cultured in anther or isolated from anther. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences Serie D*, 276, 303-&.
- Nitsch, J. P. & C. Nitsch** (1969) Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163, 85-&.
- Nitta, T., Y. Takahata & N. Kaizuma** (1997) Scanning electron microscopy of microspore embryogenesis in *Brassica* spp. *Plant Cell Reports*, 16, 406-410.
- Noceda, C., T. Salaj, M. Perez, M. Viejo, M. J. Canal, J. Salaj & R. Rodriguez** (2009) DNA demethylation and decrease on free polyamines is associated with the embryogenic capacity of *Pinus nigra* Arn. cell culture. *Trees-Structure and Function*, 23, 1285-1293.
- O'Neill, M. A. & et al.** 1990. The pectic polysaccharides of primary cell walls. In *Methods in Plant Biochemistry* (Vol. 2) (Dey, P.M., ed.). Academic Press.
- O'Neill, M. A. e. a.** 1990. The pectic polysaccharides of primary cell walls. In *Methods in Plant Biochemistry* (Vol. 2) (Dey, P.M., ed.). Academic Press.
- Oakeley, E. J., A. Podesta & J. P. Jost** (1997) Developmental changes in DNA methylation of the two tobacco pollen nuclei during maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 11721-11725.
- Okada, T., M. B. Singh & P. L. Bhalla** (2006) Histone H3 variants in male gametic cells of lily and H3 methylation in mature pollen. *Plant Molecular Biology*, 62, 503-512.
- Olney, J. W., T. Tenkova, K. Dikranian, L. J. Muglia, W. J. Jermakowicz, C. D'Sa & K. A. Roth** (2002) Ethanol-induced caspase-3 activation in the *in vivo* developing mouse brain. *Neurobiology of Disease*, 9, 205-219.
- Owen, H. A. & C. A. Makaroff** (1995) Ultrastructure of microsporogenesis and microgametogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L) heynh ecotype wassilewskija (Brassicaceae). *Protoplasma*, 185, 7-21.
- Pacini, E.** (1990) *Mercurialis-Annua-L* (Euphorbiaceae) seed interactions with the ant messor-structor (LATR), hymenoptera, formicidae. *Acta Botanica Neerlandica*, 39, 253-262.

- Pacini, E.** (1996) Types and meaning of pollen carbohydrate reserves. *Sexual Plant Reproduction*, 9, 362-366.
- Pacini, E.** (1997) Tapetum character states: analytical keys for tapetum types and activities. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, 75, 1448-1459.
- Pacini, E.** (2010) Relationships between tapetum, loculus and pollen during development. *International Journal of Plant Sciences*, 171, 1-11.
- Pacini, E. & M. Hesse** (2004) Cytophysiology of pollen presentation and dispersal. *Flora*, 199, 273-285.
- Pacini, E. & M. Hesse** (2005) Pollenkitt - its composition, forms and functions. *Flora*, 200, 399-415.
- Palmer CE, K. W., Kasha KJ** (2005) Haploids in crop improvement II. 56.
- Panavas, T. & B. Rubinstein** (1998) Oxidative events during programmed cell death of daylily (*Heimerocallis* hybrid) petals. *Plant Science*, 133, 125-138.
- Papa, C. M., N. M. Springer, M. G. Muszynski, R. Meeley & S. M. Kaeppler** (2001) Maize chromomethylase *Zea methyltransferase2* is required for CpNpG methylation. *Plant Cell*, 13, 1919-1928.
- Papini, A., S. Mosti & L. Brighigna** (1999) Programmed-cell death events during tapetum development of angiosperms. *Protoplasma*, 207, 213-221.
- Parish, R. W. & S. F. Li** (2010) Death of a tapetum: A programme of developmental altruism. *Plant Science*, 178, 73-89.
- Park, S. K. & D. Twell** (2001) Novel patterns of ectopic cell plate growth and lipid body distribution in the *Arabidopsis* gemini pollen1 mutant. *Plant Physiology*, 126, 899-909.
- Pauls, K. P., J. Chan, G. Woronuk, D. Schulze & J. Brazolot** (2006) When microspores decide to become embryos - cellular and molecular changes. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, 84, 668-678.
- Pechan, P. M. & W. A. Keller** (1988) Identification of potentially embryogenic microspores in *Brassica napus*. *Physiologia Plantarum*, 74, 377-384.
- Pelletier, S., J. Van Orden, S. Wolf, K. Vissenberg, J. Delacourt, Y. A. Ndong, J. Pelloux, V. Bischoff, A. Urbain, G. Mouille, G. Lemonnier, J. P. Renou & H. Hofte** (2010) A role for pectin de-methylesterification in a developmentally regulated growth acceleration in dark-grown *Arabidopsis hypocotyls*. *New Phytologist*, 188, 726-739.
- Pellicciari, C., M. G. Bottone, A. Frascini & M. Biggiogera**. 2001. *Restructuring and extrusion of nucleoli in apoptosis*.
- Pellicciari, C., M. G. Bottone, A. I. Scovassi, T. E. Martin & M. Biggiogera** (2000) Rearrangement of nuclear ribonucleoproteins and extrusion of nucleolus-like bodies during apoptosis induced by hypertonic stress. *European Journal of Histochemistry*, 44, 247-254.
- Pellicciari, C., M. G. Bottone, A. I. Scovassi, C. Soldani, L. Vecchio & M. Biggiogera** (2004) Rearrangement of nuclear RNP-containing structures during apoptosis and transcriptional arrest. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 52, S29-S29.
- Pelloux, J., C. Rusterucci & E. J. Mellerowicz** (2007) New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in Plant Science*, 12, 267-277.
- Penterman, J., D. Zilberman, J. H. Huh, T. Ballinger, S. Henikoff & R. L. Fischer** (2007) DNA demethylation in the *Arabidopsis* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 6752-6757.
- Perera, P. I. P., V. Hocher, J. L. Verdeil, H. D. D. Bandupriya, D. M. D. Yakandawala & L. K. Weerakoon** (2008) Androgenic potential in coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 92, 293-302.

- Perera, P. I. P., L. Perera, V. Hocher, J. L. Verdeil, D. M. D. Yakandawala & L. K. Weerakoon** (2008) Use of SSR markers to determine the anther-derived homozygous lines in coconut. *Plant Cell Reports*, 27, 1697-1703.
- Perera, P. I. P., D. M. D. Yakandawala, V. Hocher, J. L. Verdeil & L. K. Weerakoon** (2009) Effect of growth regulators on microspore embryogenesis in coconut anthers. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 96, 171-180.
- Perrin, R., H. Lange, J. M. Grienenberger & D. Gagliardi** (2004) AtmtPNPase is required for multiple aspects of the 18S rRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana* mitochondria. *Nucleic Acids Research*, 32, 5174-5182.
- Petricka, J. J., J. M. Van Norman & P. N. Benfey** (2009) Symmetry Breaking in Plants: Molecular Mechanisms Regulating Asymmetric Cell Divisions in *Arabidopsis*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1.
- Petrussa, E., A. Bertolini, V. Casolo, J. Krajnakova, F. Macri & A. Vianello** (2009) Mitochondrial bioenergetics linked to the manifestation of programmed cell death during somatic embryogenesis of *Abies alba*. *Planta*, 231, 93-107.
- Pflugger, J. & D. Wagner** (2007) Histone modifications and dynamic regulation of genome accessibility in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 645-652.
- Piecinski, S., D. J. Smolinski, K. Zienkiewicz & E. Bednarska** (2008) Changes in poly(A) RNA and TMG snRNA distribution in the embryo sac of *Hyacinthus orientalis* L. before and after fertilization. *Sexual Plant Reproduction*, 21, 247-257.
- Piffanelli, P., J. H. E. Ross & D. J. Murphy** (1998) Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. *Sexual Plant Reproduction*, 11, 65-80.
- Pina, C., F. Pinto, J. A. Feijo & J. D. Becker** (2005) Gene family analysis of the *Arabidopsis* pollen transcriptome reveals biological implications for cell growth, division control, and gene expression regulation. *Plant Physiology*, 138, 744-756.
- Piperi, C. & A. G. Papavassiliou** (2011) Strategies for DNA methylation analysis in developmental studies. *Development Growth & Differentiation*, 53, 287-299.
- Popper, Z. A. & S. C. Fry** (2004) Primary cell wall composition of pteridophytes and spermatophytes. *New Phytologist*, 164, 165-174.
- Potrykus, I.** (1989) Gene-transfer to cereals - An assessment. *Trends in Biotechnology*, 7, 269-273.
- Prado, M. J., M. P. Grueiro, M. V. Gonzalez, P. S. Testillano, C. Dominguez, M. Lopez & M. Rey** (2010) Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from anthers and ovaries of six autochthonous grapevine cultivars from Galicia (Spain). *Scientia Horticulturae*, 125, 342-352.
- Prem, D., K. Gupta & A. Agnihotri** (2005) Effect of various exogenous and endogenous factors on microspore embryogenesis in Indian mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern and Coss). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41, 266-273.
- Prem, D., K. Gupta, G. Sarkar & A. Agnihotri** (2008) Activated charcoal induced high frequency microspore embryogenesis and efficient doubled haploid production in *Brassica juncea*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 93, 269-282.
- Prestamo, G., P. S. Testillano, O. Vicente, P. Gonzalez-Melendi, M. J. Coronado, C. Wilson, E. Heberle-Bors & M. C. Risueño** (1999) Ultrastructural distribution of a MAP kinase and transcripts in quiescent and cycling plant cells and pollen grains. *Journal of Cell Science*, 112, 1065-1076.
- Pritchard, H. N.** (1964) Cytochemical study of embryo development in *stellaria media*. *American Journal of Botany*, 51, 472-&.
- Punt, W., P. P. Hoen, S. Blackmore, S. Nilsson & A. Le Thomas** (2007) Glossary of pollen and spore terminology. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 143, 1-81.

- Puvion, E. & F. PuvionDutilleul** (1996) Ultrastructure of the nucleus in relation to transcription and splicing: Roles of perichromatin fibrils and interchromatin granules. *Experimental Cell Research*, 229, 217-225.
- Quan, L., R. Xiao, W. Li, S.-A. Oh, H. Kong, J. C. Ambrose, J. L. Malcos, R. Cyr, D. Twell & H. Ma** (2008) Functional divergence of the duplicated AtKIN14a and AtKIN14b genes: critical roles in *Arabidopsis* meiosis and gametophyte development. *Plant Journal*, 53, 1013-1026.
- Raghavan, V.** 1976. Experimental embryogenesis in vascular plants. London: Acad press.
- Raghavan, V.** 1986. *Embryogenesis in Angiosperms*. Cambridge, London, NY.
- Raghavan, V.** 1986. Pollen embryogenesis. In "Embryogenesis in Angiosperms, a developmental and experimental study" (P. W. Barlow, P. V. Green, and C. C. Wylie, Eds.). London: Cambridge University Press.
- Raghavan, V.** (1990) From microspore to embryo - Faces of the angiosperm pollen grain. *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*, 9, 213-221.
- Raghavan, V.** 1999. Developmental Biology of Flowering plants. New York: Springer-Verlag.
- Raghavan, V.** 2000. *Developmental Biology of Flowering Plants*. New York.
- Raghavan, V.** 2001. Life and times of the suspensor of angiosperm embryos. In *Life and times of the suspensor of angiosperm embryos*, ed. T. i. P. S. P. G. J. Issue, 251-276.
- Ramirez, C., B. Chiancone, P. S. Testillano, B. Garcia-Fojeda, M. A. Germana & M. C. Risueño** (2003) First embryogenic stages of Citrus microspore-derived embryos. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 45, 53-58.
- Ramirez, C., P. S. Testillano, A. M. Castillo, M. P. Valles, M. J. Coronado, L. Cistue & M. D. Risueño** (2001) The early microspore embryogenesis pathway in barley is accompanied by concrete ultrastructural and expression changes. *International Journal of Developmental Biology*, 45, S57-S58.
- Ramirez, C., P. S. Testillano, B. Pintos, M. A. Moreno-Risueno, M. A. Bueno & M. C. Risueño** (2004) Changes in pectins and MAPKs related to cell development during early microspore embryogenesis in *Quercus suber* L. *European Journal of Cell Biology*, 83, 213-225.
- Ramirez, C. L., J. Cadiganos, I. Varela, J. M. P. Freije & C. Lopez-Otin** (2007) Human progeroid syndromes, aging and cancer: new genetic and epigenetic insights into old questions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 155-170.
- Reape, T. J. & P. F. McCabe** (2008) Apoptotic-like programmed cell death in plants. *New Phytologist*, 180, 13-26.
- Reape, T. J. & P. F. McCabe** (2010) Apoptotic-like regulation of programmed cell death in plants. *Apoptosis*, 15, 249-256.
- Reik, W., W. Dean & J. Walter** (2001) Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 293, 1089-1093.
- Rentrop, M., B. Knapp, H. Winter & J. Schweizer** (1986) Differential localization of distinct keratin messenger RNA-species in mouse tongue epithelium by in situ hybridization with specific cDNA probes. *Journal of Cell Biology*, 103, 2583-2591.
- Reyes, J., P. S. Testillano & M. C. Risueño** (1994) The BrdU immunogold labelling to localize replicated DNA in plant cell nuclei. *Electron Microscopy 1994, Vols 3a and 3b*, 451-452.
- Reyes, J. C.** (2006) Chromatin modifiers that control plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 21-27.
- Reynolds, E. S.** (1963) Use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 17, 208-&.

- Reynolds, T. L.** 1990. Ultrastructure of pollen embryogenesis. In Y.P.S. Bajaj (Ed.). ed. V. H. i. C. I. p.-. *Biotechnology in Agn'cuMure and Forestry*. Berlin, Heildelberg: Springer-Verlag.
- Reynolds, T. L.** (1997) Pollen embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, 33, 1-10.
- Ribeiro, T., W. Viegas & L. Morais-Cecilio** (2009) Epigenetic marks in the mature pollen of *Quercus suber* L. (Fagaceae). *Sexual Plant Reproduction*, 22, 1-7.
- Ridley, B. L., M. A. O'Neill & D. A. Mohnen** (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57, 929-967.
- Risueño, M. C.** 1990. Pollen biology: structure and function. In "Polen, esporas y sus aplicaciones". Universidad de Granada, Granada. España.
- Risueño, M. C., Gimenezm.G & M. I. R. Garcia** (1973) Structural changes in cell wall of meiocytes. *Cytologia*, 38, 177-186.
- Risueño, M. C., Gimenezm.G, Lopezsaec.Jf & M. I. R. Garcia** (1969) Origin and development of sporopollenin bodies. *Protoplasma*, 67, 361-&.
- Risueño, M. C., F. J. Medina & S. M. D. Delaespina** (1982) Nucleolar fibrillar centers in plant meristematic cells - ultrastructure, cyto-chemistry and autoradiography. *Journal of Cell Science*, 58, 313-329.
- Risueño, M. C., S. Moreno-Diazdelaespina, M. H. Fernandez-Gomez & G. Gimenez-Martin** (1978) Nuclear micropuffs in *Allium-Cepa* cells .1. Quantitative, ultrastructural and cytochemical study. *Cytobiologie*, 16, 209-223.
- Risueño, M. C., Testillano, P. S., & M. A. Sánchez-Pina.** 1988. Variations of nucleolar ultrastructure in relation to transcriptional activity during G1, S, G2 of microspore interphase. In "Sexual Reproduction in Higher Plants" (M. Cresti, P. Gori, and E. Paccini, Eds.). Berlin. Heidelberg: Springer-Verlag.
- Risueño, M. C., J. M. Sogo, Gimenezm.G & M. I. Rgarcia** (1970) Vacuolation in cytoplasm of plant cells. *Cytologia*, 35, 609-&.
- Risueño, M. C. a. M., F. J.** (1986b) The nucleolar structure in plant cells.
- Robertson, K. D. & P. A. Jones** (2000) DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis*, 21, 461-467.
- Rockel, N., S. Wolf, B. Kost, T. Rausch & S. Greiner** (2008) Elaborate spatial patterning of cell-wall PME and PME1 at the pollen tube tip involves PME1 endocytosis, and reflects the distribution of esterified and de-esterified pectins. *Plant Journal*, 53, 133-143.
- Rodríguez-Serrano M, B. I., Prem D, Coronado MJ, Risueño MC, Testillano PS** (2011) NO, ROS and cell death associated with caspase-like activity increase in stress-induced microspore embryogenesis of barley. *Journal Experimental Botany*.
- Rogers, H. J.** (2006) Programmed cell death in floral organs: How and why do flowers die? *Annals of Botany*, 97, 309-315.
- Rojo, E., R. Martin, C. Carter, J. Zouhar, S. Q. Pan, J. Plotnikova, H. L. Jin, M. Paneque, J. J. Sanchez-Serrano, B. Baker, F. M. Ausubel & N. V. Raikhel** (2004) VPE gamma exhibits a caspase-like activity that contributes to defense against pathogens. *Current Biology*, 14, 1897-1906.
- Romero-Puertas, M. C., M. Rodriguez-Serrano, F. J. Corpas, M. Gomez, L. A. Del Rio & L. M. Sandalio** (2004) Cadmium-induced subcellular accumulation of O-2(-) and H2O2 in pea leaves. *Plant Cell and Environment*, 27, 1122-1134.
- Ronemus, M. J., M. Galbiati, C. Ticknor, J. C. Chen & S. L. Dellaporta** (1996) Demethylation-induced developmental pleiotropy in *Arabidopsis*. *Science*, 273, 654-657.

- Rose, T. M., E. R. Schultz, J. G. Henikoff, S. Pietrokovski, C. M. McCallum & S. Henikoff (1998) Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Research*, 26, 1628-1635.
- Rowley JR, D. A. 1977. Pollen development in *Artemisa vulgaris* with special reference to glycoclayx material (1). *Pollen et Spores* 14.
- Rudolf, K., B. Bohanec & M. Hansen (1999) Microspore culture of white cabbage, *Brassica oleracea* var. capitata L.: Genetic improvement of non-responsive cultivars and effect of genome doubling agents. *Plant Breeding*, 118, 237-241.
- Ruiz-Garcia, L., M. T. Cervera & J. M. Martinez-Zapater (2005) DNA methylation increases throughout *Arabidopsis* development. *Planta*, 222, 301-306.
- Ryden, P., K. Sugimoto-Shirasu, A. C. Smith, K. Findlay, W. D. Reiter & M. C. McCann (2003) Tensile properties of *Arabidopsis* cell walls depend on both a xyloglucan cross-linked microfibrillar network and rhamnogalacturonan II-borate complexes. *Plant Physiology*, 132, 1033-1040.
- Sabelli, P. A. & B. A. Larkins (2009) The Development of Endosperm in Grasses. *Plant Physiology*, 149, 14-26.
- Sanders, P. M., P. Y. Lee, C. Biesgen, J. D. Boone, T. P. Beals, E. W. Weiler & R. B. Goldberg (2000) The *Arabidopsis* DELAYED DEHISCENCE1 gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *Plant Cell*, 12, 1041-1061.
- Sanger, J. M. & W. T. Jackson (1971) Fine structure study of pollen development in *Haemanthus-Katherinae-Baker* .2. Microtubules and elongation of generative cells. *Journal of Cell Science*, 8, 303-&.
- Sanghavi, D. M., M. Thelen, N. A. Thornberry, L. Casciola-Rosen & A. Rosen (1998) Caspase-mediated proteolysis during apoptosis: insights from apoptotic neutrophils. *Febs Letters*, 422, 179-184.
- Sangwan, R. S. & B. S. Sangwannorreeel (1987) Ultrastructural cytology of plastids in pollen grains of certain androgenic and nonandrogenic plants. *Protoplasma*, 138..
- Sankaran.K & B. B. Hyde (1965) Ultrastructural studies of a nuclear body in peas with characteristics of both chromatin and nucleoli. *Journal of Ultrastructure Research*, 12, 748-&.
- Santamaria, M. E., R. Hasbun, M. J. Valera, M. Meijon, L. Valledor, J. L. Rodriguez, P. E. Toorop, M. J. Canal & R. Rodriguez (2009) Acetylated H4 histone and genomic DNA methylation patterns during bud set and bud burst in *Castanea sativa*. *Journal of Plant Physiology*, 166, 1360-1369.
- Satpute, G. K., H. Long, J. M. Segui-Simarro, M. C. Risueño & P. S. Testillano (2005) Cell architecture during gametophytic and embryogenic microspore development in *Brassica napus* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27, 665-674.
- Saze, H. (2008) Epigenetic memory transmission through mitosis and meiosis in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19, 527-536.
- Saze, H., O. M. Scheid & J. Paszkowski (2003) Maintenance of CpG methylation is essential for epigenetic inheritance during plant gametogenesis. *Nature Genetics*, 34, 65-69.
- SB, A. 2005. Haploids in the improvement of woody species. In: Palmer CE, Keller WA, Kasha K (eds) Haploids in crop improvement II. Heidelberg: Springer.
- Schellenbaum, P., V. Mohler, G. Wenzel & B. Walter (2008) Variation in DNA methylation patterns of grapevine somaclones (*Vitis vinifera* L.). *Bmc Plant Biology*, 8.
- Schiller, M., I. Bekeredian-Ding, P. Heyder, N. Blank, A. D. Ho & H. M. Lorenz (2008) Autoantigens are translocated into small apoptotic bodies during early stages of apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 15, 183-191.

- Schrauwen, J. A. M., P. F. M. Degroot, M. M. A. Vanherpen, T. Vanderlee, W. H. Reyneen, K. A. P. Weterings & G. J. Wullems (1990) Stage-related expression of messenger-RNAs during pollen development in lily and tobacco-. *Planta*, 182, 298-304.
- Schreier, P., Kuntz, M., Lipphart, S, Lörz, H., Baker, B, Simons, A, Schell, J, Bohnert, HJ, Reiss, B, and Wassman, CC. 1985. New developments in plant transformation technology: its application to cellular organelles, cereals and dicotyledonous crop plants. In "Biotechnology in plant science. Relevance to agriculture in the eighties" (M. Zaitlin, P. Day, and A. Hollaender, Eds.). San Diego: Academic Press.
- Schul, W., R. vanDriel & L. deJong (1996) Nuclear organization of RNA 3' processing factors. *Molecular Biology of the Cell*, 7, 3658-3658.
- Schulz, R. & W. Jensen (1968) Capsella embryogenesis - Early embryo. *Journal of Ultrastructure Research*, 22, 376-&.
- Schulz, R. & W. A. Jensen (1968) Capsella embryogenesis - egg zygote and young embryo. *American Journal of Botany*, 55, 807-&.
- Schulz, R. & W. A. Jensen (1968) Capsella embryogenesis - Synergids before and after fertilization. *American Journal of Botany*, 55, 541-&.
- Schulze, D. & K. P. Pauls (2002) Flow cytometric analysis of cellulose tracks development of embryogenic Brassica cells in microspore cultures. *New Phytologist*, 154, 249-254.
- Schwacke, R., S. Grallath, K. E. Breikreuz, E. Stransky, H. Stransky, W. B. Frommer & D. Rentsch (1999) LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine, and gamma-amino butyric acid in tomato pollen. *Plant Cell*, 11, 377-391.
- Scott, R., R. Hodge, W. Paul & J. Draper (1991) The molecular-biology of anther differentiation. *Plant Science*, 80, 167-191.
- Scott, R. J., M. Spielman & H. G. Dickinson (2004) Stamen structure and function. *Plant Cell*, 16, S46-S60.
- Scovassi, A. I., M. G. Bottone, M. Biggiogera & C. Pellicciari (2008) Dynamic relocation of nuclear proteins during the execution phase of apoptosis. *Biochemical Pharmacology*, 76, 1440-1450.
- Seguí-Simarro, J. 2001. Inducción a embriogénesis en polen: Caracterización celular y expresión de proteínas de estrés. Universidad Complutense de Madrid.
- Seguí-Simarro, J., P. Testillano, S. Jouannic, Y. Henry & M. Risueño (2005) Mitogen-activated protein kinases are developmentally regulated during stress-induced microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. *Histochemistry and Cell Biology*, 123, 541-551.
- Seguí-Simarro, J. M. (2010) Androgenesis Revisited. *Botanical Review*, 76, 377-404.
- Seguí-Simarro, J. M., I. Barany, R. Suarez, B. Fadon, P. Testillano & M. C. Risueño (2006) Nuclear bodies domain changes with microspore reprogramming to embryogenesis. *European Journal of Histochemistry*, 50, 35-44.
- Seguí-Simarro, J. M., P. Corral-Martinez, V. Parra-Vega & B. Gonzalez-Garcia (2011) Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. *Plant Cell Reports*, 30, 765-778.
- Seguí-Simarro, J. M. & F. Nuez (2008) How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 134, 1-12.
- Seguí-Simarro, J. M. & F. Nuez (2008) Pathways to doubled haploidy: chromosome doubling during androgenesis. *Cytogenetic and Genome Research*, 120, 358-369.

- Segui-Simarro, J. M., P. S. Testillano & M. C. Risueño** (2003) Hsp70 and Hsp90 change their expression and subcellular localization after microspore embryogenesis induction in *Brassica napus* L. *Journal of Structural Biology*, 142, 379-391.
- Senaratna, T., L. Kott, W. D. Beversdorf & B. D. McKersie** (1991) Desiccation of microspore derived embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Cell Reports*, 10, 342-344.
- Serrano, I., S. Pelliccione & A. Olmedilla** (2010) Programmed-cell-death hallmarks in incompatible pollen and papillar stigma cells of *Olea europaea* L. under free pollination. *Plant Cell Reports*, 29, 561-572.
- Shariatpanahi, M. E., U. Bal, E. Heberle-Bors & A. Touraev** (2006) Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 127, 519-534.
- Shell, J.** 1988. Plant transformation using Agrobacterium and direct DNAuptake methods. In "Genetic improvements of agriculturally important crops. Progress and Issues" (R. Fraley, N. Frey, and J. Schell, Eds.). New York: Cold Spring harbour Lab.
- Shivanna, K. R. a. J., B. M.** 1985. The angiosperm pollen. New Delhi: Mohinder Singh Sejwal.
- Shukla AK, V. M., Chaudhry B.** 1998. Biology of pollen. New Delhi: APH Publishing Corporation.
- Shull, J. K. & M. Y. Menzel** (1977) Study of reliability of synchrony in development of pollen mother cells of *Lilium longiflorum* at 1st meiotic prophase. *American Journal of Botany*, 64, 670-679.
- Singh, M. B. & P. L. Bhalla** (2007) Control of male germ-cell development in flowering plants. *Bioessays*, 29, 1124-1132.
- Sitte, H., Neumann, K., and Edelmann, L.** 1989. Cryofixation and cryosubstitution for routine work in transmission electron microscopy. In "Science of Biological Specimen preparation" (A. M. F. O'Hare, Ed.). Chicago: SEM Inc.
- Slotkin, R. K., M. Vaughn, F. Borges, M. Tanurdzic, J. D. Becker, J. A. Feijo & R. A. Martienssen** (2009) Epigenetic Reprogramming and Small RNA Silencing of Transposable Elements in Pollen. *Cell*, 136, 461-472.
- Smith, B. G. & P. J. Harris** (1999) The polysaccharide composition of Poales cell walls: Poaceae cell walls are not unique. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27, 33-53.
- Smulders, M. J. M. & G. J. de Klerk** (2011) Epigenetics in plant tissue culture. *Plant Growth Regulation*, 63, 137-146.
- Smykal, P.** (2000) Pollen embryogenesis - the stress mediated switch from gametophytic to sporophytic development. Current status and future prospects. *Biologia Plantarum*, 43, 481-489.
- Smykal, P., L. Valledor, R. Rodriguez & M. Griga** (2007) Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term *in vitro* shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Reports*, 26, 1985-1998.
- Soldani, C., M. G. Bottone, L. Vecchio, A. I. Scovassi, M. Biggiogera & C. Pellicciari** (2006) Extrusion of nuclear proteins during apoptosis. *Cytometry Part A*, 69A, 436-437.
- Soldani, C., M. C. Lazze, M. G. Bottone, G. Tognon, M. Biggiogera, C. Pellicciari & A. I. Scovassi.** 2001. *Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis.*
- Solis, M. T., B. Pintos, M. J. Prado, M. A. Bueno, I. Raska, M. C. Risueño & P. S. Testillano** (2008) Early markers of *in vitro* microspore reprogramming to embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.). *Plant Science*, 174, 597-605.

- Somerville, C., S. Bauer, G. Brininstool, M. Facette, T. Hamann, J. Milne, E. Osborne, A. Paredez, S. Persson, T. Raab, S. Vorwerk & H. Youngs (2004) Toward a systems approach to understanding plant-cell walls. *Science*, 306, 2206-2211.
- Spector, D. L., R. T. Okeefe & L. F. Jimenezgarcia (1993) Dynamics of transcription and pre-messenger-RNA splicing within the mammalian-cell nucleus. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 58, 799-805.
- Srivastava, P. & R. Chaturvedi (2008) *In vitro* androgenesis in tree species: An update and prospect for further research. *Biotechnology Advances*, 26, 482-491.
- Stanley, R. G. & H. F. Linskens. 1974. pollen: biology, biochemistry and management. Berlin: Springer-Verlag.
- Stennicke, H. R. & G. S. Salvesen (2000) Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1477, 299-306.
- Stepka, M., F. Ciampolini, M. Charzynska & M. Cresti (2000) Localization of pectins in the pollen tube wall of *Ornithogalum virens* L. -does the pattern of pectin distribution depend on the growth rate of the pollen tube? *Planta*, 210, 630-635.
- Steward, F. C., M. O. Mapes & K. Mears (1958) Growth and organized development of cultured cells .2. Organization in cultires grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany*, 45, 705-708.
- Straatman, K. R. & J. H. N. Schel (2001) Distribution of splicing proteins and putative coiled bodies during pollen development and androgenesis in *Brassica napus* L. *Protoplasma*, 216, 191-200.
- Stuart, D. A. & M. K. Redenbaugh (1987) Use of somatic embryogenesis for the regeneration of plants. *Acs Symposium Series*, 334, 87-96.
- Suarez, M. F., L. H. Filonova, A. Smertenko, E. I. Savenkov, D. H. Clapham, S. von Arnold, B. Zhivotovsky & P. V. Bozhkov (2004) Metacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis. *Current Biology*, 14, R339-R340.
- Suarez-Cervera, M., E. Arcalis, A. Le Thomas & J. A. Seoane-Camba (2002) Pectin distribution pattern in the apertural intine of *Euphorbia peplus* L. (Euphorbiaceae) pollen. *Sexual Plant Reproduction*, 14, 291-298.
- Supena, E. D. J., B. Winarto, T. Riksen, E. Dubas, A. Van Lammeren, R. Offringa, K. Boutilier & J. Custers (2008) Regeneration of zygotic-like microspore-derived embryos suggests an important role for the suspensor in early embryo patterning. *Journal of Experimental Botany*, 59, 803-814.
- Sylvester, A. W. (2000) Division decisions and the spatial regulation of cytokinesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 58-66.
- Takahata, Y., D. C. W. Brown & W. A. Keller (1991) Effect of donor plant-age and inflorescence age on microspore culture of *Brassica napus* L. *Euphytica*, 58, 51-55.
- Tanaka, I. (1993) Development of male gametes in flowering plants. *Journal of Plant Research*, 106, 55-63.
- Tanaka, I. (1997) Differentiation of generative and vegetative cells in angiosperm pollen. *Sexual Plant Reproduction*, 10, 1-7.
- Taylor, L. P. & P. K. Hepler (1997) Pollen germination and tube growth. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 461-491.
- Teerawanichpan, P., P. Krittanai, N. Chauvatcharin & J. Narangajavana (2009) Purification and characterization of rice DNA methyltransferase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 671-680.

- Telmer, C. A., W. Newcomb & D. H. Simmonds** (1995) Cellular-changes during heat-shock induction and embryo development of cultured microspores of *Brassica napus* V topas. *Protoplasma*, 185, 106-112.
- Telmer, C. A., D. H. Simmonds & W. Newcomb** (1992) Determination of developmental stage to obtain high-frequencies of embryogenic microspores in *Brassica napus*. *Physiologia Plantarum*, 84, 417-424.
- Tembe, V. & B. R. Henderson** (2007) Protein trafficking in response to DNA damage. *Cellular Signalling*, 19, 1113-1120.
- Terasaka, O. & T. Niitsu** (1990) Unequal cell-division and chromatin differentiation in pollen grain cells .2. Microtubule dynamics associated with the unequal cell-division. *Botanical Magazine-Tokyo*, 103, 133-142.
- Terasaka, O. & R. Tanaka** (1974) Cytological studies on nuclear differentiation in microspore division of some angiosperms. *Botanical Magazine-Tokyo*, 87, 209-217.
- Tessadori, F., R. K. Schulkes, R. van Driel & P. Fransz** (2007) Light-regulated large-scale reorganization of chromatin during the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 50, 848-857.
- Testillano, P. S.** 1991. Estudio citoquímico e inmunocitoquímico de la función nuclear durante la interfae postmeiótica del polen. Univesidad complutense de Madrid.
- Testillano, P. S., M. J. Coronado, J. M. Segui, J. Domenech, P. Gonzalez-Melendi, I. Raska & M. C. Risueño** (2000) Defined nuclear changes accompany the reprogramming of the microspore to embryogenesis. *Journal of Structural Biology*, 129, 223-232.
- Testillano, P. S., M. J. Coronado, A. M. Thierry, E. Matthys-Rochon & M. C. Risueño** (2010) In situ detection of Esr proteins secretion during maize microspore embryogenesis and their secretion blockage show effects on the culture progression. *Functional Plant Biology*, 37, 985-994.
- Testillano, P. S., P. Gonzalez-Melendi, P. Ahmadian, B. Fadon & M. C. Risueño** (1995) The immunolocalizacion of nuclear antigens during the pollen developmental program and the induction of pollen embryogenesis. *Experimental Cell Research*, 221, 41-54.
- Testillano, P. S., P. Gonzalez-Melendi, M. J. Coronado, J. M. Segui-Simarro, M. A. Moreno-Risueno & M. C. Risueño** (2005) Differentiating plant cells switched to proliferation remodel the functional organization of nuclear domains. *Cytogenetic and Genome Research*, 109, 166-174.
- Testillano, P. S., P. Gonzalez-Melendi, J. Reyes, K. Koberna, C. G. Mena & M. C. Risueño** (1994) The MA method used as nucleic acid cytochemistry for immunogold studies of plant and animal cell nuclei. *Electron Microscopy 1994, Vols 3a and 3b*, 487-488.
- Testillano, P. S., E. Gorab & M. C. Risueño** (1994) A new approach to map transcription sites at the ultrastructural level. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 42, 1-10.
- Testillano, P. S., C. Ramirez, J. Domenech, M. J. Coronado, P. Vergne, E. Matthys-Rochon & M. C. Risueño** (2002) Young microspore-derived maize embryos show two domains with defined features also present in zygotic embryogenesis. *International Journal of Developmental Biology*, 46, 1035-1047.
- Testillano, P. S. & M. C. Risueño.** 1988. Evolution of nuclear interchromatin structures during microscope interphase periods. In "Sexual Reproduction in Higher Plants" (M. Cresti, P. Gori, and E. Paccini, Eds.). Berlin. Heidelberg: Springer-Verlag.
- Testillano, P. S., M. A. Sanchez-Pina, A. Olmedilla, J. P. Fuchs & M. C. Risueño** (1993) Characterization of the interchromatin region as the nuclear domain

- containing SNRNPS in plant-cells - A cytochemical and immunoelectron microscopy study. *European Journal of Cell Biology*, 61, 349-361.
- Testillano, P. S. a. R., M. C.** 1998. Hibridación in situ a nivel ultraestructural (con ribosondas marcadas no radiactivamente) para localizar genes y ARNs. In "Manual de Técnicas de microscopía electrónica (M.E.T). Aplicaciones biológicas.". Granada.: Universidad de Granada.
- Thomas, S. G. & V. E. Franklin-Tong** (2004) Self-incompatibility triggers programmed cell death in Papaver pollen. *Nature*, 429, 305-309.
- Thornberry, N. A.** (1998) Caspases: key mediators of apoptosis. *Chemistry & Biology*, 5, R97-R103.
- Thornberry, N. A. & Y. Lazebnik** (1998) Caspases: Enemies within. *Science*, 281, 1312-1316.
- Thorpe, G. H. G., L. J. Kricka, S. B. Moseley & T. P. Whitehead** (1985) Phenols as enhancers of the chemi-luminescent horseradish-peroxidase luminol hydrogen-peroxide reaction - Application in luminescence-monitored enzyme immunoassays. *Clinical Chemistry*, 31, 1335-1341.
- Tian, G.-W., M.-H. Chen, A. Zaltsman & V. Citovsky** (2006) Pollen-specific pectin methylesterase involved in pollen tube growth. *Developmental Biology*, 294, 83-91.
- Tieman, D. M. & A. K. Handa** (1994) Reduction in pectin methylesterase activity modifies tissue integrity and cation levels in ripening tomato (*Lycopersicon-Esculentum* mill) fruits. *Plant Physiology*, 106, 429-436.
- Toeller, A., L. Brownfield, C. Neu, D. Twell & P. Schulze-Lefert** (2008) Dual function of *Arabidopsis* glucan synthase-like genes GSL8 and GSL10 in male gametophyte development and plant growth. *Plant Journal*, 54, 911-923.
- Tong, D., M. Poot, D. Hu & D. Oda** (2000) 5-Fluorouracil-induced apoptosis in cultured oral cancer cells. *Oral Oncology*, 36, 236-241.
- Touraev, A., A. Ilham, O. Vicente & E. HeberleBors** (1996) Stress-induced microspore embryogenesis in tobacco: An optimized system for molecular studies. *Plant Cell Reports*, 15, 561-565.
- Touraev, A., A. Indrianto, I. Wratschko, O. Vicente & E. HeberleBors** (1996) Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L) induced by starvation at high temperature. *Sexual Plant Reproduction*, 9, 209-215.
- Touraev, A., F. Lezin, E. HeberleBors & O. Vicente** (1995) Maintenance of gametophytic development after symmetrical division in tobacco microspore culture. *Sexual Plant Reproduction*, 8, 70-76.
- Touraev, A., M. Pfosser & E. Heberle-Bors** (2001) The microspore: A haploid multipurpose cell. *Advances in Botanical Research, Vol 35*, 35, 53-109.
- Touraev, A., M. Pfosser, O. Vicente & E. HeberleBors** (1996) Stress as the major signal controlling the developmental fate of tobacco microspores: Towards a unified model of induction of microspore/pollen embryogenesis. *Planta*, 200, 144-152.
- Touraev, A., O. Vicente & E. HeberleBors** (1997) Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends in Plant Science*, 2, 297-302.
- Touraev A, F. B., Jain SM.** 2009. Advances in haploid production in higher plants. Berlin: Springer.
- Trabelsi, E., S. Naija, N. Elloumi, Z. Belfeleh, M. Msellem, R. Ghezal & S. Bouzid** (2011) Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of olive *Olea europaea* (L.) 'Chetoui'. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 319-324.

- Trentani, A., P. S. Testillano, M. C. Risueño & M. Biggiogera** (2003) Visualization of transcription sites at the electron microscope. *European Journal of Histochemistry*, 47, 195-200.
- Tsuwamoto, R., H. Fukuoka & Y. Takahata** (2007) Identification and characterization of genes expressed in early embryogenesis from microspores of *Brassica napus*. *Planta*, 225, 641-652.
- Tupy, J.** (1982) Alterations in polyadenylated RNA during pollen maturation and germination. *Biologia Plantarum*, 24, 331-340.
- Tupy, J., J. Suss, E. Hrabetova & L. Rihova** (1983) Developmental-changes in gene-expression during pollen differentiation and maturation in *Nicotiana tabacum* L. *Biologia Plantarum*, 25, 231-237.
- Tuvesson S, v. P. R., Ljungberg A.** 2003. Wheat anther culture. In: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I (eds) Doubled haploid production in crop plants—a manual. Dordrecht: Kluwer.
- Twell, D.** (1994) The diversity and regulation of gene expression in the pathway of male gametophyte development. *Molecular and Cellular Aspects of Plant Reproduction*, 55, 83-135.
- Twell, D.** (2006) A blossoming romance: gamete interactions in flowering plants. *Nature Cell Biology*, 8, 14-16.
- Twell, D.** (2011) Male gametogenesis and germline specification in flowering plants. *Sexual Plant Reproduction*, 24, 149-160.
- Twell, D., S. K. Park, T. J. Hawkins, D. Schubert, R. Schmidt, A. Smertenko & P. J. Hussey** (2002) MOR1/GEM1 has an essential role in the plant-specific cytokinetic phragmoplast. *Nature Cell Biology*, 4, 711-714.
- Twell, D., S. K. Park & E. Lallane** (1998) Asymmetric division and cell-fate determination in developing pollen. *Trends in Plant Science*, 3, 305-310.
- Twell D, S.-A., David Honys.** 2006. Pollen Development, a Genetic and Transcriptomic View. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Tyas, L., V. A. Brophy, A. Pope, A. J. Rivett & J. M. Tavaré** (2000) Rapid caspase-3 activation during apoptosis revealed using fluorescence-resonance energy transfer. *Embo Reports*, 1, 266-270.
- Ueda, K. & I. Tanaka** (1995) Male gametic nucleus-specific H2B and H3 histones, designated GH2B and GH3, in *Lilium longiflorum*. *Planta*, 197, 289-295.
- Uren, A. G., K. O'Rourke, L. Aravind, M. T. Pisabarro, S. Seshagiri, E. V. Koonin & V. M. Dixit** (2000) Identification of paracaspases and metacaspases: Two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Molecular Cell*, 6, 961-967.
- Valledor, L., R. Hasbun, M. Meijon, J. L. Rodriguez, E. Santamaria, M. Viejo, M. Berdasco, I. Feito, M. F. Fraga, M. J. Canal & R. Rodriguez** (2007) Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 91, 75-86.
- Valledor, L., R. Hasbun, R. Rodriguez & M. J. Canal** (2009) RNA-free DNA Extraction Protocol from Pinus Tissues for Molecular Biology or HPCE/HPLC Analyses. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 18, 229-232.
- Valledor, L., M. Meijon, R. Hasbun, M. J. Canal & R. Rodriguez** (2010) Variations in DNA methylation, acetylated histone H4, and methylated histone H3 during *Pinus radiata* needle maturation in relation to the loss of *in vitro* organogenic capability. *Journal of Plant Physiology*, 167, 351-357.

- Van Breusegem, F. & J. F. Dat** (2006) Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology*, 141, 384-390.
- van der Hoorn, R. A. L. & J. D. Jones** (2004) The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 400-407.
- Vanaelst, A. C. & J. L. Vanwent** (1992) Ultrastructural immuno-localization of pectins and glycoproteins in *Arabidopsis thaliana* pollen grains. *Protoplasma*, 168, 14-19.
- Vanlammeren, A. A. M., C. J. Keijzer, M. T. M. Willemse & H. Kieft** (1985) Structure and function of the microtubular cytoskeleton during pollen development in *Gasteria-Verrucosa* (MILL) H DUVAL. *Planta*, 165, 1-11.
- Vanyushin, B. F.** (2006) DNA methylation and epigenetics. *Russian Journal of Genetics*, 42, 985-997.
- Vanyushin, B. F. & V. V. Ashapkin** (2011) DNA methylation in higher plants: Past, present and future. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms*, 1809, 360-368.
- Vanyushin, B. F., L. E. Bakeeva, V. A. Zamyatnina & N. I. Aleksandrushkina** (2004) Apoptosis in plants: Specific features of plant apoptotic cells and effect of various factors and agents. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology, Vol. 233*, 233, 135-179.
- Vanyushin, B. F. & M. D. Kirnos** (1988) DNA methylation in plants. *Gene*, 74, 117-121.
- Varnier, A. L., C. Jacquard & C. Clement** (2009) Programmed Cell Death and Microspore Embryogenesis. *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, 147-154.
- Varnier, A. L., F. Mazeyrat-Clourbeyre, R. S. Sangwan & C. Clement** (2005) Programmed cell death progressively models the development of anther sporophytic tissues from the tapetum and is triggered in pollen grains during maturation. *Journal of Structural Biology*, 152, 118-128.
- Vasil, I. K.** (1967) Physiology and cytology of anther development. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 42, 327-&.
- Vercammen, D., B. van de Cotte, G. De Jaeger, D. Eeckhout, P. Casteels, K. Vandepoele, I. Vandenberghe, J. Van Beeumen, D. Inze & F. Van Breusegem** (2004) Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 45329-45336.
- Viejo, M., R. Rodriguez, L. Valledor, M. Perez, M. J. Canal & R. Hasbun** (2010) DNA methylation during sexual embryogenesis and implications on the induction of somatic embryogenesis in *Castanea sativa* Miller. *Sexual Plant Reproduction*, 23, 315-323.
- Vizcay-Barrena, G. & Z. A. Wilson** (2006) Altered tapetal PCD and pollen wall development in the *Arabidopsis* ms1 mutant. *Journal of Experimental Botany*, 57, 2709-2717.
- Wagner, V. T., M. Cresti, P. Salvatici & A. Tiezzi** (1990) Changes in volume, surface-area, and frequency of nuclear-pores on the vegetative nucleus of Tobacco pollen in fresh, hydrated, and activated conditions. *Planta*, 181, 304-309.
- Wahle, E. & U. Rügsegger** (1999) 3'-End processing of pre-mRNA in eukaryotes. *Fems Microbiology Reviews*, 23, 277-295.
- Walsh, K. A. J. & M. Horrocks** (2008) Palynology: Its position in the field of forensic science. *Journal of Forensic Sciences*, 53, 1053-1060.
- Wan, L. L., X. Y. Xia, D. F. Hong, J. Li & G. S. Yang** (2010) Abnormal Vacuolization of the Tapetum During the Tetrad Stage is Associated with Male Sterility in the Recessive Genic Male Sterile *Brassica napus* L. Line 9012A. *Journal of Plant Biology*, 53, 121-133.

- Wan, Y., R. L. Poole, A. K. Huttly, C. Toscano-Underwood, K. Feeney, S. Welham, M. J. Gooding, C. Mills, K. J. Edwards, P. R. Shewry & R. A. C. Mitchell (2008) Transcriptome analysis of grain development in hexaploid wheat. *Bmc Genomics*, 9.
- Wang, H., J. Li, R. M. Bostock & D. G. Gilchrist (1996) Apoptosis: A functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *Plant Cell*, 8, 375-391.
- Wang, M., S. van Bergen & B. Van Duijn (2000) Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding. *Plant Physiology*, 124, 523-530.
- Wei, L. Q., W. Y. Xu, Z. Y. Deng, Z. Su, Y. B. Xue & T. Wang (2010) Genome-scale analysis and comparison of gene expression profiles in developing and germinated pollen in *Oryza sativa*. *Bmc Genomics*, 11, 20.
- Weiss, A. & H. Cedar (1997) The role of DNA demethylation during development. *Genes to Cells*, 2, 481-486.
- Wen, F. S., Y. M. Zhu & M. C. Hawes (1999) Effect of pectin methyl-esterase gene expression on pea root development. *Plant Cell*, 11, 1129-1140.
- Wenzel, G., U. Frei, A. Jahoor, A. Graner & B. ForoughiWehr (1995) Haploids - An integral part of applied and basic research. *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*, 22, 127-135.
- West, M. A. L. & J. J. Harada (1993) Embryogenesis in higher-plants - An overview. *Plant Cell*, 5, 1361-1369.
- Willats, W. G. T. & J. P. Knox (1999) Immunoprofiling of pectic polysaccharides. *Analytical Biochemistry*, 268, 143-146.
- Willats, W. G. T., P. Knox & J. D. Mikkelsen (2006) Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 97-104.
- Willats, W. G. T., L. McCartney, W. Mackie & J. P. Knox (2001) Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*, 47, 9-27.
- Willats, W. G. T., C. Orfila, G. Limberg, H. C. Buchholt, G. van Alebeek, A. G. J. Voragen, S. E. Marcus, T. Christensen, J. D. Mikkelsen, B. S. Murray & J. P. Knox (2001) Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls - Implications for pectin methyl-esterase action, matrix properties, and cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 19404-19413.
- Willemse, M. T. a. V. W., J. 1984. The female gametophyte. In "Embryology of angiosperms" (B. M. Johri, Ed.). Heidelberg: Springer-Verlag.
- Willing, R. P., D. Bashe & J. P. Mascarenhas (1988) An analysis of the quantity and diversity of messenger-RNAs from pollen and shoots of *Zea-Mays*. *Theoretical and Applied Genetics*, 75, 751-753.
- Willing, R. P. & J. P. Mascarenhas (1984) Analysis of the complexity and diversity of messenger-RNAs from pollen and shoots of *Tradescantia*. *Plant Physiology*, 75, 865-868.
- Wilms, H. & C. J. Keijzer. 1988. Plant sperm cells as tools for biotechnology. Wageningen: Pudoc.
- Wilson, Z. A., J. Song, B. Taylor & C. Yang (2011) The final split: the regulation of anther dehiscence. *Journal of Experimental Botany*, 62, 1633-1649.
- Wilson, Z. A. & C. Y. Yang (2004) Plant gametogenesis: conservation and contrasts in development. *Reproduction*, 128, 483-492.
- Wilson, Z. A. & D.-B. Zhang (2009) From *Arabidopsis* to rice: pathways in pollen development. *Journal of Experimental Botany*, 60, 1479-1492.
- Wodhouse, R. 1965. pollen grain. New York: Hafner.

- Wolf, S., G. Mouille & J. Pelloux** (2009) Homogalacturonan Methyl-Esterification and Plant Development. *Molecular Plant*, 2, 851-860.
- Woltering, E. J.** (2004) Death proteases come alive. *Trends in Plant Science*, 9, 469-472.
- Wu, H. M. & A. Y. Cheung** (2000) Programmed cell death in plant reproduction. *Plant Molecular Biology*, 44, 267-281.
- Wyatt, G. R.** (1951) The purine and pyrimidine composition of deoxypentose nucleic acids. *Biochemical Journal*, 48, 584-590.
- Xiao, W. Y., K. D. Custard, R. C. Brown, B. E. Lemmon, J. J. Harada, R. B. Goldberg & R. L. Fischer** (2006) DNA methylation is critical for *Arabidopsis* embryogenesis and seed viability. *Plant Cell*, 18, 805-814.
- Xu, L., U. Najeeb, G. X. Tang, H. H. Gu, G. Q. Zhang, Y. He & W. J. Zhou** (2007) Haploid and Doubled Haploid Technology. *Advances in Botanical Research: Incorporating Advances in Plant Pathology, Vol 45*, 45, 181-216.
- Xu, Y. & M. R. Hanson** (2000) Programmed cell death during pollination-induced petal senescence in petunia. *Plant Physiology*, 122, 1323-1333.
- Yamamoto, Y., M. Nishimura, I. Hara-Nishimura & T. Noguchi** (2003) Behavior of vacuoles during microspore and pollen development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 44, 1192-1201.
- Yamauchi, T., S. Moritoh, Y. Johzuka-Hisatomi, A. Ono, R. Terada, I. Nakamura & S. Iida** (2008) Alternative splicing of the rice OsMET1 genes encoding maintenance DNA methyltransferase. *Journal of Plant Physiology*, 165, 1774-1782.
- Yang, W. C., D. Ye, J. Xu & V. Sundaresan** (1999) The SPOROCTELESS gene of *Arabidopsis* is required for initiation of sporogenesis and encodes a novel nuclear protein. *Genes & Development*, 13, 2108-2117.
- Yang, X. H., C. Y. Ye, Z. M. Cheng, T. J. Tschaplinski, S. D. Wullschleger, W. L. Yin, X. L. Xia & G. A. Tuskan** (2011) Genomic aspects of research involving polyploid plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 104, 387-397.
- Yeung, E. C., M. H. Rahman & T. A. Thorpe** (1996) Comparative development of zygotic and microspore-derived embryos in *Brassica napus* L. cv Topas .1. Histodifferentiation. *International Journal of Plant Sciences*, 157, 27-39.
- Yi, B., F. Q. Zeng, S. L. Lei, Y. N. Chen, X. Q. Yao, Y. Zhu, J. Wen, J. X. Shen, C. Z. Ma, J. X. Tu & T. D. Fu** (2010) Two duplicate CYP704B1-homologous genes BnMs1 and BnMs2 are required for pollen exine formation and tapetal development in *Brassica napus*. *Plant Journal*, 63, 925-938.
- Z., C.** 1985. *A study on induction of plants from Citrus pollen.*
- Zaki, M. A. M. & H. G. Dickinson** (1990) Structural-changes during the 1st divisions of embryos resulting from anther and free microspore culture in *Brassica napus*. *Protoplasma*, 156, 149-162.
- Zaki, M. A. M. & H. G. Dickinson** (1991) Microspore-derived embryos in brassica - The significance of division symmetry in pollen mitosis-I to embryogenic development. *Sexual Plant Reproduction*, 4, 48-55.
- Zarsky, V., D. Garrido, N. Eller, J. Tupy, O. Vicente, F. Schoffl & E. Heberleborgs** (1995) The expression of a small heat-shock gene is activated during induction of Tobacco pollen embryogenesis by starvation. *Plant Cell and Environment*, 18, 139-147.
- Zarsky, V., D. Garrido, L. Rihova, J. Tupy, O. Vicente & E. Heberleborgs** (1992) Derepression of the cell-cycle by starvation is involved in the induction of Tobacco pollen embryogenesis. *Sexual Plant Reproduction*, 5, 189-194.
- Zemach, A. & G. Grafi** (2007) Methyl-CpG-binding domain proteins in plants: interpreters of DNA methylation. *Trends in Plant Science*, 12, 80-85.

- Zhang G, Z. D., Tang G, He Y, Zhou W. 2006. Plant development from microspore-derived embryos in oilseed rape as affected by chilling, desiccation and cotyledon excision. In *Plant development from microspore-derived embryos in oilseed rape as affected by chilling, desiccation and cotyledon excision.*, ed. B. Plantarum, 180-186.
- Zhang, X., J. Yazaki, A. Sundaresan, S. Cokus, S. W. L. Chan, H. Chen, I. R. Henderson, P. Shinn, M. Pellegrini, S. E. Jacobsen & J. R. Ecker (2006) Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell*, 126, 1189-1201.
- Zhang YX, L. Y., Chevreau E. 1990. Induction of haploidy in fruit trees. *Acta Hort* 280.
- Zhao, X. Y., Y. H. Su, Z. J. Cheng & X. S. Zhang (2008) Cell fate switch during *in vitro* plant organogenesis. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50, 816-824.
- Zhong, S., P. Salomoni & P. P. Pandolfi (2000) The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nature Cell Biology*, 2, E85-E90.
- Zhou, W. J., G. X. Tang & P. Hagberg (2002) Efficient production of doubled haploid plants by immediate colchicine treatment of isolated microspores in winter *Brassica napus*. *Plant Growth Regulation*, 37, 185-192.
- Zienkiewicz, K., D. J. Smolinski & E. Bednarska (2006) Distribution of poly(A) RNA and splicing machinery elements in mature *Hyacinthus orientalis* L. pollen grains and pollen tubes growing *in vitro*. *Protoplasma*, 227, 95-103.
- Zienkiewicz, K., A. Zienkiewicz, D. J. Smolinski, M. Swidzinski & E. Bednarska (2008) Intracellular organization of the pre-mRNA splicing machinery during *Hyacinthus orientalis* L. pollen development. *Sexual Plant Reproduction*, 21, 217-231.
- Zienkiewicz, K., A. Zienkiewicz, M. I. Rodriguez-Garcia, D. J. Smolinski, M. Swidzinski & E. Bednarska (2008) Transcriptional activity and distribution of splicing machinery elements during *Hyacinthus orientalis* pollen tube growth. *Protoplasma*, 233, 129-139.
- Zienkiewicz, K., A. Zienkiewicz, D. J. Smolinski, K. Rafinska, M. Swidzinski & E. Bednarska (2008) Transcriptional state and distribution of poly(A) RNA and RNA polymerase II in differentiating *Hyacinthus orientalis* L. pollen grains. *Sexual Plant Reproduction*, 21, 233-245.
- Zilberman, D. (2008) The evolving functions of DNA methylation. *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 554-559.
- Zilberman, D., M. Gehring, R. K. Tran, T. Ballinger & S. Henikoff (2007) Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nature Genetics*, 39, 61-69.
- Zlucova, J., B. Janousek & B. Vyskot (2001) Immunohistochemical study of DNA methylation dynamics during plant development. *Journal of Experimental Botany*, 52, 2265-2273.
- Zorio, D. A. R. & D. L. Bentley (2004) The link between mRNA processing and transcription: communication works both ways. *Experimental Cell Research*, 296, 91-97.
- Zur, I., E. Dubas, E. Golemic, M. Szechynska-Hebda, G. Golebiowska & M. Wedzony (2009) Stress-related variation in antioxidative enzymes activity and cell metabolism efficiency associated with embryogenesis induction in isolated microspore culture of triticale (x *Triticosecale* Wittm.). *Plant Cell Reports*, 28, 1279-1287.