

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA
CELULAR Y MOLECULAR DE PLANTAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN (CSIC)



**ESTUDIOS CELULARES Y
MOLECULARES DE LA INDUCCIÓN
Y PRIMERAS ETAPAS DE LA
ANDROGÉNESIS EN CEBADA
(*Hordeum vulgare L.*)**

TESIS DOCTORAL
Amada Pulido Regadera
Granada, 2004

**ESTUDIOS CELULARES Y
MOLECULARES DE LA INDUCCIÓN Y
PRIMERAS ETAPAS DE LA
ANDROGÉNESIS EN CEBADA
(*Hordeum vulgare L.*)**

Memoria presentada por la
Lda. en Bioquímica Amada Pulido Regadera
para aspirar al grado de Doctor

Fdo.: Lda. Amada Pulido Regadera

Adela Olmedilla Arnal, Doctora en Ciencias Químicas,
Científico Titular de la Estación Experimental del Zaidín
del Consejo Superior de Investigaciones Científicas
(Granada)

CERTIFICA:

Que D^o. Amada Pulido Regadera ha realizado el trabajo de investigación titulado “Estudios celulares y moleculares de la inducción y primeras etapas de la androgénesis en cebada (*Hordeum vulgare* L.)” bajo mi dirección y que la presente memoria corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

En cumplimiento de la normativa vigente, me complace informar favorablemente la presentación de esta Tesis Doctoral ante el Tribunal que se designe.

Fdo.: Dra. Adela Olmedilla Arnal
Científico Titular del CSIC
Granada, febrero de 2004

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC) gracias a una beca predoctoral FPD e I de la Junta de Andalucía (Conserjería de Educación y Ciencia)

A mis padres y mi hermana
A José Ángel

Agradecimientos

Han sido muchas las personas que han contribuido a la realización de esta tesis y es difícil plasmar todo el agradecimiento que les proceso en sólo unos pocos párrafos.

En primer lugar, deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mi directora de tesis Adela, la Dra. Adela Olmedilla Arnal, por la confianza depositada en mí al permitirme realizar esta tesis y por su apoyo y ayuda constante a lo largo de toda su realización.

También quiero agradecer a Maribel, la Dra. M^a Isabel Rodríguez, su apoyo que ha hecho posible que esta tesis haya visto la luz y permitirme disponer de todos los medios necesarios para la realización de la misma.

Igualmente quiero también expresar mi gratitud a Juande, el Dr. Juan de Dios Alché, por sus consejos y por estar siempre dispuesto para contestar mis mil y una preguntas.

A la Dra. Carmen Lluch por su labor como tutora y por facilitarme en todo momento los interminables trámites burocráticos que conlleva una tesis.

También quiero expresar mi gratitud a los grupos de la Dra. M^a del Pilar del Vallés y de la Dra. Beata Barnabas por su aportación para el cultivo de anteras y el cultivo de microsporas respectivamente, sin cuya colaboración esta tesis no hubiera sido posible.

Durante el desarrollo de esta tesis llevé a cabo estancias en distintos laboratorios que me permitieron el aprendizaje de diferentes técnicas y que tuvieron como fruto algunos de los resultados presentados en este trabajo. Por ello quisiera agradecer al Dr. Enrique Méndez del CNB (CSIC), a la Dra Martine Devic de la Universidad de Perpignan (Francia) y al Dr. André van Lammeren de la Universidad de Wageningen (Holanda) permitirme trabajar en sus laboratorios y contribuir con sus conocimientos a la realización de esta tesis.

Al Dr. Pepe Marinetto del CIFA (Granada) y a Araceli por su ayuda para la obtención de las plantas de trigo y cebada.

A las Dras. M^a Trini Gallegos y Silvia Márquez y a M^a del Mar, Raquel y Gilberto por su ayuda con las cuestiones de biología molecular.

Sin duda todos y cada uno de los miembros del laboratorio han contribuido a esta tesis y han hecho más agradable el, a veces duro, día a día de un doctorando. A Conchita por su ayuda y consejo en los innumerables problemas de todos los días y su agradable compañía y conversación, que no todo va a ser trabajo, ¿no? A mis compis becarios: a José Carlos por su ayuda y apoyo en los malos momentos y por las risas que nos echamos en los buenos, gracias por tu amistad. A Mounim, compañero de risas y fatigas desde el comienzo de la tesis, ya queda nada campeón, a Mohamed que se nos hizo doctor más o menos a la mitad de la tesis, a los que prácticamente acaban de aterrizar, Cynthia que se nos vino del otro lado del charco y Mariam del país vecino y a los que ahora no están pero espero que pronto volverán: Antonio y Rosa. Tampoco pueden faltar en estos agradecimientos Lamyae, Curro y Wang que nos abandonaron hace ya tiempo ni Raúl que nos acaba de dejar, ¡te echamos de menos!

También quiero agradecer su ayuda a mis compis en los laboratorios de las estancias: A Alberto, por su paciencia de santo, siempre dispuesto a ayudar y con ese buen talante y a Merche, Quique y Evelyn del CNB, muchas gracias por hacerme tan fácil mi estancia en vuestro labo. A Carolina, Paula y Antonio, the latin conection, en Perpignan que hicieron que mi estancia allí fuera inolvidable, os echo de menos, y a Shinichi, mi familia japonesa, con quién compartí los mejores momentos en Holanda. También quiero agradecer a Sylvain (Perpignan) y a Jan W. Vos (Holanda) que me guiaron en mi trabajo en las estancias de Perpignan y Holanda. También quiero agradecer a Feri (Hungría) su inapreciable colaboración en muchos aspectos de esta tesis.

Durante la tesis el centro se vuelve tu segunda casa e incluso, a veces, la primera. Por ello es tan importante que tu estancia sea lo más agradable posible. En mi caso, a ello han contribuido en gran manera, los amigos que hecho durante este tiempo y aquellos que conservo desde la carrera. Por ello aquí no pueden faltar todos ellos. En primer lugar tengo que citar a Marisa, que ya nos ha abandonado de nuevo por los madriles y a Mamen, mis compañeras de fatigas y vicisitudes desde la carrera y con cuyas amistades espero contar de por vida. También tengo que incluir aquí el resto del grupo de desayuno: Laura, Carlota, Sergio, Fran, Juande y Ana, Manolo, Carmen y como no, Andrés que hacen del desayuno con sus risas y tertulias uno de los mejores momentos del día. No quiero dejar de nombrar tampoco a María, Patri, Ana, Quina, Carlos y Alvaro.

Aunque no pertenezcan directamente a este mundillo aquí no pueden faltar mis amigos de siempre que me han escuchado, apoyado y animado durante este tiempo: Juan Carlos, Álvaro, Germán, Román e Isabela, José Antonio y Belén, Javi, Miguel Ángel y José Miguel, Angel, Elia y Mar. También a Mari Carmen que es casi un miembro político del grupo de

biología del polen, por tu apoyo en estos meses que me ha ayudado mucho.

A mis padres, porque siempre me han apoyado, en todo momento, y porque me han enseñado que con esfuerzo y dedicación se puede conseguir lo que se desea. Nunca encontraría palabras suficientes para agradecerlos todo lo que hacéis por mí. A mi hermana, mi mejor amiga, que siempre me escucha y me apoya.

Y para terminar a José Angel, mi descanso y aliento día a día. Sólo tu cariño y comprensión han podido reconfortarme en esos días en los que el desánimo y las dudas me abatían. Tú has hecho esta tesis posible. Te quiero.



Indice

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	7
1. <i>Hordeum vulgare</i> L.: INTERÉS Y ASPECTOS GENERALES	9
2. ANDROGÉNESIS: ORIGEN Y ANTECEDENTES	12
2.1. Rutas del desarrollo androgénico	15
2.2. Desarrollo gametofítico	18
2.3. Embriogénesis zigótica	19
3. <i>Hordeum vulgare</i> L.: MÓDELO PARA EL ESTUDIO DE LA ANDROGÉNESIS EN MONOCOTILEDÓNEAS	20
4. REQUERIMIENTOS FISIOLÓGICOS DE LA ANDROGÉNESIS	21
5. MÉTODOS DE INDUCCIÓN DE ANDROGÉNESIS: CULTIVO DE ANTERAS Y DE MICROSPORAS	24
5.1. Cultivo de anteras	24
5.2. Cultivo de microsporas	26
6. APLICACIONES DE LA ANDROGÉNESIS	28
6.1. Estudio del proceso de embriogénesis	28
7. APROXIMACIONES UTILIZADAS PARA EL ESTUDIO DEL PROCESO ANDROGÉNICO	30
7.1. Análisis genéticos	30
7.2. Estudios estructurales y ultraestructurales	31
7.3. Búsqueda de marcadores bioquímicos y moleculares	33
8. LA PARED CELULAR EN LOS PROCESOS DE EMBRIOGÉNESIS	36
8.1. Proteínas arabinogalactanos	36
8.2. Calosa	38
8.3. Pectinas.	39
9. PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO DE SEMILLAS EN CEBADA: HORDEÍNAS	41
10. ¿CÓMO LLAMAMOS A LAS ESTRUCTURAS OBTENIDAS TRAS LA INDUCCIÓN ANDROGÉNICA?	42
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	45
MATERIALES Y MÉTODOS	49
1. MATERIAL VEGETAL	51
2. DETERMINACIÓN DE LAS FASES DE DESARROLLO DEL POLEN	52
2.1. Tinción con DAPI sobre aplastados	52
3. INDUCCIÓN DE ANDROGÉNESIS	53
3.1. Inducción androgénica mediante cultivo de anteras	55
3.1.1. Pretratamiento de estrés: inducción con manitol	55
3.1.2. Pretratamiento de estrés: choque frío	55
3.2. Inducción de androgénesis mediante cultivo de microsporas aisladas	56
3.2.1. Pretratamiento de inducción	57
3.2.2. Aislamiento de las microsporas	57
3.2.3. Cultivo en el medio de inducción	57

3.2.4. Test de viabilidad del FDA	58
4. PROCESAMIENTO DEL MATERIAL PARA MICROSCOPIA ÓPTICA Y ELECTRÓNICA	59
4.1. Procesamiento para visualización de estructura y ultraestructura	59
4.1.1. Fijación	59
4.1.2. Deshidratación	60
4.1.3. Inclusión en Epón	60
4.1.4. Polimerización	61
4.2. Procesamiento para inmunocitoquímicas e hibridaciones <i>in situ</i>	61
4.2.1. Fijación	61
4.2.2. Deshidratación	61
4.2.3. Inclusión en Unicryl	62
4.2.4. Polimerización	62
4.3. Obtención de cortes semifinos	62
4.4. Tinción de cortes semifinos para su observación al microscopio óptico	63
4.5. Obtención de cortes ultrafinos	64
4.5.1 Recubrimiento de las rejillas con formwar	64
4.6. Tinción de cortes ultrafinos para la observación de su ultraestructura mediante el microscopía electrónica	65
4.6.1. Acetato de uranilo	65
4.6.2. Citrato de plomo	65
5. TÉCNICAS CITOQUÍMICAS	66
5.1. Técnicas para microscopía óptica	66
5.1.1. Tratamiento de los portas con TESPA	66
5.1.2. Detección de proteínas mediante el método de la cloramina T-reactivo de Schiff	67
5.2. Técnicas para microscopía electrónica	68
5.2.1. Detección de proteínas mediante digestión con proteínasa K	68
5.2.2. Determinación de cationes mediante tratamiento con EDTA	68
6. MICROSCOPIA ANALÍTICA DE RAYOS X	68
7. TÉCNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS	69
7. 1. Inmunocitoquímicas para microscopio óptico	69
7.1.1. Preparación del PBS	70
7.1.2. Preparación del antidesvanecedor de fluorescencia	70
7. 2. Inmunocitoquímicas para microscopio electrónico	70
8. MANIPULACIÓN DE ADN	72
8.1. Extracción de ADN	72
8.1.1. Homogenización	72
8.1.2. Separación de fases	73
8.1.3. Precipitación del ADN	73

8.2. Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR	74
8.3. Electroforesis en geles de agarosa de fragmentos de ADN	75
8.4. Secuenciación de ADN	75
9. MANIPULACIÓN DE ARN	76
9.1. Tratamiento del material para manipulación de ARN	76
9.1.1. Preparación de H ₂ O-DEPC	76
9.2. Aislamiento de ARN de plantas	76
9.3. Electroforesis de ARN en geles de agarosa	77
9.4. RT-PCR	78
10. OBTENCIÓN DE LAS SONDAS PARA LAS HIBRIDACIONES <i>IN SITU</i>	80
10.1. Ligación	80
10.2. Manipulación de <i>Escherichia coli</i>	80
10.2.1. Medio de cultivo	81
10.2.2. Preparación de bacteria competentes	81
10.2.3. Transformación de bacterias competentes	82
10.2.4. PCR de colonias	82
10.2.5. Preparación del ADN plasmídico molde	83
10.2.6. Digestión del ADN plasmídico	83
10.2.7. Síntesis de las sondas ARN	85
11. HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> PARA MICROSCOPIA ÓPTICA	85
11.1. Prehibridación	85
11.2. Hibridación	86
11.3. Lavados	87
11.4. Detección inmunocitoquímica de la sonda	87
12. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO: HORDEÍNAS	88
12.1. Extracción de hordeínas y gliadinas	88
12.2. Cuantificación de gliadinas y hordeínas mediante ELISA	90
12.3. Análisis por Western blot de las hordeínas	91
12.3.1. Electroforesis	91
12.3.2. Transferencia	92
12.3.3. Incubación con el anticuerpo	92
12.3.4. Detección por quimioluminiscencia	93
13. HERRAMIENTAS DE BIOINFORMÁTICA	94
RESULTADOS	97
1. ESTABLECIMIENTO DE PARÁMETROS MACROSCÓPICOS INDICADORES DEL ESTADIO DE DESARROLLO DE LAS MICROSPORAS DE CEBADA	99
2. ESTUDIO CITOLÓGICO DEL DESARROLLO GAMETOFÍTICO DEL POLEN DE CEBADA	100
3. CAMBIOS ESTRUCTURALES DURANTE LA INDUCCIÓN Y LAS PRIMERAS ETAPAS DE LA ANDROGÉNESIS	104

3.1. Seguimiento de la evolución de los núcleos	107
3.2. Cambios citológicos tras la inducción androgénica	113
3.2.1. Cultivo de anteras	114
3.2.2. Cultivo de microsporas	120
3.2.3. Cuerpos proteicos durante el desarrollo androgénico	124
3.2.4. Ploidía durante el desarrollo androgénico	126
4. CAMBIOS ULTRAESTRUCTURALES Y CARACTERIZACIÓN DE LA PARED CELULAR DURANTE LA INDUCCIÓN Y LAS PRIMERAS ETAPAS DE LA ANDROGÉNESIS	127
4.1. La pared celular en androgénesis inducida mediante cultivo de anteras	134
4.2. La pared celular en androgénesis inducida mediante cultivo de microsporas	136
4.3. Determinación de la naturaleza de los precipitados presentes en la pared celular durante la androgénesis inducida mediante cultivo de microsporas aisladas	138
4.3.1. Tratamiento con proteinasa K	138
4.3.2. Tratamiento con EDTA	140
4.3.3. Microanálisis de rayos X de los depósitos	140
4.4. Inmunolocalización de componentes de la pared celular	146
4.4.1. Calosa	148
4.4.2. Pectinas	148
4.4.3. Proteínas arabinogalactanos	154
5. HORDEÍNAS	158
5.1. Prolaminas durante el desarrollo zigótico de trigo y cebada	159
5.1.1. Cuantificación de prolaminas mediante ELISA	159
5.1.2. Detección de gliadinas y hordeínas mediante inmunofluorescencia	160
5.1.3. Análisis mediante Western blot	166
5.2. Hordeínas durante la inducción y las primeras etapas de la androgénesis	167
5.2.1. Expresión del gen de la hordeína B1 durante el desarrollo androgénico, zigótico y gametofítico mediante RT-PCR e Hibridación <i>in situ</i>	167
5.2.2. Cuantificación de hordeínas mediante ELISA	172
5.2.3. Análisis mediante Western blot	173
5.2.4. Detección de hordeínas mediante inmunofluorescencia durante la androgénesis y el desarrollo gametofítico	173
6. EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE LA INDUCCIÓN Y PRIMERAS ETAPAS DE LA ANDROGÉNESIS	178
6.1. Gen expresado en la gametogénesis: <i>Hvpg1</i>	180
6.2. Gen expresado durante la androgénesis: <i>ECA1</i>	181

6.3. Genes implicados en la embriogénesis zigótica: <i>HvEMB615</i> y <i>HvNaglu</i>	184
6.3.1. <i>HvEMB615</i>	184
6.3.2. <i>HvNaglu</i>	186
6.4. Gen expresado en el endospermo: <i>END1</i>	192
DISCUSIÓN	195
1. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LA INDUCCIÓN Y PRIMERAS ETAPAS DE LA ANDROGÉNESIS	197
1.1. Rutas androgénicas en la androgénesis de cebada	199
1.2. Dominios cenocíticos dentro de los granos de polen multicelulares	202
1.3. Ploidía	203
1.4. La evolución del polen multicelular al proembrión androgénico	204
2. LA PARED CELULAR EN LA INDUCCIÓN Y PRIMERAS ETAPAS DE LA ANDROGÉNESIS	207
2.1. La composición de la pared celular	209
2.1.1. Calosa	209
2.1.2. Pectinas	211
2.1.3. Proteínas arabinogalactanos	215
2.2. Depósitos de Fe en la pared celular durante la androgénesis mediante cultivo de microsporas	219
3. HORDEÍNAS	224
3.1. Prolaminas durante el desarrollo zigótico de cebada y trigo	225
3.2. Hordeínas durante la inducción y primeras etapas del desarrollo androgénico	229
4. EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE LA INDUCCIÓN Y PRIMERAS ETAPAS DE LA ANDROGÉNESIS	235
4.1. <i>Hvpg1</i>	235
4.2. <i>ECA 1</i>	240
4.3. <i>HvNalu</i> y <i>HvEMB615</i>	242
4.4. <i>END1</i>	245
CONCLUSIONES	249
BIBLIOGRAFÍA	255



Resumen

Esta tesis es una contribución al conocimiento del proceso androgénico mediante el estudio celular y molecular de la androgénesis en cebada. Se ha elegido la cebada como planta modelo por su importancia agronómica y por su alta respuesta a la inducción androgénica. Para la inducción androgénica se ha utilizado tanto el cultivo de anteras como el cultivo de microsporas aisladas. En primer lugar, se realizó un análisis de los cambios citológicos y ultraestructurales que se producen en la inducción androgénica y en las primeras etapas de la formación de los proembriones androgénicos. La comparación de los granos de polen multicelulares obtenidos con ambos métodos mostró que siguen un patrón similar de desarrollo.

En segundo lugar, se realizó un estudio inmunocitoquímico de la composición de la pared celular a lo largo del proceso androgénico centrado en tres componentes: la calosa, las pectinas y las proteínas arabinogalactanos. A partir de este estudio se determinó que los cambios estructurales que sufría la intina como consecuencia de la inducción androgénica estaban acompañados por modificaciones en su composición. Antes de la inducción androgénica las pectinas estaban altamente esterificadas mientras que tras la inducción se producía una estratificación de la intina: las pectinas con bajo grado de esterificación se disponían en la capa más externa al igual que la calosa, que no estaba presente antes de la inducción; mientras que las pectinas con alto grado de esterificación se distribuían al azar en toda la intina. También se determinaron los cambios que se producían en las proteínas arabinogalactanos como consecuencia de la inducción androgénica. Con estos estudios inmunocitoquímicos se estableció además que la calosa puede servir como un marcador de plasmodesmos.

Por otro lado, el estudio ultraestructural de la intina de los granos de polen multicelulares obtenidos mediante cultivo de microsporas aisladas mostró la presencia de unos depósitos de hierro que no estaban

presentes en aquellos que procedían de cultivos de anteras. Esta diferencia sugería que el hierro estaba en exceso en el medio de cultivo de las microsporas aisladas y que se acumulaba en la intina como un mecanismo para aliviar su toxicidad.

Por último se estudió la expresión de una serie de genes durante el desarrollo gametofítico, zigótico y androgénico mediante RT-PCR e hibridación *in situ*. Los genes estudiados fueron: el gen de la hordeína B1, el gen de una poligalacturonasa de polen, un gen específico de androgénesis (*ECA1*), dos genes expresados en embriogénesis zigótica (*HvNaglu* y *HvEMB615*) y un gen específico de endospermo (*END1*).

En el caso del gen de la hordeína B1 se estudió además la presencia de las diferentes hordeínas durante estos procesos mediante ELISA, Western blot e inmunocitoquímica. Así se puso de manifiesto la presencia de hordeínas y gliadinas en etapas muy tempranas del desarrollo de la semilla de cebada y trigo. Por otro lado se detectó la presencia de hordeínas y la expresión de sus genes durante la androgénesis y el desarrollo gametofítico de cebada.

Como resultado de este estudio también se ha puesto de manifiesto la expresión del gen de una poligalacturonasa de polen durante el desarrollo gametofítico y tras la inducción androgénica de cebada lo que parece indicar que tras la inducción androgénica siguen transcribiéndose algunos genes específicos de la ruta gametofítica.

Además se demostró que el gen *ECA1*, específico de las primeras etapas de la androgénesis, se expresa también tras la inducción androgénica por lo que se ha propuesto su utilización como marcador de la inducción androgénica en cebada.

También se determinó que los genes ortólogos en cebada de los genes *EMB615* y *Naglu* implicados en la embriogénesis zigótica de

Arabidopsis se expresan también en la embriogénesis androgénica y zigótica de cebada.

Por último, este estudio mostró que el gen *END1* se expresa en el embrión zigótico de cebada así como en las primeras etapas de la androgénesis, lo que confirma la existencia de genes que tienen una expresión paralela en embriogénesis zigótica y androgénica.



Cebada del alto Egipto



Cebada del bajo Egipto



Cebada malteada

Introducción

1. *Hordeum vulgare* L.: INTERÉS Y ASPECTOS GENERALES

La cebada fue una de las primeras plantas cultivadas por el hombre y en la actualidad figura entre las cinco más cultivadas del mundo. Su cultivo se conoce desde el comienzo de la agricultura y parece tener dos centros de origen situados en el Sudeste de Asia y en el África septentrional. En excavaciones arqueológicas realizadas en el valle del Nilo se descubrieron restos de cebada de alrededor de 15.000 años de antigüedad y también existen restos que indican un uso muy temprano del grano de cebada molido.

El principal producto de la cosecha de cebada es el grano que se utiliza en la alimentación de animales: ganado vacuno, porcino, en avicultura y como materia prima para piensos en general. También tiene importantes aplicaciones industriales por ejemplo en la fabricación de la cerveza, bebida milenaria cuyos orígenes parecen remontarse al 4000 a.C. a los márgenes de los ríos Tigris y Éufrates donde los sumerios ya elaboraban y consumían cerveza. La cebada también se emplea en la obtención de otras bebidas alcohólicas como el whisky, en la preparación de maltas especiales como sustitutivo del café y para la elaboración de azúcares, de preparados de productos alimenticios y de harinas para panificación. Por otro lado, la paja y el follaje también son utilizadas como forraje para los animales.

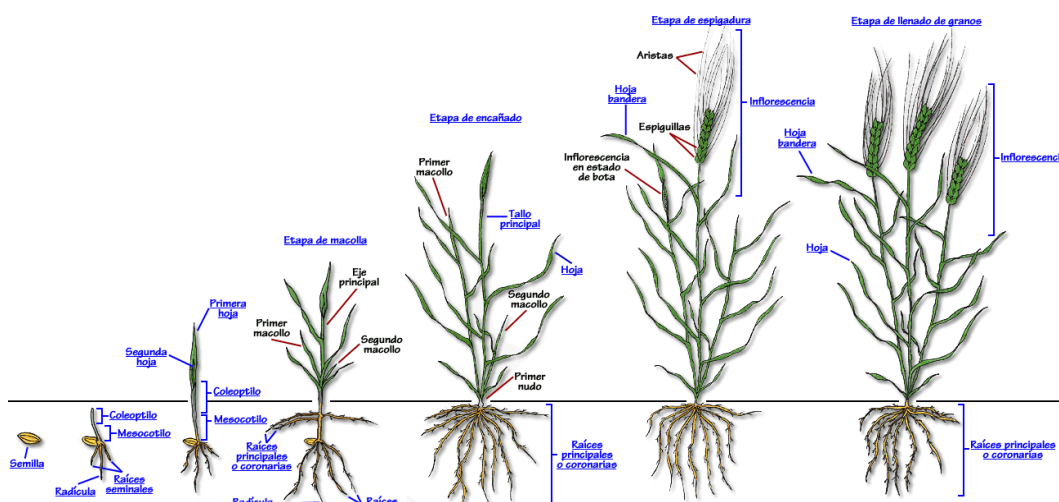
Además de sus múltiples aplicaciones, al éxito en su cultivo ha contribuido su tolerancia a estreses abióticos tales como altas y bajas temperaturas, a la sequía, a deficiencias y toxicidades de minerales y el hecho de tener un ciclo de vida relativamente corto recogido en el esquema 1. Estas características han hecho a la cebada un cultivo capaz de crecer en condiciones medioambientales extremas (Forster y Powell, 1996).

La cebada ocupa el cuarto lugar en importancia entre los cereales, después del trigo, el maíz y el arroz. Los datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (F.A.O.) (tabla 1) muestran que la producción mundial de cebada en el 2002 ascendió a un total de 132.215.617 millones de toneladas, de las cuales 43.735.607 millones fueron obtenidos en la Unión Europea. España con su producción de 8.332.900 millones de toneladas de cebada es el tercer máximo productor de este cereal en la Unión Europea por detrás de Francia y Alemania y ocupa el quinto lugar en la producción mundial.

Países	Producción año 2002 (millones de toneladas)
Total	132.215.617
Rusia	18.688.000
Francia	10.933.000
Alemania	10.927.970
Ucrania	10.358.000
España	8.332.900
Turquía	7.500.000
Canadá	7.282.600
Reino Unido	6.192.000
E.E.U.U.	4.939.580
Dinamarca	4.136.000
Polonia	3.369.088
Australia	3.268.000

Tabla 1. Producción de cebada en millones de toneladas en el año 2002. Fuente: F.A.O. 2002

La cebada pertenece a la familia *Poaceae* y se pueden distinguir dos importantes especies cultivadas: *Hordeum distichon* L., que se emplea para la obtención de cerveza, y *Hordeum hexastichon* L., que se utiliza básicamente como forraje para la alimentación animal; ambas especies pueden agruparse bajo el nombre único de *Hordeum vulgare* L. ssp. *vulgare*. La cebada como cultivo se desarrolló a partir de la domesticación de la especie salvaje *H. spontaneum*. Se pueden producir fácilmente híbridos fértiles entre *Hordeum vulgare* y su progenitor *H. spontaneum* y no hay barrera para la recombinación, por lo que algunos taxonomistas los agrupan en una sola especie. Además, ambas son diploides y tienen el mismo símbolo genómico ($2n=2x=14$, HH).



Esquema 1. Crecimiento y desarrollo de la planta de cebada. Fuente: www.puc.cl

La cebada cultivada es endogámica y los programas de mejora del cultivo ayudan a producir líneas superiores homocigóticas y como consecuencia, verdadera mejora. Esto se ha conseguido tradicionalmente mediante el cruce de dos o más genotipos complementarios de *H. vulgare* seguido de repetidos autocruzamientos y ciclos de selección de los rasgos deseados (Rasmusson, 1992). En la actualidad existen distintos métodos

para producir haploides y dobles haploides homocigóticos de cebada para mejora vegetal, entre ellos destaca la androgénesis también denominada embriogénesis del polen o embriogénesis de la microspora. Este método permite la producción de plantas haploides a partir del cultivo de anteras o de microsporas aisladas de estas anteras.

2. ANDROGÉNESIS: ORIGEN Y ANTECEDENTES

No está claro el origen del proceso androgénico. Por un lado, las plantas tienen un increíble potencial para la totipotencia. La totipotencia es la cualidad de las células vegetales diferenciadas de retener en su núcleo la capacidad de revertir a la condición embriogénica para regenerar una nueva planta entera (Reynolds, 1997). La totipotencia es la base de la embriogénesis somática en la que tiene lugar una desdiferenciación y una posterior rediferenciación de las células al cultivarlas *in vitro* bajo unas determinadas condiciones. Reynolds (1997) describió otro tipo de embriogénesis, la embriogénesis del polen o de la microspora también llamada androgénesis, como uno de los ejemplos más impresionantes de la totipotencia celular al permitir la formación de embriones y plantas haploides a partir de granos de polen. Sin embargo, las microsporas son estructuras altamente diferenciadas que según las leyes de la totipotencia tendrían una capacidad muy reducida de regenerar una planta entera y a pesar de esto en algunas especies la inducción androgénica es más fácil que la producción de embriones somáticos a partir del cultivo de cualquier tejido menos especializado de la misma planta. Además, no todas las microsporas de una antera responden a la inducción androgénica, sólo algunas parecen tener una tendencia especial a hacerlo e incluso en algunas especies la androgénesis se puede producir espontáneamente. Estos hechos junto

con otras peculiaridades del proceso androgénico que hacían difícil encuadrarlo dentro del fenómeno de la totipotencia condujeron a nuestro grupo a postular la hipótesis de que el proceso androgénico pudiera tener un origen atávico (Bonet *et al.*, 1998). El atavismo está definido como la reaparición de un carácter perdido, ya sea morfológico o de comportamiento, típico de ancestros remotos y no expresado en los padres o ancestros recientes del organismo que muestra el carácter atávico (Verhulst, 1996). La capacidad de una célula haploide de formar estructuras multicelulares sería el carácter atávico que se volvería a expresar en las microsporas cuando fueran sometidas a un estrés. Este carácter o capacidad morfogénica se encontraba ya presente en los meiocitos de las algas primitivas, de las plantas terrestres más primitivas y de los helechos que pueden considerarse como las estructuras precursoras evolutivamente del grano de polen.

Atendiendo a estos dos posibles orígenes de la androgénesis encontramos dos definiciones para este proceso:

Teniendo como origen la totipotencia vegetal, Reynolds (1997) propone que la androgénesis se produce cuando, durante la microgametogénesis, el grano de polen que posee una cierta diferenciación para formar tubos polínicos y gametos entra en una ruta de desarrollo alternativa en la que las microsporas inician un crecimiento indeterminado que da lugar a plantas maduras con un número haploide de cromosomas.

Teniendo como origen el atavismo propuesto por nuestro grupo (Bonet *et al.*, 1998) la androgénesis se definiría como el proceso mediante el cual una microspora sometida a un estrés determinado, cambia su patrón de expresión génica para adquirir la capacidad embriogénica, implicando este nuevo patrón la expresión de genes reguladores que se manifestaban comúnmente en los ancestros de las plantas con semilla y

que desencadenan la formación del embrión, un carácter exclusivo de las espermatofitas.

Independientemente de su origen, el estudio de este proceso tiene un gran interés en la actualidad por su aplicación en la mejora vegetal (Kasha *et al.*, 1990) y como modelo para el estudio del proceso de embriogénesis.

Como ya se ha dicho anteriormente la androgénesis puede tener lugar, aunque en muy raras ocasiones, de forma espontánea en la naturaleza. Así se ha descrito en algunos híbridos del género *Solanum* (Ramanna, 1974; Ramanna y Hermsen, 1974), en *Narcissus* (Koul y Karihaloo, 1977) y en *Paeonia* (Li, 1982). Sin embargo la inducción se consigue normalmente mediante cultivo *in vitro* y así fue descrita por primera vez por Guha y Maheshwari (1964 y 1966) utilizando una planta de la familia de las Solanaceas, *Datura innoxia*. Estos investigadores encontraron que cuando las anteras de *Datura innoxia* eran cultivadas en un medio de sales minerales que contenía un hidrolizado de caseína, ácido indol acético, y quinolina, un número sustancial de los granos de polen encerrados en la antera sufrían una serie de divisiones sucesivas y tras 6 o 7 semanas daban lugar a embrioides en desarrollo que emergían de la antera. Este estudio representó un hito en las investigaciones de cultivo de tejidos de plantas y abrió el camino para la producción de plantas haploides. Sólo tres años después, en 1967, Bourgin y Nitsch obtuvieron plantas haploides completas mediante el cultivo *in vitro* de anteras de *Nicotiana tabacum*. La androgénesis inducida mediante cultivo *in vitro* de anteras puede ser directa o indirecta. En la androgénesis directa el polen sufre sucesivas divisiones que dan lugar a un embrión y después a una planta haploide (Reinert y Bajaj, 1977; Sopory y Munshi, 1996). En la androgénesis indirecta, el polen se divide primero para dar lugar a un callo que rompe la pared de la antera y por organogénesis o

embriogénesis somática da lugar a una planta haploide (Vasil, 1980; Maheshwari *et al.*, 1982). Posteriormente, se desarrollaron los métodos de cultivo de microsporas aisladas que permiten un estudio más directo del proceso androgénico al eliminarse la presencia de los tejidos de la antera.

2.1. Rutas del desarrollo androgénico

El origen de los proembriones del polen ha sido descrito a nivel de microscopía óptica y electrónica en una amplia variedad de especies (Raghavan, 1986; Reynolds, 1990). Independientemente de que la androgénesis se produzca mediante cultivo de anteras o de microsporas aisladas, como consecuencia de la inducción androgénica el polen se desvía de la ruta gametofítica y sufre la primera división embriogénica que puede ser tanto simétrica como asimétrica (Reynolds, 1997). Los patrones iniciales de división celular que sufre el polen tras la inducción androgénica varían según las especies y/o las condiciones de inducción (Sunderland, 1974). Estos patrones o modelos de división se han agrupado en las denominadas rutas androgénicas que están recogidas en la figura 1, basada en las rutas de Raghavan (1997):

Ruta A: Fue descrita por primera vez por Sunderland y Wicks (1971) en *Nicotiana tabacum*. En esta ruta las microsporas se dividen asimétricamente y posteriormente la célula vegetativa sufre sucesivas divisiones que dan lugar al embrión mientras que la célula generativa degenera. Esta ruta ha sido observada también en especies como *Capsicum annum*, *Datura innoxia* (Iyer y Raina, 1972), *Brassica spp* (Pechan y Keller, 1988) y *Nicotiana tabacum* (Garrido *et al.*, 1995), *Datura* (Vasil, 1980) y *Zea mays* (Barnabas *et al.*, 1987).

Ruta B: En ella la primera división consecuencia de la inducción androgénica es una división simétrica que da lugar a dos núcleos idénticos que se dividen sucesivamente hasta producir el embrión. Esta ruta ha sido descrita en *Nicotiana* (Nitsch, 1972), *Brassica napus* (Zaki y Dickinson, 1991) y *Triticum aestivum* (Bonet y Olmedilla, 2000).

Ruta C: En ella tras una primera división asimétrica los núcleos vegetativo y generativo se funden y dan lugar a un embrión no haploide. Esta ruta ha sido descrita para *Hordeum vulgare* (Sunderland y Evans, 1980).

Ruta D: Es una variación de la ruta B: la primera división es una división simétrica que da lugar a dos núcleos idénticos que se dividen repetidamente para formar un multinucleado. Esta ruta ha sido descrita en cultivo de anteras de trigo (Zhu *et al.*, 1978; Pan *et al.*, 1983).

Ruta E: En este caso es la célula generativa la que se divide para dar lugar a un embrión mientras que la célula vegetativa degenera directamente o tras unas pocas divisiones. Sólo ha sido descrita hasta la fecha en *Hyoscyamus niger* (Rahavan, 1977)

Dependiendo de la especie predomina una de las rutas aunque la mayoría de las especies siguen las dos primeras (Touraev *et al.*, 1997). Sin embargo se ha observado que la ruta androgénica no sólo varía de una especie a otra, sino que incluso a veces dentro de la misma antera, unos granos de polen siguen una ruta mientras que otros siguen una ruta diferente (Wilson *et al.*, 1978; Pretova *et al.*, 1993; Sangwan y Sangwan-Norreel, 1996). También ha sido descrito en algunos estudios que la preponderancia de la segunda ruta ha estado unida a un tratamiento de estrés específico como el frío (Sunderland, 1982) o el calor (Custers, 1994), y el tratamiento con colchicina (Telmer, 1995).

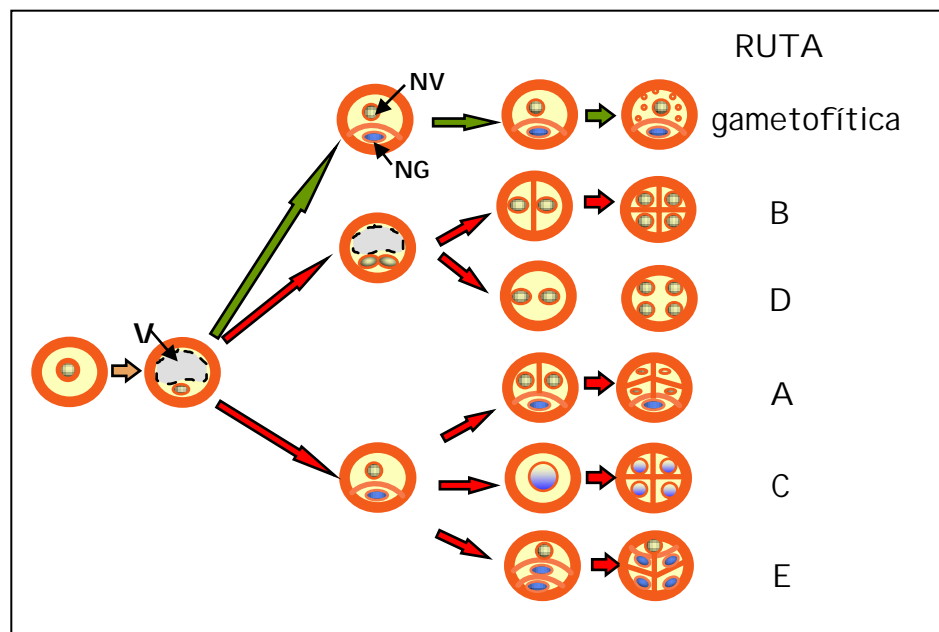


Fig. 1. Esquema de la ruta gametofítica y posibles rutas androgénicas del polen. (Basado en el esquema de Raghavan (1997)). NV: Núcleo vegetativo. NG: Núcleo generativo. V: vacuola.

La androgénesis, como ya se ha apuntado con anterioridad, se produce al desviarse el polen de la ruta gametofítica que da lugar a los gametos. Esta desviación de la ruta gametofítica requiere un cambio en la expresión génica que implica el silenciamiento de una serie de genes, los genes expresados durante el desarrollo gametofítico, y la activación de otros genes, los responsables de la formación de las estructuras embriogénicas. Estos últimos genes podrían ser genes que únicamente se expresaran durante el proceso androgénico o también podrían ser genes implicados en los otros procesos de embriogénesis, la zigótica o la somática. Así, podría decirse que la androgénesis está relacionada tanto con el desarrollo gametofítico como con la embriogénesis zigótica.

2.2. Desarrollo gametofítico

El desarrollo del polen sigue una secuencia estrechamente controlada de sucesos que se pueden dividir en dos procesos principales: la microsporogénesis y la microgametogénesis (Heslop-Harrison, 1966). En la microsporogénesis, que ocurre dentro del lóculo de la antera, un microsporocito diploide llamado también célula madre del polen (CMP) sufre una meiosis y da lugar a una tetra de microsporas unidas mediante una pared de calosa. Estas microsporas crecen y su núcleo migra a una posición periférica en la célula. Es entonces cuando esta microspora sufre una división asimétrica, una primera mitosis haploide. El polen bicelular que resulta de esta división está formado por la célula generativa de pequeño tamaño que se encuentra dentro del citoplasma de la célula vegetativa de tamaño mayor. Posteriormente, la célula generativa sufre una segunda mitosis haploide para dar lugar a las dos células espermáticas implicadas en la doble fertilización. Esta división puede tener lugar dentro de la antera o puede producirse posteriormente dentro del tubo polínico. En el primer caso el polen recibe el nombre de polen tricelular que es característico de familias como las *Gramineae* o las *Cruciferae* mientras que en el segundo se habla de polen bicelular que es el que se forma en aproximadamente el 70% de las familias vegetales (Mascarenhas, 1993). En la siguiente etapa se produce la germinación del tubo polínico. Esta estructura única sirve para transportar las células espermáticas hasta el gametofito femenino (Reynolds, 1997).

En cuanto a la expresión génica durante el desarrollo gametofítico, Mascarenhas (1990) apuntó que al menos dos conjuntos de genes se activaban durante la microsporogénesis. Los genes de expresión temprana “early pollen genes” se activan inmediatamente después de la meiosis y su expresión disminuye tras la primera mitosis. El patrón de

expresión de estos genes tempranos sugiere que son necesarios para el desarrollo inicial del grano de polen. Un segundo grupo de genes, los llamados "late pollen genes", se activan cuando se produce la mitosis de la microspora y sus ARNs mensajeros se acumulan sobre todo en antesis. Se piensa que los transcritos de estos genes están relacionados con la maduración del polen y la germinación del tubo polínico. Se ha postulado que el paso de la transcripción de los genes tempranos a los genes tardíos en el polen representa un periodo de transición crítico durante la microgametogénesis (Bedinger y Ederton, 1990) y es una fase importante para la inducción de androgénesis (Reynolds, 1997).

2.3. Embriogénesis zigótica

La embriogénesis zigótica se inicia con la formación del cigoto. Durante la polinización, el tubo polínico penetra en el saco embrionario a través del micropilo y libera un núcleo espermático que se une con el núcleo haploide de la ovocélula para producir un embrión diploide. Por otro lado, el segundo núcleo espermático se combina con los dos núcleos polares de la célula central para producir el endospermo triploide. El endospermo proporciona nutrientes al embrión en desarrollo y puede persistir en la semilla madura como un tejido de almacenamiento, como ocurre en la cebada, o ser absorbido durante el desarrollo de la semilla como ocurre en otras plantas (Vijayaraghavan y Prabhakar, 1984; Lopes y Larkins, 1993). El desarrollo embriogénico prosigue dentro de los confines del tejido materno que protege al cigoto, este tejido se convierte en la cubierta de la semilla que rodea al embrión en desarrollo y al endospermo. La embriogénesis en plantas superiores se puede dividir en tres fases que se solapan entre sí (West y Harada, 1993). La primera fase es la morfogénesis, durante la cual se define el eje polar del cuerpo de la

planta los ápices del tallo y de la raíz, los tejidos embriogénicos y los diferentes órganos de la planta. La segunda fase es la de maduración del embrión que se caracteriza por la acumulación de sustancias de reserva. Durante la fase final, el embrión se prepara para la desecación, se deseca y entra en un periodo de descanso o dormancia. Existen diferencias en el desarrollo de los embriones de monocotiledóneas y dicotiledóneas. En los embriones de monocotiledóneas están presentes todas las estructuras de la nueva planta excepto los órganos sexuales.

3. *Hordeum vulgare* L.: MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA ANDROGÉNESIS EN MONOCOTILEDÓNEAS

Desde que Guha y Maheswari (1964 y 1966) consiguieron la inducción de androgénesis en *Datura innoxia*, se han realizado enormes esfuerzos para inducir la androgénesis en un gran número de especies. Estas especies pertenecen a muchas familias en las que están incluidas la mayoría de los cultivos de interés agrícola, aunque por ejemplo las leguminosas constituyen todavía una notable excepción (Touraev *et al.*, 1997).

Nicotiana tabacum y *Brassica napus* son las plantas que se utilizan como sistemas modelo, en ellos, la androgénesis se ha estudiado en bastante profundidad. Esto es debido principalmente a la facilidad y el alto rendimiento que presentan estas plantas dicotiledóneas para la inducción de androgénesis. Por otro lado, durante años, los cereales y las monocotiledóneas en general han respondido mal a los sistemas de producción de haploides *in vitro* en comparación con otros cultivos de dicotiledóneas. En general en cereales la frecuencia de respuesta era baja, los efectos del genotipo eran muy fuertes y a menudo en la progenie aparecían un gran número de plantas albinas cuando se inducía

androgénesis. Sin embargo, en la actualidad, se han producido grandes avances que han proporcionado frecuencias de producción de embriones equivalentes a las obtenidas en algunos cultivos de dicotiledóneas (Kasha *et al.*, 1990). Estos resultados se han conseguido combinando medios con una composición más correcta, ambientes más propicios y genotipos de cebada más idóneos (Hunter, 1988; Olsen, 1987; Cistué *et al.*, 1994; Cistué *et al.*, 1995; Castillo *et al.*, 2000a; 2000b y 2001) lo que ha conseguido además que la producción de plantas verdes se haya incrementado enormemente. Estos resultados junto con su importancia económica hacen a *Hordeum vulgare* L. la especie modelo más indicada para el estudio de la androgénesis en monocotiledóneas. Como resultado de estos estudios probablemente se conseguirán mejoras en trigo (*Triticum aestivum* L.) y otros cereales relacionados.

4. REQUERIMIENTOS FISIOLÓGICOS DE LA ANDROGÉNESIS

La lista de factores fisiológicos que pueden afectar a la embriogénesis del polen inducida mediante cultivo de anteras o mediante cultivo de microsporas aisladas es bastante extensa e incluye características como la condiciones de crecimiento y la edad de la planta donadora, el pretratamiento de las anteras, la composición del medio (incluyendo los componentes nutritivos y los no nutrientes, la fuente de carbohidratos y las hormonas), la temperatura de incubación, el medio líquido o sólido, la densidad de las anteras o de las microsporas cultivadas, las condiciones del fotoperíodo y la presencia de tejidos somáticos en el cultivo (Raghavan, 1986; Kasha *et al.*, 1990; Cistué *et al.*, 1994; Cistué *et al.*, 1995; Castillo *et al.*, 2000a, y 2001). Aunque hay pocas generalizaciones acerca de los requerimientos de cultivo para androgenesis hay dos propiedades fisiológicas que influyen mucho en la

inducción androgénica: la etapa del desarrollo en la que se encuentran la microsporas al inicio del cultivo y la necesidad de algún tipo de estímulo externo para que se produzca la respuesta embriogénica (Reynolds, 1997).

Una característica constante en todas las especies en las que se ha conseguido inducir la androgénesis es que el polen debe estar en el estadio apropiado de desarrollo a la hora de someterlo al pretratamiento de inducción. Las diferencias en los resultados obtenidos pueden ser cualitativas, que se produzca o no respuesta, o cuantitativas, un mayor o menor rendimiento (Reynolds, 1997). En la mayoría de los estudios posteriores realizados en una amplia variedad de plantas, el periodo alrededor de la primera mitosis haploide (microspora vacuolada o polen bicelular temprano) parece crítico para la susceptibilidad del polen a la inducción androgénica (Raghavan, 1986). Este periodo es fundamental durante la ontogenia normal del polen pues parece representar un intervalo vulnerable del ciclo mitótico en el que éste puede responder a estímulos externos (Reynolds, 1997). Para la cebada (*Hordeum vulgare* L.) se ha descrito que los mayores porcentajes de regeneración, tanto de cultivo de anteras como de cultivo de microsporas, se obtienen cuando al menos el 50% de la población está en el estadio de microspora vacuolada media o avanzada (Hoekstra *et al.*, 1992)

Otro punto importante para la androgénesis es la necesidad de someter a las espigas o a las anteras a un estímulo externo o un tratamiento de estrés que inicie o potencie la androgénesis. Hay diversos factores ambientales que pueden servir como tratamientos de estrés para inducir la embriogénesis del polen. Por ejemplo, someter a un choque térmico de baja temperatura (5°C) a los botones florales da resultados en *Datura innoxia* (Tyagi *et al.*, 1979), trigo panadero (Armstrong *et al.*, 1987; Henry y Buyser, 1989), *Nicotiana tabacum* (Nitsch, 1974) y arroz

(Genovesi y Magill, 1979). Generalmente, el estrés térmico es más efectivo si se aplica a los botones florales justo antes, durante o inmediatamente después de la primera mitosis haploide. En cultivo de microsporas de *Brassica napus* se utiliza la aplicación de un choque de calor de 32.5 °C durante 4 días. La temperatura es el estrés fisiológico más comúnmente aplicado en la inducción androgénica, pero también se han empleado otros tipos de estreses como la irradiación gamma, la aplicación de alcohol (Pechan y Keller, 1989), el estrés hídrico (Imamura y Harada, 1980), la aplicación de condiciones anaeróbicas (Imamura y Harada, 1981), de una atmósfera saturada de agua (Dunwell, 1981) o el ayuno (Kyo y Harada, 1986). Incluso en aquellas plantas que no requieren ningún estrés para responder a la inducción androgénica, sólo la escisión de las anteras de las plantas donadoras o el cultivo de las microsporas sobre un medio de cultivo se puede considerar como un fuerte estrés físico.

Para la cebada se han utilizado diferentes pretratamientos de estrés para la inducción de androgénesis entre ellos se puede señalar el choque frío a 4 °C a las espigas durante diferente número de días (Huang y Sunderland, 1982; Shannon *et al.*, 1985) o el pretratamiento en manitol desarrollado por Roberts-Oehlschlager y Dunwell (1990) que consiste en cultivar las anteras en un medio con manitol 0.3M que provoca un estrés por ayuno. Este método fue modificado posteriormente por Cistué *et al.* (1994) que utilizaban manitol en una concentración superior, 0.7M, de manera que el estrés por ayuno estaba acompañado por una alta molaridad en el medio lo que incrementaba la regeneración de plantas verdes.

5. MÉTODOS DE INDUCCIÓN DE ANDROGÉNESIS: CULTIVO DE ANTERAS Y DE MICROSPORAS

5.1. Cultivo de anteras

El cultivo de anteras ha sido el método de producción de haploides de cebada que ha recibido mayor atención por su potencial para generar un gran número de haploides (Forster y Powell, 1996). Desde 1964 la técnica de cultivo de anteras ha sido ampliamente utilizada con distinto grado de éxito en la obtención de haploides en muchas plantas incluyendo muchos cultivos de interés económico (Maheshwari *et al.*, 1982). Durante este tiempo se han ido introduciendo algunas mejoras en los medios de cultivo. Por ejemplo, Wernicke y Kohlenbach (1976) y Sunderland y Roberts (1977) introdujeron la técnica de flotación de las anteras en un medio líquido en placas Petri. Esto permitía al polen en desarrollo una mejor disponibilidad de los nutrientes y también eliminaba el efecto de la inhibición competitiva entre los granos de polen potencialmente embriogénicos. Esta técnica ha sido utilizada con éxito en muchas especies (Tyagi *et al.*, 1979; Xu *et al.*, 1981; Chen y Chen, 1983) entre ellas la cebada (Kao, 1981; Kao *et al.*, 1991; Cistué *et al.*, 1994).

Clapham (1971) fue el primero en describir la respuesta de las anteras de cebada en cultivo *in vitro*, consiguiendo la producción de callos. Desde este trabajo inicial se han desarrollado complejos procedimientos para la producción de dobles haploides de cebada. Hay muchas variaciones en los protocolos de cultivo de anteras pero las técnicas están bastante bien establecidas. En todos los casos es esencial crecer a las plantas donadoras en condiciones óptimas y posteriormente recoger las espigas y las anteras antes de la primera mitosis del grano del polen, cuando las microsporas son todavía uninucleadas. Tras los

pretratamientos de inducción las anteras se cultivan en un medio nutritivo que contiene reguladores del crecimiento y maltosa como fuente de hidratos de carbono. Los embriones producidos se subcultivan hasta que se producen tallos verdes y entonces se cultivan en un medio generador de raíces. Posteriormente, las plantas con raíces se plantan en maceta (Powell *et al.*, 1991).

Todavía no se ha visto todo el potencial del cultivo de anteras. Un serio problema en cereales es, como ya se ha dicho, la alta frecuencia de plantas albinas que se producen. También se han encontrado problemas en la regeneración de plantas desde callo (Powell *et al.*, 1984 y 1986) como la inestabilidad genética, las anomalías cromosómicas y la variación somaclonal (Larkin y Scowcroft, 1983). Estos problemas han sido solucionados gracias a una gran mejora en los procedimientos de cultivo. Por ejemplo la sustitución de sacarosa por maltosa ha significado un incremento en el número de plantas verdes producidas por cultivo de anteras (Raquin, 1983; Hunter, 1988; Finnie *et al.*, 1989). La maltosa induce la producción de plantas verdes porque promueve la embriogénesis directa evitando la problemática fase de callo y produciendo plantas genéticamente estables (Finnie *et al.*, 1991). Por otro lado, la reducción de la concentración de NH_4NO_3 y la incorporación de glutamina al medio de cultivo son otros factores que incrementan la eficiencia de la androgénesis en cebada (Olsen, 1987). Además, la producción de plantas albinas depende también del genotipo. Las variedades de cebada que responden mejor al cultivo de anteras son variedades de invierno como la variedad Igri que es la utilizada en esta tesis (Foroughi-Wehr *et al.*, 1982, Larsen *et al.*, 1991).

5.2. Cultivo de microsporas

Uno de las mayores desventajas del cultivo de anteras es que la inducción y las primeras etapas del desarrollo embriogénico ocurren dentro del lóculo de la antera haciendo más difícil el análisis directo de los mecanismos de diferenciación que tienen lugar en las microsporas (Reynolds, 1997). El cultivo de microsporas, desarrollado más recientemente que el cultivo de anteras, ofrece la ventaja de que el tejido esporofítico de la pared de la antera no interfiere en el proceso y el desarrollo del embrión puede por tanto ser seguido más directamente (Touraev, 1997).

La inducción de la embriogénesis del polen a partir del cultivo de microsporas aisladas se realizó por primera vez en *Datura innoxia* (Nitsch y Norreel, 1973). Para ello se pretrataron los botones florales durante 48 horas a 3°C antes del aislamiento del polen. Las suspensiones de polen se cultivaron en medio líquido que había sido preacondicionado mediante la adición de un extracto de anteras cultivadas de la misma planta. Posteriormente la mayoría de los ensayos en cultivo de microsporas han implicado pretratamientos de anteras y el uso de medios acondicionados. Estos protocolos hacen igualmente difícil analizar los acontecimientos de la inducción asociados con la embriogénesis del polen aunque permiten seguir las primeras etapas del desarrollo embriogénico más fácilmente. Se han descrito procedimientos de un solo paso para cultivo de microsporas en algunas plantas. Los mayores éxitos se han conseguido con esta técnica en *Brassica napus* (Pechan y Keller, 1988; Pechan *et al.*, 1991) y *Nicotiana rustica* (Kyo y Harada, 1986). Estos dos sistemas tienen muchas ventajas para el estudio de la androgénesis: (1) no tienen requerimientos de preinducción para la embriogénesis, (2) el medio de cultivo está definido y no requiere la adición de reguladores de

crecimiento, (3) el desarrollo tiene lugar fuera de la antera y por lo tanto es accesible para una posible manipulación y (4) más del 70% de las microsporas sufren embriogénesis.

En cuanto al cultivo de microsporas de cebada, Sunderland y Xu (1982) fueron los primeros que tuvieron éxito con cultivo de polen desprendido mediante agitación de la espiga aunque no lograron regenerar plantas verdes. La mayoría de los estudios posteriores han utilizado pretratamientos de las espigas o de las anteras previos al cultivo de las microsporas, como Kölher y Wenzel (1985) que sí obtuvieron plantas verdes. Sin embargo, Wei *et al.* (1986) aislaron en manitol 0.3M polen de cebada recién recolectado en el estadio de polen bicelular joven y fueron capaces de regenerar plántulas a partir de callos de polen. Hunter (1988) utilizó un pretratamiento de frío durante 28 días a 4°C, tras el que aisló mecánicamente las microsporas de cebada en medio líquido FHG y consiguió regenerar muchas plantas vía androgénesis directa. Este procedimiento implicaba colocar las microsporas en gotas de medio líquido sobre un medio que contenía agar solidificado. También se han obtenido buenos resultados utilizando un pretratamiento de inducción con manitol (Hoekstra *et al.*, 1993; Cistué *et al.*, 1995; Castillo *et al.*, 2000b).

Aunque estas técnicas de cultivo de microsporas eliminan algunos posibles efectos negativos de los tejidos de la antera en cultivo, que se ha visto que ejercen efectos inhibitorios en otras especies y excluyen el desarrollo de callos derivados del tejido de la antera, no se ha conseguido obtener resultados tan eficientes para la producción de haploides en cebada como con el cultivo de anteras (Forster y Powell, 1996; Castillo *et al.*, 2000a). Sin embargo el aislamiento de las microsporas presenta una ventaja adicional frente al cultivo de anteras ya que proporciona mayores oportunidades para la manipulación, tanto

para la transformación como para la selección *in vitro* (Forster y Powell, 1996). Además es muy útil en los procedimientos de extracción de macromoléculas para su análisis bioquímico o molecular como ha ocurrido en esta tesis.

6. APLICACIONES DE LA ANDROGÉNESIS

Dentro de las principales aplicaciones de la androgénesis en cebada están la producción de haploides y dobles haploides. Otra aplicación de la androgénesis es la utilización del cultivo de microsporas en la transformación genética de cebada. Por último, el estudio del proceso androgénico puede ser utilizado como modelo para estudiar la embriogénesis zigótica.

6.1. Estudio del proceso de embriogénesis

La embriogénesis zigótica, ya descrita anteriormente, se desarrolla dentro del saco embrionario que está encerrado dentro de diferentes capas de tejido esporofítico. Estos tejidos actúan como barreras que protegen al embrión pero complican la observación del proceso de formación del embrión y también dificultan la extracción de cantidades suficientes de material para hacer estudios bioquímicos o moleculares de la embriogénesis mediante métodos convencionales. Esto es especialmente evidente en el seguimiento de la embriogénesis temprana que implica estructuras de un reducido número de células.

El estudio de la embriogénesis en plantas comenzó con la microscopía óptica y se desarrolló posteriormente mediante la utilización de técnicas citoquímicas tanto de microscopía óptica como electrónica. Estas técnicas abrieron nuevas perspectivas en el estudio de la actividad

metabólica de la ovocélula antes y después de la fecundación así como en las bases celulares de la polarización y la diferenciación celular desde las primeras divisiones del cigoto (rev. Johri *et al.*, 1992). En cuanto al análisis de macromoléculas implicadas en la embriogénesis zigótica, los resultados se han conseguido sobre todo mediante estudios de mutantes de embriogénesis realizados principalmente en *Arabidopsis* (Meinke, 1994) y maíz (Clark y Sheridan, 1991; Heckel *et al.*, 1999; Scanlon *et al.*, 1994) o mediante citología molecular haciendo uso de técnicas inmunocitoquímicas o de hibridación *in situ* (Clark, 1996; Meinke, 1996; Raghavan 1997; Arenas-Mena *et al.*, 1999). Paralelamente, las técnicas de cultivo de órganos y tejidos han contribuido notablemente al progreso en el conocimiento de la embriogénesis. En este sentido fue crucial el descubrimiento tanto de la embriogénesis somática como de la embriogénesis del polen o androgénica que pueden ser utilizadas como modelos para estudiar el desarrollo zigótico temprano sin las dificultades que para las investigaciones bioquímicas presenta la inaccesibilidad del embrión (Nitsch, 1969). La androgénesis tiene como ventaja que es un sistema de fácil seguimiento celular, aún más con los nuevos sistemas experimentales que permiten estudiar los cambios que ocurren de una manera individualizada (Hause y Hahn, 1998). Además es un sistema muy conveniente para la transformación lo que es ventajoso también para el estudio de la embriogénesis. Por último, otra importante perspectiva para ampliar el conocimiento sobre la embriogénesis temprana se ha abierto recientemente al conseguirse la fertilización *in vitro* de plantas (Kranz y Kumlehn, 1999).

7. APROXIMACIONES UTILIZADAS PARA EL ESTUDIO DEL PROCESO ANDROGÉNICO

Para conseguir una mejor comprensión del proceso androgénico se han utilizado diferentes aproximaciones: estudios estructurales y ultraestructurales mediante microscopía óptica y electrónica, análisis de marcadores moleculares del proceso y análisis genéticos. Estudiaremos primero estos últimos para después ahondar en las dos primeras aproximaciones que son las que se han utilizado para el desarrollo de esta tesis.

7.1. Análisis genéticos

Los análisis genéticos en embriogénesis del polen han estado focalizados en las plantas donadoras más que en los proembriones en desarrollo. Esto es debido a que la producción de plantas derivadas de microsporas en cultivo está determinada en gran medida por el genotipo de la planta (rev. Powell, 1990). Los análisis genéticos son útiles para ayudar a identificar genes críticos para la androgénesis, como los estudios de mapeo mediante RFLP realizados en maíz (Cowen *et al.*, 1992; Murigneux *et al.*, 1994), y para incrementar la eficiencia de la producción de haploides mediante, por ejemplo, la introducción de alelos favorables en genotipos recalcitrantes utilizando métodos de mejora clásica o técnicas de transformación genéticas. Así se ha hecho por ejemplo en patata (Uhrig y Salamini, 1987) y en trigo (Ghaemi y Sarrafi, 1994; Giorgi, 1991) ayudando a la expansión de las aplicaciones comerciales y agrícolas de los haploides.

7.2. Estudios estructurales y ultraestructurales

Los estudios microscópicos pueden proporcionar importante información sobre los cambios celulares asociados con la embriogénesis en plantas (rev. Rodríguez-García *et al.*, 2000). Los primeros estudios ultraestructurales en cultivo de anteras diseñados para identificar cambios subcelulares específicos asociados con la embriogénesis gamética se realizaron en *Nicotiana* al principio de los años 70 (Dunwell y Sunderland, 1974). Desde entonces, estos estudios han contribuido a la identificación de sucesos celulares claves que acompañan a la transición de la ruta gametofítica a la ruta esporofítica como son la alteración en el ciclo celular, los cambios en la simetría de la división celular y la reorganización del citoesqueleto (Hause *et al.*, 1993; Zaki y Dickinson, 1991). También han posibilitado la observación de las primeras divisiones androgénicas permitiendo conocer así el origen de los proembriones androgénicos en una amplia variedad de especies (Raghavan, 1986; Reynolds, 1990) y los cambios citológicos que se producen en el núcleo (Reynolds, 1984 y 1985; Garrido *et al.*, 1995; González-Melendi *et al.*, 1995 y 1996; Testillano *et al.*, 1995; Alché *et al.*, 2000; Bonet y Olmedilla, 2000) y citoplasma (Dunwell y Sunderland, 1974; Chen *et al.*, 1984a; Cho y Zapata, 1988; Zaki y Dickinson, 1990; Garrido *et al.*, 1995; González-Melendi, 1995; Touraev *et al.*, 1996a; Alché *et al.*, 2000; Bonet y Olmedilla, 2000) asociados con la desviación del polen de la ruta gametofítica a la ruta esporofítica. Sin embargo estos estudios se han restringido a un pequeño número de especies. Así, aunque en 1986 la androgénesis ya había sido documentada en más de 170 especies pertenecientes a 28 familias (Raghavan, 1986) sólo se han obtenido datos citológicos de menos de 20 especies pertenecientes a 5 de estas familias (Rodríguez-García *et al.*, 2000). Una de estas 5 familias es

las *Poaceae* a la que pertenece la cebada en la que se ha estudiado este proceso con cierta extensión a nivel citológico

Además todavía se está lejos de tener una visión completa de los cambios ultraestructurales que ocurren durante la desviación de la ruta gametofítica y esporofítica y sería prematuro apuntar a un conjunto de cambios ultraestructurales como típicos de la inducción y del desarrollo de la embriogénesis en el polen de angiospermas (Rodríguez-García *et al.*, 2000). Es necesario realizar estudios más exhaustivos de este proceso a nivel citológico, una mejor caracterización de las diferentes etapas de la androgénesis en un número más amplio de especies vegetales y conseguir mejoras tecnológicas que ayuden a determinar el destino de los diferentes tipos celulares observados durante la inducción de androgénica. Son muy prometedoras en este sentido las técnicas desarrolladas por Kranz *et al.* (1998), y Kumlehn *et al.* (1998) utilizadas inicialmente para el cultivo de las células espermáticas, central y ovocélula aisladas *in vitro*. Este sistema experimental de seguimiento *in vivo* ha sido utilizado para el cultivo de microsporas aisladas (Hause y Hahn, 1998) haciendo posible estudiar los cambios que ocurren de una manera individualizada.

Por otro lado y en conexión con el siguiente apartado de búsqueda de marcadores bioquímicos y moleculares de la androgénesis, la información sobre la localización de proteínas y ácidos nucleicos obtenida mediante técnicas de citología molecular (inmunocitoquímica e hibridación *in situ*) ha sido escasamente explotada hasta ahora, probablemente debido al hecho de que no es fácil aislar y caracterizar proteínas y productos de genes específicos de la androgénesis (Rodríguez-García *et al.*, 2000). Hasta el momento sólo se han publicado unos pocos artículos de inmunolocalización de proteínas específicas no androgénicas. Así se han localizado mediante inmunofluorescencia

proteínas de choque térmico de 70 kDa en *Brassica napus* en la etapa de inducción de la androgénesis (Cordewener *et al.*, 1995). También han sido inmunolocalizados antígenos nucleares durante la inducción de embriogénesis del polen en *Capsicum annuum* (Testillano *et al.*, 1995; González-Melendi *et al.*, 1996). Más recientemente, se han realizado estudios inmunocitoquímicos utilizando anticuerpos anti-ubiquitina que sugieren la implicación de la ruta degradativa de la ubiquitina en la inducción androgénica (Alché *et al.*, 2000). La localización temporal y espacial de transcritos o de polipéptidos durante la androgénesis puede proporcionar valiosas claves sobre su función y su posible papel en el proceso embriogénico.

7.3. Búsqueda de marcadores bioquímicos y moleculares

Una de las principales metas en el estudio de la androgénesis es determinar cómo se induce a los granos de polen a entrar en una nueva ruta de desarrollo para formar embriones en vez de tubos polínicos y gametos. La inducción androgénica lleva consigo la síntesis alterada y la acumulación de ARNs y proteínas en microsporas potencialmente embriogénicas, que conducen a las primeras divisiones esporofíticas (Reynolds, 1997). Aunque no se ha establecido aún para ninguna planta el mecanismo de esta transformación se han identificado algunos marcadores bioquímicos y moleculares de la androgénesis en distintas especies. Se han utilizado dos aproximaciones para identificar marcadores de desarrollo para androgénesis. En la primera, se han utilizado los productos de los genes que se expresan durante la embriogénesis zigótica como sondas para embriones del polen en diferenciación. Mediante esta estrategia se caracterizó uno de los primeros marcadores reconocidos: la glicoproteína de almacenamiento

12S encontrada en embriones derivados de microsporas de *B. napus* (Crouch, 1982). Esta proteína se encuentra normalmente en embriones zigóticos de *Brassica* y aunque no aparece hasta el estadio globular de la androgénesis, es un marcador útil que demuestra que los embriones no zigóticos acumulan proteínas que son características de embriones zigóticos. Posteriormente, Boutilier *et al.* (1994) aplicando la misma aproximación, preparó una biblioteca de ADNc de proembriones androgénicos de *Brassica* y encontró que la expresión de las proteínas de almacenamiento de semillas, las napinas, coincidía con la inducción de la embriogénesis de microsporas y podía por tanto ser utilizada como un marcador para las etapas más tempranas de la inducción.

La segunda aproximación para la identificación de marcadores de desarrollo está basada en una comparación de la expresión de genes durante la microgametogénesis y la embriogénesis inducida en microsporas. Para ello Reynolds y Kitto (1992) prepararon una biblioteca de ADNc de proembriones jóvenes de polen de *Triticum aestivum* y la analizaron con sondas de ADNc preparadas a partir de polen en diferentes etapas de desarrollo identificando los ARNm clonados que estaban regulados en el desarrollo y parecían estar conectados con las primeras etapas de la diferenciación de los proembriones androgénicos. La mayoría de estos clones no han sido identificados pero sí se caracterizó un transcrito específico de proembriones, el gen de una metalotioneína (EcMt) (Reynolds y Crawford, 1996). Las metalotioneínas son proteínas pequeñas ricas en cisteína que tienen capacidad para unir con alta afinidad iones metálicos. Estas proteínas pueden jugar un papel en el metabolismo de metales relativamente no tóxicos tales como el zinc y el cobre y también de metales tóxicos pesados. El transcrito de la EcMt está presente sólo en las microsporas potencialmente embriogénicas, en los proembriones androgénicos y en embriones zigóticos de trigo, por lo

que se puede considerar como un marcador molecular potencialmente útil para las primeras etapas de inducción y diferenciación de proembriones derivados de microsporas. Utilizando una aproximación similar, Zarsky *et al.* (1995) identificaron un ADNc de una proteína de choque térmico de bajo peso molecular (LMHSP) de una biblioteca de ARN aislado de granos de polen binucleado de *Nicotiana tabacum*. Estos investigadores encontraron que este gen se expresaba normalmente durante las últimas etapas de la ontogenia del polen y su transcripción era activada en embriogénesis inducida mediante ayuno, por lo que es un ejemplo de regulación de la transcripción asociada con la inducción androgénica. Recientemente, Vrinten *et al.* (1999) mediante una biblioteca de cDNAs de las primeras etapas de la embriogénesis del polen en cebada consiguieron aislar tres ADNc que no se expresaban en microsporas que no habían sufrido ningún tipo de tratamiento: *ECA1* (early culture abundant 1) que no tenía homología con otros genes previamente aislados pero que parecía codificar una proteína extracelular, que podría ser secretada al medio durante el cultivo y que relacionaron con una AGP atípica secretada por cultivos de células de zanahoria en suspensión (Baldwin *et al.*, 1993), *ECGST* (early culture glutathione S-transferase) que podría tener un papel en la protección de las células del estrés oxidativo durante el proceso de cultivo y *ECLTP* (early culture lipid transfer protein) que tenía homología con proteínas de transferencia de lípidos (LTPs) y un patrón similar a una LTP considerada como marcador de las primeras etapas de la embriogénesis somática de zanahoria *EP2* (embryogenesis protein 2) (Sterk *et al.*, 1991).

Aunque se desconoce la identidad de la mayoría de estos genes, en algunos casos parecen estar relacionados con el estrés o asociados con la embriogénesis zigótica. Los genes relacionados con el estrés están relacionados con la reprogramación general de la célula o proporcionan

algún tipo de protección frente a ese estrés (Reynolds, 1997). Los otros genes esporofíticos pueden ser parte de los procesos celulares globales observados en el cigoto de las angiospermas relacionados con el establecimiento de una población de células meristemáticas (Raghavan, 1986).

Conseguir encontrar un mayor número de marcadores es importante para ayudar a resolver cuestiones como la secuencia temporal en la que se producen los distintos acontecimientos de la inducción androgénica, también para saber qué genes se expresan durante la androgénesis y por último, para conocer su papel en la transformación de las microsporas en proembriones.

8. LA PARED CELULAR EN LOS PROCESOS DE EMBRIOGÉNESIS

La pared celular juega un papel muy importante en la embriogénesis al estar implicada en los procesos de división celular, elongación y diferenciación. Además ha sido descrito que durante el desarrollo del embrión los componentes de la pared celular cambian notablemente y que su expresión génica está estrictamente controlada (Carpita & Gibeaut, 1993) y existen evidencias recientes del papel de componentes de la pared celular en el establecimiento de la polaridad de los embriones, es decir, en la formación del eje apical-basal (rev. Souter y Lindsey, 2000). En esta tesis se han estudiado las proteínas arabinogalactanos (AGPs), las pectinas y la calosa.

8.1. Proteínas arabinogalactanos

Las proteínas arabinogalactanos también llamadas AGPs (arabinogalactan proteins) son uno de los componentes habituales de la

pared celular. Las AGPs son probablemente las moléculas más complejas de la naturaleza y están presentes en todas las células vegetales desde las briofitas a las angiospermas (Majewska-Sawka y Nothnagel, 2000). Con el nombre de AGPs se agrupan muy diferentes proteoglicanos con moléculas muy complejas compuestas por aproximadamente un 90% (peso/peso) de carbohidratos y un núcleo polipeptídico que es muy rico normalmente en Hyp y que también tiene abundantes restos de Ala, Ser y Thr. Las AGPs pueden estar unidas a la membrana, asociadas a la pared, en el espacio que queda entre la membrana y la pared o solubles en el citoplasma (Du *et al.*, 1996; Knox, 1996, Majewska-Sawka A. y Nothnagel A., 2000). Están situadas normalmente en posiciones donde variaciones en sus complejas estructuras pueden servir para marcar la identidad celular, estando implicadas en funciones mediadas por la superficie celular: comunicación, reconocimiento y adhesión célula-célula y célula-matriz y en las interacciones célula-entorno (Clarke *et al.*, 1979; Fincher *et al.*, 1983; Pennel *et al.*, 1991; Lord y Sanders, 1992; McCabe *et al.*, 1997, rev. Cheung y Wu, 1999; rev. Majewska-Sawka y Nothnagel, 2000). Debido a su abundancia, su presencia ubicua y su localización se piensa que son importantes para diferentes y múltiples fases del crecimiento vegetal y para el desarrollo desde la embriogénesis a la fecundación (Cheung y Wu, 1999). Las AGPs son abundantes en tejidos reproductores, tanto masculinos como femeninos: en el estigma ejercen una función de adhesión para los granos de polen, intervienen también en los mecanismos de discriminación que permiten únicamente la entrada de los granos compatibles y también ejercen un papel importante en la elongación del tubo polínico (rev. Cheung. y Wu, 1999). En cuanto a la embriogénesis, ha sido descrito que hay cambios cuantitativos en las AGPs que están probablemente implicados en la iniciación del proceso embriogénico y existen datos de que las AGPs tienen un papel tanto en la

embriogénesis zigótica como somática (Majewska-Sawka, 1998). Las evidencias de que las AGPs están implicadas en la embriogénesis somática, derivan principalmente de estudios inmunocitoquímicos realizados con los anticuerpos monoclonales JIM4 y JIM8, desarrollados respectivamente por Knox *et al.*(1989) y por Pennell *et al.* (1991) y que reaccionan específicamente con dos tipos diferentes de AGPs. El epitopo que reconoce JIM4 está presente en los cultivos de maíz en las células periféricas de las masas proembriogénicas pero no en las células no embriogénicas (Šamaj *et al.*, 1999a). En embriones somáticos tempranos de zanahoria este epitopo puede ser encontrado en la capa dérmica y en etapas más avanzadas de la embriogénesis en el tejido provascular del ápice de la raíz y de los cotiledones (Stacey *et al.*, 1990). Por otro lado, la AGP que reconoce el anticuerpo JIM8 se describió inicialmente como un marcador del estado de transición al embrión dentro de las células que rodean la masa proembriogénica de las suspensiones de células embriogénicas de zanahoria en cultivo (Pennell *et al.*, 1992). Posteriormente, se ha demostrado que la mayoría de los embriones somáticos se desarrollan a partir de células que carecen del epitopo JIM8 (Toonen *et al.*, 1996). Recientemente ha sido descrito que el epitopo JIM8 representa una señal soluble liberada por células no embriogénicas y que es regulada por la densidad celular en suspensiones de células de zanahoria en cultivo (McCabe *et al.*, 1997). Por último, también se ha postulado que las AGPs están implicadas en procesos de muerte celular programada (Gao y Showalter, 1999).

8.2. Calosa

La calosa (1-3)- β -D glucano no es un componente habitual de la pared celular vegetal, está presente en paredes especializadas y en

estructuras asociadas a la pared en ciertas etapas del crecimiento. Se ha detectado calosa en las paredes celulares de distintos tejidos que incluyen placas celulares, fibras de semillas de almidón, las paredes celulares de los microesporocitos, la pared más interna de los tubos polínicos, el endospermo y en placas cribosas y zonas de abscisión (Yim y Bradford, 1998). También ha sido descrita la formación de depósitos de calosa inducida por situaciones de estrés y por infecciones virales y fúngicas así como tras la producción de heridas (Yim y Bradford, 1998). A pesar de su presencia en muy diferentes tejidos, aún no se conoce su función general (rev. Stone y Clarke, 1992). Así, se ha descrito que puede servir como matriz para que se depositen otros materiales de la pared celular en placas celulares y en los poros de la placa cribosa. También se ha pensado que pueda ser un material para el fortalecimiento de la pared celular en los pelos de las semillas de algodón (Maltby *et al.*, 1979). Además se le ha asignado una función como material de sellado de la membrana plasmática en los campos de punteaduras, plasmodesmos y poros de la placa cribosa del tejido vascular (Eschrich, 1975) y se ha descrito su función como una barrera de permeabilidad especial en las paredes de las células madre del polen y en las cubiertas del endospermo de melón (Heslop-Harrison, 1964; Yim y Bradford, 1998).

8.3. Pectinas

Los polisacáridos pécticos son uno de los componentes más complejos y abundantes (22-35%) de la pared celular primaria de dicotiledóneas, gimnospermas y monocotiledóneas no pertenecientes a la familia de las gramíneas (O'Neill *et al.*, 1990). En las gramíneas, el porcentaje es un poco inferior, las pectinas suponen un 10% de la pared celular aunque siguen siendo uno de los componentes mayoritarios (Fry,

1985; O'Neill *et al.*, 1990). Las pectinas están formadas por un núcleo de α -1,4-D-galacturonanos al que están unidos restos de ramnosa y cadenas laterales neutras (Jarvis *et al.*, 1988). Dependiendo de su composición se clasifican en homogalacturonanos y ramnogalacturonanos (RG-I y RG-II). Dentro de la pared celular las pectinas están implicadas en diferentes funciones como la regulación de la extensibilidad y de la porosidad de la pared (Fujino e Itoh, 1998), la capacidad de intercambio iónico (rev. McCann y Roberts, 1991), la adhesión célula-célula (McCann y Roberts, 1991; Carpita y Gibeaut, 1993; Stephenson y Hawes, 1994), la defensa frente a patógenos (rev. Ridley *et al.*, 2001), la elongación celular (Hayashi *et al.*, 1980; Mc Cann *et al.*, 1993) y la comunicación célula-célula (rev. Darvill *et al.*, 1992 Mohnen y Hahn, 1993; Côté y Hahn, 1994) aunque su papel preciso en estas funciones está muy lejos de estar claro. Se ha descrito que las pectinas están distribuidas a lo largo de las capas de la pared celular con variaciones en su grado de metil esterificación (Knox *et al.*, 1990; Liners *et al.*, 1992 y 1994; Roy *et al.*, 1994; Casero y Knox, 1995). Los anticuerpos JIM5 y JIM7 desarrollados por Knox *et al.* (1990) permiten diferenciar entre las pectinas con bajo grado de esterificación reconocidas por el anticuerpo JIM5 y las pectinas con alto grado de metilesterificación que se unen al anticuerpo JIM7 (Knox *et al.*, 1990). Su localización en diferentes dominios puede reflejar su implicación en funciones diferentes y específicas (Roberts, 1990; McCann y Roberts, 1994).

9. PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO DE SEMILLAS EN CEBADA: HORDEÍNAS

Las semillas de cereales son de una gran importancia económica y nutricional ya que suponen la principal fuente de energía para gran parte de la población humana y para los animales domésticos. Aunque los hidratos de carbono constituyen casi el 70% de la semilla de cebada, las proteínas representan un componente fundamental de ésta, suponiendo un 10% de su contenido total (diagrama 1).

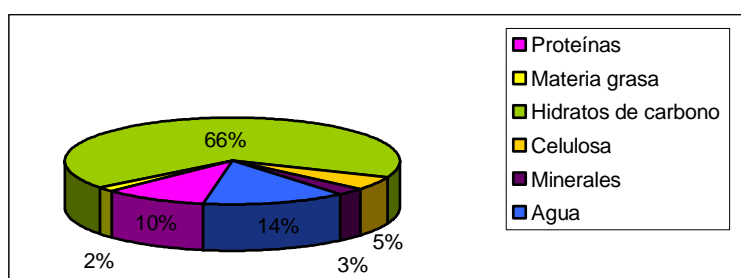


Diagrama 1. Composición del grano de cebada. Fuente: www.infoagro.com

Las proteínas de almacenamiento suponen el 50% de la proteína total en los granos de cereales maduros. Osborne en 1924 clasificó las proteínas de almacenamiento en cuatro grupos en función de su solubilidad: albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en soluciones salinas diluidas), prolaminas (solubles en mezclas de alcohol y agua) y glutelinas (solubles en soluciones de ácidos o álcalis diluidos). Las prolaminas reciben diferentes nombres en los distintos cereales: en trigo se denominan gliadinas, en cebada hordeínas, en centeno secalinas, en avena aveninas... Las hordeínas son las principales proteínas de almacenamiento del endospermo del grano de cebada y suponen del 35 al 50% del contenido total proteico en la semilla (Jaradat, 1991). Los componentes de la fracción hordeínica se clasifican en 4 grupos de

polipeptidos -A, B, C y D- en orden de movilidad decreciente (Køie *et al.*, 1976; Miflin y Shewry, 1977; Field *et al.*, 1982). Los polipéptidos A no son generalmente considerados como una fracción de almacenamiento (Miflin y Shewry, 1977). Los grupos B, C y D de polipéptidos están codificados por tres *loci* complejos, designados como Hor-2, Hor-1 y Hor-3 respectivamente. Las hordeínas D son homólogas a las HMW (high molecular weight) gluteninas de trigo y las hordeínas B y C presentan diferente composición en azufre. Las hordeínas C son pobres en azufre mientras que las hordeínas B, que constituyen el 70-80% del total de las hordeínas, son ricas en azufre (Kreis y Shewry, 1989). Las prolaminas de trigo (gliadinas), cebada (hordeínas), centeno (secalinas) y avena (aveninas) son las responsables de la denominada alergia al gluten cuya forma más conocida es la enfermedad celíaca (Marsh, 1992). Debido a la toxicidad que produce para los enfermos celíacos la presencia de estas proteínas en alimentos, el Dr. Enrique Méndez desarrolló en su laboratorio una colección de anticuerpos: R3, R4 y R5 que reaccionan con las prolaminas de trigo, que son las que se encuentran normalmente en los alimentos humanos, y también con las prolaminas de cebada y centeno (Sorell *et al.*, 1998). El anticuerpo R5, que reconoce el epitopo potencialmente tóxico QQPFP presente en gliadinas de trigo, hordeínas de cebada y secalinas de centeno, es utilizado rutinariamente en un sistema de ELISA sandwich elaborado para la cuantificación de estas prolaminas en todo tipo de alimentos (Valdés *et al.*, 2003).

10. ¿CÓMO LLAMAMOS A LAS ESTRUCTURAS OBTENIDAS TRAS LA INDUCCIÓN ANDROGÉNICA?

Igual que el proceso de producción de embriones haploides a partir del cultivo de anteras o microsporas aisladas recibe los nombres de

androgénesis, embriogénesis del polen o incluso de una manera más genérica embriogénesis gamética, no existe una única forma de designar las estructuras que se obtienen tras la inducción androgénica. Así, en la literatura nos encontramos con que una misma estructura recibe distintos nombres por lo que conviene comentarlos para evitar confusiones.

En esta tesis hemos tratado de dar el mismo nombre a estructuras iguales pero, al menos aquí, vamos a hacer referencia a las distintas nomenclaturas que se utilizan intentando analizar el porqué de esas diferencias.

Nada más aplicar el tratamiento de choque para inducir la androgénesis a las microsporas vacuoladas, es decir a las microsporas en el estadio óptimo para la inducción, se producen divisiones que hacen que estas microsporas se transformen. Así, surgen nuevas estructuras que son bicelulares, tricolares o multicelulares. Pues bien, ¿cómo se llaman estas estructuras? Algunos autores las denominan microsporas bicelulares o multicelulares puesto que proceden de microsporas que tras la inducción androgénica se dividen y son estructuras que se mantienen dentro de la exina o en general de la pared de la microspora. Sin embargo, en el desarrollo gametofítico se llama grano de polen o simplemente polen a la estructura que resulta de la división de la microspora vacuolada y así podemos tener: grano de polen, polen, polen bicelular joven o polen bicelular avanzado y en, algunas especies como la cebada, polen tricolular. Teniendo en cuenta esto, otros autores llaman a estas estructuras polen bicelular o polen multicelular. Pero si se llama polen bicelular a este polen que surge de la inducción androgénica no se distingue del polen bicelular que se observa en el proceso gametogénico. Por ello, también encontramos autores que prefieren llamarlos grano de polen bicelular o multicelular embriogénico o para abreviar polen

embriogénico o grano embriogénico. En este sentido también existen autores que, manteniendo la idea de que estas estructuras proceden de las microsporas en cultivo, las llaman microsporas embriogénicas. Pero para estas dos formas de designarlas también hay problemas puesto que no se sabe con certeza si estas estructuras van a dar lugar a embriones o simplemente, después de unas cuantas divisiones van a morir por lo que se quedan en microsporas multicelulares o polen multicelular, sobre todo, cuando se sospecha no van a evolucionar a embriones.

Sin embargo, no sólo hay diferencias a la hora de designar a las estructuras multicelulares que se mantienen dentro de la exina, sino también a estructuras más desarrolladas que surgen en estadios más avanzados de la androgénesis. Así, cuando la exina se rompe las estructuras que resultan ya no se llaman microsporas o polen embriogénico sino proembriones. Otros autores prefieren designarlas como estructuras semejantes a embriones (“embryo-like structures”), embriones androgénicos o incluso embrioides puesto que son estructuras parecidas a las que se forman en el desarrollo del embrión zigótico.

En esta tesis utilizaremos en general el criterio de designar a las estructuras que se producen al inicio de la inducción y se mantienen dentro de la exina: grano de polen multicelular o grano de polen embriogénico y para abreviar polen multicelular, polen embriogénico o grano embriogénico. Cuando la exina ya está rota utilizaremos proembrión. Por último, a las estructuras más avanzadas las llamaremos embriones androgénicos o estructuras embrionarias.



Justificación y Objetivos

Dado que no se conocen en profundidad los mecanismos de la androgénesis, el objeto final de esta tesis es conseguir una mejor comprensión de este proceso mediante el estudio celular y molecular de la androgénesis en cebada. Para desarrollar este objetivo general se han utilizado diferentes aproximaciones que quedan concretadas en los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar los cambios citológicos y ultraestructurales que se producen en la inducción y primeras etapas de la androgénesis en cebada obtenida tanto mediante cultivo de anteras como de microsporas aisladas para encontrar marcadores citológicos de este proceso.

2. Estudiar comparativamente el polen multicelular y los proembriones androgénicos obtenidos utilizando ambos métodos.

3. Estudiar algunos componentes de la pared celular y determinar su posible papel como marcadores del proceso androgénico. De entre ellos se seleccionaron: la calosa, las pectinas y las proteínas arabinogalactanos.

4. Estudiar la expresión de genes de proteínas de almacenamiento (hordeínas) durante la androgénesis dado que son fundamentales en la embriogénesis zigótica.

5. Examinar la expresión en androgénesis de un gen implicado en la gametogénesis (poligalacturonasa de polen) para determinar si ésta varía en el paso de la ruta gametofítica a la esporofítica.

6. Comprobar la expresión *in situ* de un gen específico de androgénesis de cebada (*ECA1*).

7. Evaluar la expresión en androgénesis de dos genes de embriogénesis zigótica obtenidos a partir del estudio de mutantes de *Arabidopsis thaliana* que tenían afectada las primeras etapas de la embriogénesis zigótica (*EMB615* y *Naglu*).

8. Estudiar la expresión de un gen específico de endospermo (*END1*) durante la inducción y primeras etapas de la androgénesis para comprobar la existencia de posibles dominios en los embriones androgénicos que suplieran la actividad del endospermo en el desarrollo zigótico.



*Materiales
y métodos*

1. MATERIAL VEGETAL

Para la realización del presente trabajo se utilizaron plantas de *Hordeum vulgare* L. variedad Igri. Estas plantas, tras ser vernalizadas durante 6 semanas a 4°C, fueron trasladadas a cámaras en las que la temperatura era 20°C día y 17°C noche con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad y se fertilizaron con N:P:K (20:20:20) una vez cada dos semanas (Cistué *et al.*, 1994).

Para los ensayos de extracción y análisis de gliadinas durante el desarrollo zigótico en trigo se utilizaron plantas de *Triticum aestivum* L. variedad Yécora que crecieron en la finca experimental del CIFA de Granada.

A partir de estas plantas se obtuvieron las anteras para la inducción de androgénesis mediante cultivo de anteras y cultivo de microsporas y para el seguimiento del desarrollo gametofítico. Por otro lado, tras la antesis se diseccionaron sacos embrionarios 2, 4, 6, 8, 10 y 12 DPA (días postantesis) y semillas maduras para los ensayos de desarrollo zigótico. Además, con la ayuda de una lupa, se diseccionaron embriones zigóticos de sacos embrionarios recolectados 14 días después de la antesis. Tanto las muestras del desarrollo gametofítico y zigótico como los embriones aislados fueron procesados para su estudio celular mediante microscopía óptica y electrónica. Para los ensayos de expresión génica y de proteínas, cuando las extracciones de ácidos nucleicos y proteínas no se podían realizar en el momento, las muestras fueron congeladas en N₂ líquido y guardadas a -80°C hasta el momento de la extracción.

2. DETERMINACIÓN DE LAS FASES DE DESARROLLO DEL POLEN

Para la determinación del estadio de desarrollo en el que se encontraban los granos de polen dentro de las anteras se utilizó la tinción con DAPI (Vergne *et al.*, 1987).

Cuando se tomaron las anteras para la tinción con DAPI se analizaron además una serie de parámetros morfométricos como la distancia del último nudo a la hoja bandera y el color que presentaban las espigas y las anteras, para poder determinar posteriormente *de visu* el estadio de desarrollo de los granos de polen que contenían las anteras. Establecer una serie de relaciones entre el estadio de desarrollo del grano de polen y estos parámetros facilitó posteriormente la toma de anteras para llevar a cabo la inducción androgénica y el seguimiento del desarrollo gametofítico.

2.1. Tinción con DAPI sobre aplastados

El DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) es un fluoróforo que se une al ADN y emite fluorescencia de color azul ($\lambda = 488\text{nm}$) que permanece sin desvanecerse durante bastante tiempo.

Se preparó en primer lugar una solución stock de concentración $10\mu\text{g/ml}$ en agua destilada que se puede guardar durante meses a 4°C . Antes de su utilización, la solución de tinción se diluyó diez veces y se añadió Tritón X-100 a una concentración final del 1% para permeabilizar la membrana y ayudar al fluorocromo a penetrar en el grano de polen.

En primer lugar se diseccionaron las anteras con la ayuda de unas pinzas y se fijaron inmediatamente en Carnoy (etanol 70%:ácido acético, 3:1) durante al menos veinte minutos. Tras la fijación se eliminó el fijador y se añadió a las anteras la solución de tinción en la que permanecieron durante como mínimo diez minutos, pudiéndose conservar en esta

solución a 4°C durante semanas. Para la observación se aplastó una antera sobre un portaobjetos para hacer salir a los granos de polen, se añadió unas gotas de la solución de DAPI y se puso un cubre.

La observación se realizó en un microscopio óptico Zeiss Axioplan equipado con un equipo de epifluorescencia utilizando irradiación ultravioleta de $\lambda=366\text{nm}$. Se tomaron fotografías con una cámara acoplada al microscopio de fluorescencia utilizando películas de 100 asas ó directamente con una cámara digital Canon también acoplada al microscopio.

La tinción con DAPI también se utilizó para seguir la evolución de los núcleos en la inducción y primeras etapas de la androgénesis obtenida mediante cultivo de anteras y cultivo de microsporas. Para ello, además de la tinción sobre aplastados se utilizó la tinción con DAPI de secciones semifinas. Para esta tinción se añadió sobre los cortes recogidos en un portaobjetos la solución de DAPI y se cubrió con un cubreobjetos y se procedió igual que en el caso de la tinción sobre aplastados.

3. INDUCCIÓN DE ANDROGÉNESIS

Para la inducción de androgénesis en la cebada se utilizaron tanto el cultivo de anteras como el de microsporas aisladas. En ambos casos se tomaron espigas que contenían microsporas en el estadio de microspora vacuolada y posteriormente se esterilizaron con etanol al 70%. La inducción androgénica se realizó empleando diferentes pretratamientos de estrés, después de los cuales, se realizaron los cultivos utilizando los medios que se detallan en la tabla 2. En todos los casos tanto el pretratamiento de inducción como la posterior puesta en cultivo se realizó en condiciones estériles bajo una campana de flujo laminar.

Macronutrientes	FHG(mg/ml)	MMS3(mg/ml)
KNO ₃	1900	1400
NH ₄ NO ₃	165	300
KH ₂ PO ₄	170	170
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440	440
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370	370
Micronutrientes		
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22.3	22.3
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	11.7	8.6
H ₃ BO ₃	6.2	6.2
KI	0.83	0.83
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	0.25	0.25
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.025	0.025
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.025	0.025
FeNa ₂ EDTA	40	40
Vitaminas		
Tiamina-HCl	0.4	0.4
Piridoxina-HCl		0.5
Ácido nicotínico		0.5
Mioinositol	100	100
Glutamina	730	500
Maltosa	62000	90000
Hormonas		
Quinetina		0.5
NAA		2
BAP	1	
pH	5.8	5.7

Tabla 2. Componentes de los medios de cultivo FHG y MMS3 utilizados para cultivo de anteras y cultivo de microsporas respectivamente. BAP: bencilaminopurina, NAA: ácido naftalenacético.

3.1. Inducción androgénica mediante cultivo de anteras

Se utilizaron dos pretratamientos de estrés para inducir la androgénesis:

1. Estrés por ayuno y alta presión osmótica utilizando manitol, un azúcar no metabolizable
2. Estrés por choque frío.

3.1.1. Pretratamiento de estrés: inducción con manitol

Se empleó el método desarrollado en el grupo del Dra. M^a Pilar Vallés (Cistué *et al.*, 1994) que básicamente consistió en la esterilización de las espigas que contenían microsporas vacuoladas con etanol al 70%, la posterior disección de las anteras del centro de la espiga con la ayuda de unas pinzas y su distribución convenientemente separadas sobre manitol 0.7M solidificado con 8g/l de agarosa en placas Petri de 6 cm de diámetro. En estas placas permanecieron a 25°C durante 4 días en ausencia de luz. Tras el pretratamiento las anteras se pasaron directamente al medio de cultivo líquido. Para el cultivo se escogieron 15 anteras transparentes de las anteras previamente sometidas al pretratamiento y se cultivaron en placas Petri de 3 cm de diámetro que contenían 1.5ml de medio líquido FHG (Hunter, 1988; Hu 1996) suplementado con 200g/l de Ficoll 400 (FHG-F200) para evitar que las anteras se hundiesen en el medio líquido y prevenir las condiciones anaeróbicas (Kao, 1981). Transcurridos de 9 a 12 días de cultivo se añadió a cada placa 400g/l de Ficoll (FHG-F400) (Cistué *et al.*, 1999). Los componentes del medio FHG aparecen en la tabla 2.

3.1.2. Pretratamiento de estrés: choque frío

Se siguió básicamente el método descrito por Huang y Sunderland (1982) con ligeras modificaciones. Se recolectaron las espigas cuando las

microsporas se encontraban en el estadio de microspora vacuolada y se esterilizaron en superficie con etanol al 70%. A continuación se pasaron a placas Petri de 10 cm de diámetro. Para mantener la humedad, se introdujo además en la placa otra placa Petri pequeña de 3 cm de diámetro con 2 ml de agua estéril. Las placas fueron selladas con parafilm y las espigas fueron incubadas en oscuridad a 4°C durante dos semanas.

Para el cultivo, tras el pretratamiento de frío durante dos semanas, las espigas fueron esterilizadas en superficie con lejía al 20% durante 20 minutos. A continuación se extrajeron las anteras y se depositaron en placas Petri que contenían un medio sólido derivado del medio MS (Murashige y Skoog, 1962), el medio MMS3 (Hu y Kasha, 1997) suplementado con 60g/l de maltosa y solidificado con 6.5g/l de agarosa. El cultivo se realizó a 26°C en ausencia de luz.

Para los estudios de microscopía óptica y electrónica se procesaron anteras control que no habían sido sometidas a ningún tipo de tratamiento (A0), anteras justo después de los pretratamientos de inducción tanto de ayuno (A4) como de frío (F15) y anteras cultivadas durante diferente número de días en los medios ricos tras los pretratamientos de estrés (C3,C6,C9 y C13).

3.2. Inducción de androgénesis mediante cultivo de microsporas aisladas

Se siguió básicamente aunque con ligeras modificaciones el protocolo de Olsen (1991) desarrollado en el grupo de la Dra. Beata Barnabás.

3.2.1. Pretratamiento de inducción

Se diseccionaron las anteras en condiciones de esterilidad y se dispusieron convenientemente separadas en placas Petri de 6 cm que contenían manitol 0.3M. Las anteras permanecieron en este medio líquido durante 3 días a 26°C en oscuridad.

3.2.2. Aislamiento de las microsporas

Tras el pretratamiento, se aislaron las microsporas fueron aisladas a partir de las anteras utilizando un homogenizador a velocidad mínima para que las microsporas no se rompieran. Este procedimiento se repitió 3 veces durante 5 segundos y se recogieron las microsporas en la solución de manitol. Posteriormente se filtró este homogenizado utilizando un filtro de 100µm y se centrifugó a 50g durante 5 minutos en una centrífuga de mesa. El precipitado se resuspendió en 2ml de manitol y se realizó el test del FDA (diacetato de fluoresceína) para comprobar la viabilidad de las microsporas. Las microsporas se purificaron mediante centrifugación en gradiente de maltosa según el método descrito por Mordhorst y Lörz (1993). Para ello se añadió cuidadosamente el manitol con las microsporas sobre 6 ml de maltosa al 21% esterilizada mediante filtración y se centrifugó durante 10 minutos a 80g en una centrífuga oscilante. La capa superior que contenía las microsporas viables se recogió y se diluyó en 8-10ml de medio MMS3 suplementado con maltosa a una concentración de 60g/l.

3.2.3. Cultivo en el medio de inducción

Antes de la puesta en cultivo se centrifugó a 50g durante 5 minutos, se resuspendió el precipitado en 970µl de medio MMS3-maltosa y se diluyó este volumen con medio MMS3-maltosa hasta conseguir una concentración de 200000 microsporas vivas/ml. Los cultivos se

realizaron en un volumen de 500 μ l en placas multiagujero a 26°C en presencia de luz.

3.2.4. Test de viabilidad del FDA

La solución stock se preparó diluyendo el FDA (diacetato de fluoresceína) en acetona a una concentración final de 2 μ g/ ml. Esta solución se puede conservar durante meses a -20°C. Antes de su utilización se diluyeron 5 μ l de la solución stock en 500 μ l de acetona que contenía sacarosa al 9% y se añadió una gota de esta solución a nuestro material. Para su observación se esperó de 2 a 5 minutos en el caso de las microsporas y de 2 a 60 minutos en el caso de las anteras y las preparaciones se observaron utilizando el microscopio de fluorescencia anteriormente descrito ($\lambda_{\text{excitación}}=480\text{nm}$; $\lambda_{\text{emisión}}=520\text{nm}$) de manera que las microsporas vivas presentaban fluorescencia verde mientras que las muertas permanecían con su autofluorescencia amarilla.

Para su posterior estudio mediante microscopía óptica y electrónica se procesaron anteras control que no habían sido sometidas a ningún tipo de tratamiento (A0), microsporas aisladas mediante centrifugación en gradiente de maltosa tras el pretratamiento de estrés con manitol (A3) y microsporas cultivadas durante diferente número de días en medio rico tras el pretratamiento de estrés (C3,C6,C9,C13 y C18).

Estas mismas muestras fueron ultracongeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta la extracción posterior de ADN, ARN y proteínas para los estudios de expresión génica y de proteínas.

4. PROCESAMIENTO DEL MATERIAL PARA MICROSCOPIA ÓPTICA Y ELECTRÓNICA

Se utilizaron dos metodologías distintas:

1. Para el seguimiento de la evolución morfológica y ultraestructural de nuestros embriones se utilizó una fijación severa incluyendo una postfijación en osmio y una inclusión en una resina epoxi, el Epón, con lo que se consiguió una mejor preservación estructural.

2. Para las inmunocitoquímicas y las hibridaciones *in situ* es necesario que tanto las proteínas como los ácidos nucleicos estén accesibles a las sondas y anticuerpos, además es necesario que estos últimos puedan penetrar fácilmente; por ello, en estos casos se utilizó un fijador más suave, no se realizó post-fijación y se incluyó en una resina acrílica, el Unicryl (British Bio Cell International, Cardiff, U.K.).

4.1. Procesamiento para visualización de estructura y ultraestructura

4.1.1. Fijación

El material fue fijado a 4°C inmediatamente después de ser recogido. Se utilizó como fijador el Karnovsky (Karnovsky, 1965), una mezcla de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2% en tampón cacodilato 0.05M que se preparó en el momento de su uso como a continuación se especifica:

Se disolvió calentando al baño María 1 g de paraformaldehído en 6 ml de H₂O destilada a la que se añadieron 2 o 3 gotas de NaOH 1M. A continuación se dejó enfriar la disolución y se añadieron 2 ml de glutaraldehído al 25% y 12.5 ml de tampón cacodilato 0.1M pH 7.2. Se ajustó el pH a 7.2 y se llevó a un volumen de 25 ml con agua bidestilada.

La preparación del fijador y la fijación de las muestras se realizó con guantes y bajo campana debido a que se desprenden gases tóxicos. Tras poner las muestras en el fijador se aplicó vacío a las muestras varias veces para hacer que éstas se hundieran y penetrara mejor el fijador.

A continuación se eliminó el fijador mediante 3 lavados de 30 minutos con tampón cacodilato 0.05M.

Posteriormente se realizó una postfijación con tetróxido de osmio al 2% en tampón cacodilato 0.05M durante 2 horas a 4°C. Tanto la preparación como la posterior manipulación del tetróxido de osmio se realizó con guantes y bajo campana debido a su elevada toxicidad.

Posteriormente se realizaron 3 lavados de 30 minutos con cacodilato 0.05M a 4°C para eliminar los restos de tetróxido de osmio.

4.1.2. Deshidratación

A continuación se deshidrató utilizando un gradiente creciente de etanol:

- Etanol 30%: 1 hora (4°C).
- Etanol 50%: 1 hora (4°C).
- Etanol 70%: 1 noche (4°C).
- Etanol 90%: 1 hora (4°C).
- Etanol 100%: 1 hora (4°C).
- Etanol 100%: 3 veces 1 hora (4°C).

4.1.3. Inclusión en Epón

El Epón es una resina epoxi soluble en óxido de propileno. Las muestras pasaron por las siguientes soluciones:

- Óxido de propileno 5 minutos.
- Óxido de propileno:Epón, en proporción 3:1, 1 hora (4°C).

- Óxido de propileno:Epón, en proporción 1:1, 1 noche(4°C).
- Óxido de propileno:Epón, en proporción 1:3, 1 hora (4°C)
- Epón puro, 1 noche (4°C).
- Epón puro, 3 horas (4°C).

4.1.4. Polimerización

Para la polimerización se colocaron las muestras con la orientación adecuada en el fondo de unas cápsulas de gelatina que contenían una gota de resina. Tras lo cual se rellenaron las cápsulas de resina y se dejaron polimerizar durante dos días en una estufa a 60°C.

Todos los pasos de la inclusión y polimerización se realizaron con guantes y bajo campana puesto que se trata de compuestos tóxicos por inhalación y contacto.

4.2. Procesamiento para inmunocitoquímicas e hibridaciones in situ

4.2.1. Fijación

Se fijó con una mezcla de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0.2% en tampón cacodilato 0.05M.

Se eliminó el fijador mediante 3 lavados de 30 minutos con cacodilato 0.05 M.

4.2.2. Deshidratación

Se deshidrató utilizando un gradiente creciente de etanol:

- Etanol 30%: 1 hora (4°C).
- Etanol 50%: 1 hora (4°C).
- Etanol 70%: 1 noche (4°C).
- Etanol 90%: 1 hora (4°C).
- Etanol 100%: 1 hora (4°C).

- Etanol 100%: 3 x 1 hora (4°C).

4.2.3. Inclusión en Unicryl

- Etanol: Unicryl , en proporción 3:1 durante 3 horas (4°C).
- Etanol: Unicryl , en proporción 1:1 toda la noche (4°C).
- Etanol: Unicryl , en proporción 1:3 durante 3 horas (4°C).
- Unicryl puro toda la noche (4°C).
- Unicryl puro 3 horas (4°C).
- Unicryl puro toda la noche (4°C).

4.2.4. Polimerización

Para la polimerización se procedió igual que en el caso del Epón, se colocaron las muestras con la orientación adecuada en el fondo de unas cápsulas de gelatina donde se había depositado una gota de resina y posteriormente se rellenó hasta el borde de la cápsula con más resina. Tras esto las cápsulas se cerraron porque la presencia de oxígeno interfiere en la polimerización del Unicryl. La polimerización se realizó con luz ultravioleta a -20°C durante 3 días.

Al igual que con la fijación e inclusión en Epón todos los pasos excepto la deshidratación se realizaron bajo campana y con guantes por la toxicidad de los componentes. El Unicryl además presenta un peligro adicional su alta volatilidad que lo hace más alergénico.

4.3. Obtención de cortes semifinos

Para la obtención de cortes semi y ultrafinos se utilizó un ultramicrotomo "Ultracut E" Reichert Jung. En primer lugar, se tallaron las muestras ya incluidas en resina y polimerizadas. Para ello se colocaron las muestras en el soporte porta-cápsulas del microtomo y se talló con la ayuda de una cuchilla de afeitar una pirámide con una base

con forma de trapecio que contenía el material biológico. Los cortes semifinos, de aproximadamente 1 μm de espesor, se realizaron con una cuchilla de vidrio sobre la cual se montó una balsa llena de agua en la que, una vez realizados los cortes, flotaban las secciones. Estos cortes fueron recogidos con la ayuda de un asa de siembra y depositados sobre una gota de agua en un portaobjetos. El portaobjetos se colocó una placa calefactora para que el agua se evaporara lentamente quedando el corte estirado y adherido al portaobjetos.

4.4. Tinción de cortes semifinos para su observación al microscopio óptico

Para conseguir una mejor visualización de las estructuras celulares se utilizó una solución de azul de metileno/ azul de toluidina / bórax que se preparó disolviendo 0.5g de bórax en 30ml de agua destilada para lo que se calentó al baño María. A continuación se le añadieron 0.25g de azul de metileno y 0.25g de azul de toluidina, se enrasó a 50 ml y se filtró la solución.

Para teñir los cortes semifinos ya adheridos al portaobjetos se cubrieron los cortes con una gota del colorante y se dejó actuar durante un tiempo que varió dependiendo del tipo de tejido. Transcurrido este tiempo se eliminó el resto de colorante lavando con agua bidestilada y se dejó secar de nuevo el portaobjetos sobre la placa calefactora.

Para poner las preparaciones en definitivo se utilizó como medio de montaje el Merckoglass. Se dispuso una gota sobre la preparación y se colocó sobre ella un cubreobjetos.

Las secciones se observaron utilizando un microscopio Zeiss Axioplan y se obtuvieron fotografías mediante una cámara digital Canon Power Shot S40 acoplada a este microscopio.

4.5. Obtención de cortes ultrafinos

Se visualizaron los cortes semifinos al microscopio óptico y se identificó la región cuya observación al microscopio electrónico era de interés. Con la ayuda de la lupa del ultramicrotomo se localizó esa región en el bloque y se talló una nueva pirámide más pequeña, de aproximadamente 1 mm de lado, que la contenía. Los cortes ultrafinos, cuyo espesor variaba de 60 a 80 nm, se realizaron con cuchilla de vidrio o diamante y al igual que los cortes semifinos, quedaron flotando sobre la balsa. El color de los cortes variaba según su espesor, siendo los de 80 nm de color gris plateado. Para ayudar a su recolección se agruparon utilizando una pestaña adherida al borde de un palillo. Una vez agrupados se recogieron por contacto con una rejilla de níquel. Las rejillas habían sido recubiertas con anterioridad con una película de formvar al 0.3% en cloroformo que proporcionaba una mayor estabilidad a los cortes facilitando su posterior manipulación.

4.5.1 Recubrimiento de las rejillas con formvar

Se preparó una disolución de formvar al 0.3% que se vertió sobre un embudo cilíndrico que había sido limpiado previamente dos veces con cloroformo. Este embudo tenía un diámetro ligeramente superior al de la anchura de un portaobjetos y disponía de una llave que permitía la salida del líquido a velocidad constante. Se introdujo en el embudo un portaobjetos limpio y se abrió la llave para que saliera el formvar. A continuación se sacó el portaobjetos y se dejó secar al aire. Cuando éste estaba seco se rasparon los bordes del portaobjetos con una cuchilla y se introdujo el portaobjetos en un recipiente con agua bidestilada de manera que la película de formvar se desprendía y quedaba flotando. A continuación, con la ayuda de unas pinzas finas, se colocaron las rejillas

sobre el formvar dejando la cara mate en contacto con la película. Las rejillas se recogieron con otro portaobjetos recubierto de una etiqueta adhesiva, este se hundía sobre un extremo de la película de formvar de manera que las rejillas quedaban entre el formvar y la etiqueta adherida al portaobjetos. Antes de la utilización de las rejillas se comprobó en el microscopio electrónico el grado de espesor de las películas y su homogeneidad.

4.6. Tinción de cortes ultrafinos para la observación de su ultraestructura mediante microscopía electrónica

Las rejillas se contrastaron en primer lugar con acetato de uranilo y posteriormente con citrato de plomo.

4.6.1. Acetato de uranilo

Se preparó una disolución de acetato de uranilo al 5% que se protegió de la luz con papel de aluminio y se guardó a 4°C. Antes de su utilización, se centrifugó esta solución a 12000g durante 2 minutos. Se tomó una gota de la parte superior del tubo y se depositó sobre un papel parafilm. A continuación, se hizo flotar la rejilla, protegiéndola de la luz, sobre esta solución durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo se lavó la rejilla con abundante agua bidestilada, se secó y se depositó sobre papel de filtro Whatman con los cortes dispuestos hacia arriba.

4.6.2. Citrato de plomo

La tinción con citrato de plomo incrementa el contraste obtenido con el acetato de uranilo.

El citrato de plomo se preparó disolviendo 0.665g de nitrato plumboso y 0.835g de citrato sódico dihidratado en 30 ml de agua bidestilada. Se dejó reposar durante al menos 30 minutos y se añadió 4

ml de NaOH 1N. A continuación se enrasó a 25 ml con agua bidestilada y se diluyó con NaOH 0.01N en proporción 1:8 (citrate de plomo:NaOH 0.01N).

Al igual que con el acetato de uranilo, se centrifugó el citrate de plomo durante dos minutos antes de ser utilizado. Tras la centrifugación se depositaron sobre el papel parafilm gotas de citrate de plomo y sobre estas se dispusieron las rejillas con los cortes en contacto con el reactivo durante 1 minuto. La tinción con citrate de plomo es delicada ya que éste puede precipitar al combinarse con el CO₂ del aire formando carbonato de plomo. Por esto, la tinción se realizó dentro de una placa Petri recubierta de parafilm en las que se dispusieron alrededor unas lentejas de sosa que producían una atmósfera seca que impedía que el citrate de plomo precipitase. A continuación las rejillas se lavaron con agua bidestilada a chorro y se secaron con papel Whatman.

5. TÉCNICAS CITOQUÍMICAS

5.1. Técnicas para microscopía óptica

Para la realización de las citoquímicas al microscopio óptico los cortes semifinos del material de interés se recogieron sobre portaobjetos que habían sido tratados previamente con TESPA.

5.1.1. Tratamiento de los portas con TESPA

El TESPA (3-aminopropiltriétoxi-sileno) es un reactivo que hace que los cortes se adhieran a los portaobjetos evitando así que se pierdan en los sucesivos tratamientos a los que se les somete en los protocolos de citoquímica, inmunocitoquímica e hibridación *in situ*.

En primer lugar los portaobjetos fueron lavados con mezcla sulfocrómica durante toda la noche, después se lavaron repetidamente con agua bidestilada y se secaron a 60°C durante varias horas. Una vez secos se introdujeron durante 5 minutos en jarras Coplin que contenían TESPA al 3% en acetona. Posteriormente se lavaron dos veces con acetona, dos veces con agua bidestilada y se dejaron secar a temperatura ambiente.

5.1.2. Detección de proteínas mediante el método de la cloramina T-reactivo de Schiff

Para la realización de la citoquímica todas las incubaciones se realizaron sumergiendo los portas que contenían los cortes de interés en jarras Coplin con las diferentes soluciones. En primer lugar se incubaron los portas en Cloramina T al 2% en tampón fosfato 0.1M pH 7.2 durante 4 horas a 40°C . Tras lavar con agua destilada se lavó con tiosulfato sódico al 5% durante 10 minutos. Después se trataron los portas durante 2 horas a 40°C y oscuridad con el reactivo de Schiff. Transcurrido este tiempo se lavaron una vez con agua destilada, tres veces con agua sulfurosa (metabisulfito sódico al 0.5%) durante 5 minutos cada vez y tras lavar de nuevo con agua destilada se dejaron secar durante 15 minutos.

Preparación del reactivo de Schiff. Se disolvieron 0.5g de fuchsina básica en 100 ml de ClH 0.15 N y se añadieron 0.5 g de metabisulfito sódico, agitando cada dos horas hasta su disolución. Posteriormente se añadieron 300 mg de carbón activo para decolorar, se agitó 5 minutos y se filtró hasta conseguir un filtrado claro y sin color. Este reactivo puede conservarse en nevera, protegiéndolo de la luz durante 2 meses.

5.2. Técnicas para microscopía electrónica

5.2.1 Detección de proteínas mediante digestión con proteinasa K

Para determinar la posible naturaleza proteica de los depósitos encontrados en la pared mediante microscopía electrónica se incubaron las secciones ultrafinas recogidas en rejillas de níquel con proteinasa K en diferentes concentraciones (de 20 a 200µg/ml) durante 30 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo se lavaron las rejillas con agua, se secaron con papel Whatman y se contrastaron con acetato de uranilo al 5% como se explicó con anterioridad.

5.2.2. Determinación de cationes mediante tratamiento con EDTA

Para determinar el carácter catiónico mediante microscopía electrónica se hicieron flotar las rejillas que contenían cortes ultrafinos sobre gotas de una solución de EDTA 0.2M durante 40 minutos a temperatura ambiente. A continuación las rejillas fueron lavadas con agua, secadas con papel Whatman y teñidas con acetato de uranilo como se ha descrito con anterioridad.

6. MICROSCOPIA ANALÍTICA DE RAYOS X

Para el análisis de rayos X de los depósitos de la intina se utilizó un microscopio electrónico de transmisión Philips CM-20 de alta resolución en modo STEM que tenía acoplado un espectrómetro de energía dispersiva de rayos X y un analizador EDAX. Las secciones ultrafinas de 60-80 nm fueron recogidas en rejillas de níquel sobre las que se depositó posteriormente una película de carbón. El análisis se realizó a 200 kV y el tamaño de la sonda del espécimen era de 70Å de

diámetro. Se hizo una media de 2000 cuentas por segundo durante 100 segundos y el ángulo de toma utilizado fue de 40°.

7. TÉCNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS

7. 1. Inmunocitoquímicas para microscopio óptico

Se localizaron hordeínas/gliadinas, calosa y pectinas mediante inmunofluorescencia. Para ello se utilizaron los anticuerpos: anti-calosa, un monoclonal comercial obtenido en ratón; JIM5 y JIM7 que fueron cedidos por el Dr. Roberts del John Innes Centre, U.K. y fueron obtenidos en rata y, por último, anti-hordeínas (R3, R4 y R5), anticuerpos monoclonales obtenidos en ratón y cedidos por el Dr. Enrique Méndez de la Unidad de Análisis Estructural de proteínas del CNB (Madrid). El anticuerpo secundario utilizado estaba conjugado con fluoresceína.

Se realizaron los siguientes tratamientos sobre los portaobjetos que contenían los distintos cortes semifinos. En primer lugar se lavaron con PBS durante 5 minutos en jarra Coplin y se bloquearon con BSA al 5% y Tween 20 al 0.1% en PBS durante 1h a temperatura ambiente. Tras el bloqueo se incubaron con los anticuerpos primarios: anticalosa, JIM5, JIM7 y anti-gliadinas (R3, R4 y R5) diluidos en proporción 1:50 en BSA al 0.5% y Tween 20 al 0.01% en PBS. Se depositaron 20 µl de la dilución de anticuerpo sobre los cortes y se cubrieron con papel parafilm. La incubación se realizó en una cámara húmeda a 4°C durante toda la noche. Después, tras lavar 3 veces durante 15 minutos con PBS en jarra Coplin, se incubaron con los anticuerpos secundarios: anti-ratón IgG marcado con FITC diluido en proporción 1:100 en BSA al 0.5% y Tween 20 al 0.1% en PBS para la calosa; en proporción 1:40 en BSA al 1% en

PBS para las hordeínas/gliadinas y anti-rata IgG FITC para JIM5 y JIM7 diluido en proporción 1:100 en BSA al 0.5% y Tween 20 al 0.1% en PBS. La incubación se realizó en cámara húmeda y en completa oscuridad durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron las preparaciones tres veces con PBS a temperatura ambiente y en oscuridad, durante 20 minutos cada vez; se añadió un antidesvanecedor para evitar la extinción de la fluorescencia, se colocó un cubreobjetos y se observó en el microscopio de fluorescencia anteriormente descrito. Estas preparaciones se pueden conservar a -20°C en completa oscuridad durante al menos un mes.

7.1.1. Preparación del PBS

Se preparó una disolución 10x que se puede conservar durante bastante tiempo a temperatura ambiente. Para ello se disolvieron en agua bidestilada 5.68g de Na₂HPO₄ (80mM), 0.9g de KH₂PO₄ (15mM), 38.0g de NaCl (1.3mM) y 0.84g de KCl (30mM). Se ajustó el pH 7.2 y se enrasó a 1 litro. Posteriormente para su utilización se diluyó en proporción 1:10 en H₂O bidestilada.

7.1.2. Preparación del antidesvanecedor de fluorescencia

Se prepararon 5 ml de PBS de pH de 9 a 12 (cuanto más cercano a 12 mejor) y se le añadieron 25mg de fenilendiamina controlándose de nuevo el pH. Se tomaron después 2ml de esta solución y se mezclaron con 8ml de glicerina. Se hicieron alícuotas y se guardaron a -20°C.

7. 2. Inmunocitoquímicas para microscopio electrónico

Se inmunolocalizaron calosa, pectinas, proteínas arabinogalactanos y hordeínas mediante microscopía electrónica de transmisión. Para inmunolocalizar las proteínas arabinogalactanos se

utilizaron los anticuerpos JIM4 y JIM8 que, al igual que los anticuerpos JIM5 y JIM7, fueron proporcionados por el laboratorio del Dr. Roberts.

Las rejillas que contenían los cortes ultrafinos de nuestro material fueron sometidas a una serie de tratamientos que se detallan a continuación. Las distintas soluciones con las que se trataron las rejillas fueron depositadas en gotas sobre papel parafilm y las rejillas se hicieron flotar sobre ellas dejando la cara de los cortes en contacto directo con las soluciones. En primer lugar se bloqueó con BSA al 5 % en PBS pH 7.4 durante 1 hora y posteriormente se lavó con PBS durante 10 minutos. Después se incubó con el primer anticuerpo: para la calosa el anticuerpo fue diluido en proporción 1:50 en BSA al 0.1% en PBS pH 7.4 y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente; para JIM5, JIM7, JIM4 y JIM8 la dilución fue 1:5 en BSA al 0.1% en PBS pH 7.4 y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y para anti-hordeína/gliadina (R5), se utilizó el anticuerpo puro y se incubó toda la noche a 4°C. En todas las ocasiones las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. Posteriormente, tras lavar 5 veces durante 10 minutos cada vez con PBS, se incubó con el segundo anticuerpo: para la calosa se utilizó un anticuerpo IgG anti-ratón unido a partículas de oro de 10 nm diluido en proporción 1:50 en BSA al 0.1% en PBS; para JIM5, JIM7, JIM4 y JIM8, se utilizó un IgG anti-rata unido a partículas de oro de 15 nm diluido en proporción 1:50 en BSA al 0.1% en PBS y para las hordeínas se utilizó un IgG anti-ratón unido a partículas de oro de 20 nm con una dilución de 1:50 en BSA al 0.5% en PBS. Estas incubaciones se realizaron en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 3 horas. Transcurrido este tiempo se lavó 5 veces con PBS durante 10 minutos cada vez y 10 veces con agua bidestilada durante 2 minutos cada vez y posteriormente se procedió a la tinción con acetato de uranilo al 3% en agua tal y como se ha descrito con anterioridad. Tras la tinción se lavó abundantemente con agua bidestilada a chorro y se secó con papel con papel Whatman.

8. MANIPULACIÓN DE ADN

8.1. Extracción de ADN

El método empleado fue el del TRI REAGENT® LS (Molecular Research Center, Inc.) según el protocolo indicado por la casa comercial. Se utilizó este método porque permitía en un sólo protocolo la extracción de ADN, ARN y proteínas de pequeñas cantidades de muestras, que era lo indicado para el material del desarrollo androgénico, muy escaso y difícil de obtener.

Los primeros pasos del protocolo: homogenización y separación de fases fueron comunes para la extracción de ADN y ARN.

8.1.1. Homogenización

Antes de proceder a la extracción fue necesario aislar las microsporas en distintos momentos del desarrollo gametofítico (A0, microsporas vacuoladas; P9, polen bicelular avanzado y P12, polen tricelular) y las microsporas después de la inducción androgénica con manitol (A3) para evitar así contaminaciones de la parte esporofítica, es decir del tejido de la antera. Esto se realizó mediante un gradiente de Percoll como se ha explicado con anterioridad en el aislamiento de microsporas para el cultivo. Posteriormente, para concentrar las microsporas de estas muestras y las procedentes del cultivo de microsporas durante 3 y 13 días (C3 y C13), se centrifugó a 60g durante 5 minutos y se congeló el precipitado en nitrógeno líquido. El precipitado congelado se transfirió a un mortero enfriado con nitrógeno líquido donde se molieron las muestras añadiendo nitrógeno de vez en cuando para que se conservara la temperatura (-80°C) y se mantuvieran las RNAsas inactivas.

Las semillas 10 días después de la antesis (S10) se recogieron e inmediatamente fueron congeladas en nitrógeno líquido y guardadas a -80°C hasta el momento de la extracción en el cual se molieron 90 mg en el mortero tal y como se ha descrito anteriormente. Lo mismo se hizo con los embriones diseccionados 14 DPA.

En todos los casos, se añadieron a continuación 750 μl de TRI REAGENT® LS que se mezcló con el producto de la molienda. Se recogió todo en un eppendof, se añadió H_2O -DEPC hasta conseguir un volumen de 1 ml y se homogenizó con la ayuda de una pipeta.

8.1.2. Separación de fases

Tras la homogenización se añadieron 100 μl de BCP (1-bromo-3-cloropropano) y se incubó durante 5 minutos a 60°C . Se agitó con un vortex durante 15 segundos y se dejó durante 2-3 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 13000 g a 4°C durante 15 minutos y se transfirió posteriormente la fase superior acuosa (FA) que contenía el ARN a un nuevo tubo para su aislamiento tal como se describe posteriormente (ver apartado 9.2). La fase orgánica (FO) de color rosa contenía el ADN y las proteínas.

8.1.3. Precipitación del ADN

Para aislar el ADN de la fase orgánica (FO) se añadieron 300 μl de etanol 100%, se mezclaron por inversión y se incubó durante 2 o 3 minutos a temperatura ambiente. Después se precipitó el ADN centrifugando a 2000g a 4°C durante 5 minutos. El sobrenadante se guardó a 4°C para el aislamiento de proteínas (ver apartado 12.1) y el precipitado se lavó dos veces durante 30 minutos cada vez con citrato sódico 0.1M en etanol al 10%. Después se centrifugó a 2000g durante 5 minutos a 4°C , se añadieron 1.5 ml de etanol al 70% y se guardó a -20°C hasta su utilización. Para precipitar el ADN se centrifugó a 13000g

durante 20 minutos, se lavó con etanol al 70%, se dejó secar y se resuspendió en 50µl de H₂O ultrapura.

En este momento se procedió a cuantificar espectrofotométricamente la cantidad de ADN de la muestra, para lo cual se midieron las absorbancias a 260 y 280 nm de diluciones 1:100 de las muestras. La relación A_{260}/A_{280} era próxima a 2 en todas las extracciones. Para la cuantificación del ADN se tuvo en cuenta que 1 unidad de absorbancia a 260nm equivale a 50µg/ml (Sambrook *et al.* 1989).

8.2. Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR

Las reacciones se realizaron en un volumen total de 25 µl de la mezcla siguiente:

0.5 µl de mezcla de desoxirribonucleótidos: dATP, dCTP, dGTP y dTTP (dNTPs) 10µM.

2.5 µl de tampón de reacción B (10x) (suministrado con la polimerasa, Taq DNA Polymerase, Promega).

2.5 µl de MgCl₂ 25mM (suministrado con la polimerasa, Taq DNA Polymerase, Promega).

0.2 µl de Taq polimerasa (1U) (DNA polimerasa de *Thermus aquaticus*, Promega).

ADN molde, distintas cantidades

1 µl de cada uno de los cebadores utilizados (10µM) (tabla 3)

H₂O ultrapura hasta completar el volumen.

Esta mezcla, una vez desnaturalizado el ADN a 94°C durante 3 minutos, fue sometida a 30-40 ciclos sucesivos de desnaturalización del ADN molde (94°C, 1 minuto), hibridación (50-60°C, 1 minuto) y polimerización (72°C, 1 minuto). Por último se incubó a 72°C durante 10 minutos adicionales para una extensión adicional de las cadenas.

8.3. Electroforesis en geles de agarosa de fragmentos de ADN

La separación de fragmentos de ADN se realizó según se describe en Sambrook *et al.* (1989). Las muestras fueron preparadas mezclando 1 volumen de ADN con 1/6 del volumen del tampón de carga 6x (glicerol al 25%(v/v), azul de bromofenol al 0.25% y xilenocianol al 0.25% (p/v)). Los geles de agarosa al 1% se prepararon en tampón TBE 0.5x (tris-borato 45mM, EDTA 2mM pH 8.0) o TAE 0.5x (Tris-acetato 40mM, EDTA 1mM). Las electroforesis se llevaron a cabo en cubetas de electroforesis horizontal "Minisub DNA Cell" (Bio-Rad, USA), a voltaje constante de 100 V. Como marcador de tamaño se utilizó el 1Kb PLUS DNA Ladder de Life technologies, GIBCOBRL. Para la detección del ADN se añadió a los geles bromuro de etidio a una concentración de 0.5µg/ml, y el ADN se visualizó iluminando el gel con un transiluminador de luz ultravioleta (Gel.Doc 1000/2000, Bio-Rad) utilizando el programa Quantity One 4.1.0 incorporado en el sistema.

8.4. Secuenciación de ADN

Las secuenciaciones fueron realizadas en el servicio de secuenciación del "Laboratoire Génome et développement des plantes" de la Universidad de Perpignan (Francia). Los productos de la PCR fueron secuenciados mediante el método de Sanger *et al.* (1997) basado en la terminación de la elongación de cadenas de ADN por la incorporación de didesoxinucleótidos marcados cada uno por un fluorocromo diferente (Prism Read Reaction DyeDeosy Terminator Cycle Séquense Kit, Applied Biosystems). Cada reacción necesitó 250 ng de ADN molde y 5 pmoles de cebador y fue realizada con la ayuda de un robot (Genesis Work Station 150, Tecan). Los productos de la reacción fueron analizados por

electroforesis en capilares de 50 cm utilizando el secuenciador 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

9. MANIPULACIÓN DE ARN

9.1. Tratamiento del material para manipulación de ARN

Para evitar la degradación del ARN por acción de las RNAsas que son muy estables y activas se tomaron las siguientes precauciones:

- El material de vidrio fue autoclavado y posteriormente se sometió a calentamiento en un horno a 140°C durante 2 horas.
- Las disoluciones utilizadas, excepto los tampones Tris, fueron preparadas con H₂O-DEPC y esterilizadas en autoclave.
- El material de plástico o bien era comercialmente estéril o se esterilizó en el autoclave y posteriormente se horneó durante 2 horas a 140°C.

9.1.1. Preparación de H₂O-DEPC

Se incubó 1 l de H₂O ultrapura con DEPC (dietilpirocarbonato) al 0.1% (v/v) durante 12 horas a temperatura ambiente en agitación. Esto se realizó bajo campana ya que los vapores son tóxicos. A continuación se esterilizó en autoclave dejando escapar los vapores generados.

9.2. Aislamiento de ARN de plantas

EL ARN se extrajo utilizando el método del TRI REAGENT® LS como ya se explicó anteriormente. Tras la homogenización y la separación de fases obtuvimos dos fases. La fase superior acuosa (FA) que contenía el ARN fue transferida a un nuevo tubo. A continuación, para precipitar el ARN se añadieron 500 µl de isopropanol y se incubó

durante 10 minutos a temperatura ambiente centrifugándose posteriormente a 12000 g durante 10 minutos a 4°C. El precipitado fue lavado a continuación con 1 ml de etanol al 75% previamente enfriado.

Por último se precipitó el ARN centrifugando a 12000g durante 30 minutos a 4°C, se lavó con EtOH 70% y se resuspendió en 50µl de H₂O-DEPC, excepto para las semillas de 10 días después de la antesis (S10) que se resuspendió en 100µl porque había más ARN.

En este momento se procedió a cuantificar espectrofotométricamente la cantidad de ARN de las muestras, para lo cual se midieron las absorbancias a 260 y 280 nm de diluciones 1:100 de las muestras. La relación A_{260}/A_{280} estaba próxima a 2 en todas las extracciones. Para la cuantificación del ARN se tuvo en cuenta que 1 unidad de absorbancia a 260nm equivale a 40µg/ml (Sambrook *et al.*, 1989).

Para ver si había habido una posible degradación del ARN aislado, se analizaron 2 µg del mismo mediante electroforesis en un gel de agarosa preparado como se explica a continuación. Cuando el ARN no estaba degradado se observaban dos bandas mayoritarias y nítidas correspondientes a los ARN ribosómicos 18S y 25S.

9.3. Electroforesis de ARN en geles de agarosa

Para analizar la posible degradación del ARN se utilizó la electroforesis en geles de agarosa tal y como se utiliza normalmente para los fragmentos de ADN pero inactivando previamente las RNAsas. En el caso de la cubeta y los peines, estos fueron lavados durante 3 horas con NaOH 0.5M y posteriormente se lavaron varias veces con H₂O-DEPC.

9.4. RT-PCR

Esta técnica permite la amplificación mediante PCR de los ADNc resultantes de la retrotranscripción de los ARNs aislados de los diferentes tejidos.

En la retrotranscripción se utilizaron 2.5 µg de ARN total aislado y tratado con DNasa I para eliminar los restos de ADN genómico contaminantes. Para ello, se utilizó la Dnasa RQ1 RNase-Free DNase de Promega incubando a 37°C durante 45 minutos. El tampón de la DNasa contiene Mg²⁺ que puede afectar posteriormente a la reacción de retrotranscripción por lo que antes de ésta se realizó una purificación fenol/cloroformo. Para ello se añadió el mismo volumen de fenol/cloroformo (1:1) que había de muestra y se centrifugó a 13000 g durante 5 minutos. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo, se añadió de nuevo un volumen igual de cloroformo y se centrifugó otra vez a 13000 g durante 5 minutos. Tras esta, se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y el ARN fue precipitado adicionando 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 0.1 volúmenes de acetato sódico 3M pH 5 durante toda la noche a -20°C. Al día siguiente se centrifugó 30 minutos a 12000g a 4°C, se lavó con etanol al 80% frío, se dejó secar y se resuspendió en 38µl de H₂O-DEPC.

La reacción de retrotranscripción se realizó con ayuda del kit “ProSTAR™ First-Strand RT-PCR Kit” (Stratagene). El kit utiliza la transcriptasa inversa StrataScript™ y como cebador un oligo dT. Se añadieron 3 µl de oligodT (100mM) y se incubó a 65°C durante 5 minutos para separar las posibles estructuras secundarias del ARN, después se dejó enfriar lentamente hasta temperatura ambiente para el que oligodT se uniera a los ARNm. Posteriormente se añadieron sobre hielo el resto de los componentes: 5 µl de tampón “first strand buffer 10x”, 1 µl del inhibidor de RNasa “RNase Block Ribonuclease Inhibitor” (40 U/µl), 2 µl

de 100mM dNTPs y 1 μ l de la reverso-transcriptasa “StraptaScript Reverse Transcriptase” (50 U/ μ l) y se incubó a 42°C durante 1 hora. Para parar la reacción se incubó a 90°C durante 5 minutos.

Por último, se llevaron a cabo las PCRs sobre los ADNc obtenidos a partir de la retrotranscripción utilizando los oligos especificados en la tabla 3. En el caso de los genes *EMB615*, *Naglu* de Arabidopsis y la proteína poligalacturonasa de *Zea mays* se buscaron mediante el programa BLAST (ver apartado Herramientas de bioinformática) las secuencias EST (Expressed sequence tags) de cebada homólogas a estos genes. En el caso de la proteína hordeína B1, se procedió de manera similar. A partir de estas secuencias EST y de las secuencias de los genes de cebada se diseñaron los cebadores que aparecen en la tabla 3.

Gen/Procedencia	Cebador	Secuencia	Tm	Ta	Uso
<i>EMB615</i> (arabidopsis.)→ ESTcebada	615F	AAGTTGCGGTCATCAATCTCGAC	68	60	RT-PCR
	615R	CAGGTCTGGACATCAGTG TAGA	68		
<i>Naglu</i> (arabidopsis.)→ EST cebada	Nag5	GAATGGTCCCAGTTCTTCCATCA	68	60	RT-PCR
	Nag3	AACCCTGCATTAACCACACTGCA	68		
<i>END1</i> cebada	End5	AGAGACGGCTCTAGTGTAGCAGA	70	60	RT-PCR
	End3	TGTGAGGCCAGCAACATGGAATG	70		
Hordeina B1 (cebada.)→ EST cebada	Hor5	AACCATTCCACAGCAACCACCA	68	65	RT-PCR
	Hor 3	ATTGTCGACAAGCTCCTGCTGC	72		
Polygalacturonasa (maíz)→ ESTcebada	Poly5	GACAGAATGGCGTTCAAGAACGT	68	60	RT-PCR
	Poly3	AGCAAGTGCCTTCCAGCTTGAT	68		
<i>ECA1</i> cebada	ECAB5	TCATGCTGTCCGTCATCGGGTTC	72	60	RT-PCR
	ECAB3	TGCTGGGGTTAGCAACTACTCGC	72		
<i>EF1a</i> cebada	EF5	GGCTGTCAAGGATCTCAAGC	60	60	RT-PCR
	EF3	AACTATCGCCACCACCAAAC	60		
promotor T7	T7	TAATACGACTCACTATAGGG	48	50	Sec./PCR col.
promotor Sp6	SP6	GCTATTAGGTGACACTATAG	50		

Tabla 3. Cebadores utilizados en las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR). EST: “expressed sequence tags”. Sec.: secuenciación, PCR col.: PCR de colonias.

Tm: Temperatura de “melting” (hibridación) Ta: Temperatura de “annealing” determinada empíricamente.

10. OBTENCIÓN DE LAS SONDAS PARA LAS HIBRIDACIONES *IN SITU*

10.1. Ligación

Los productos de la PCR para los diferentes clones fueron clonados en el vector pGEM-T-Easy del pGEM-T-Easy Vector System I (Promega) utilizando el principio del "TA-cloning". Este plásmido, al contener los promotores de las ARN polimerasas SP6 y T7, es adecuado para la construcción posterior de las sondas sense y antisense. Además este plásmido contiene como marcadores de selección los genes que confieren la resistencia a la ampicilina y una región de clonación múltiple dentro de la región que codifica para el péptido α del gen de la β -galactosidasa. La inactivación insercional del péptido α permite la selección por color de las colonias que contengan los plásmidos que hayan integrado efectivamente el inserto. La ligación de fragmentos de ADN se realizó en un volumen final de 10 μ l mezclando 3 μ l del producto de PCR con 5 μ l del tampón 2x, 1 μ l de ligasa (DNA ligasa del bacteriófago T4) y 1 μ l de vector. Se incubó a 14-16°C durante 12 horas, a 4°C durante 48 horas o bien durante 2 horas a temperatura ambiente.

10.2. Manipulación de *Escherichia coli*

Para disponer de una cantidad suficiente de ADN plasmídico para poder sintetizar posteriormente las distintas sondas se transformaron bacterias *E. coli* cepa DH5 α (Hanahan, 1983) (genotipo *supE44* Δ *lacU169* (Φ 80 *lacZ* Δ *M15*) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*) con los plásmidos pGEM-T-easy que contenían los fragmentos de los genes estudiados.

10.2.1. Medio de cultivo

El medio de crecimiento de las bacterias fue el de Luria-Bertani (LB) (Maniatis *et al.*, 1982) de composición 5g/l de NaCl, 10 g/l de bacto triptona y 5 g/l de extracto de levadura.

Para preparar el medio sólido para las placas (LBA), se adicionó al medio LB Bacto-Agar al 1.5%. Los medios se esterilizaron en autoclave.

El antibiótico utilizado fue la ampicilina, que se preparó disolviéndola en H₂O a una concentración final de 100mg/ml, diluyéndose después para su utilización hasta una concentración de 100µg/ml. Para seleccionar aquellas colonias que tuvieran el plásmido con el inserto se añadieron 100 µl de IPTG 0.5mM y 20 µl de X-gal 50mg/ml (5-bromo-4-cloro-3indolil-β-D-galactopiranosido) sobre las placas 30 minutos a 37°C antes de plaquear.

10.2.2. Preparación de bacteria competentes

Esta técnica se basa en el hecho de que la exposición de *E.coli* a CaCl₂ y otros cationes divalentes a temperaturas próximas a 0°C favorece la penetración de ADN extraño en la célula (Cohen *et al.*, 1972). Para preparar células competentes se tomaron 3 ml de un cultivo en fase estacionaria y se diluyeron en 500 ml de medio LB, incubándose a 37°C y en agitación hasta alcanzar la fase exponencial temprana de crecimiento ($A_{600}=0.4-0.6$). Posteriormente se recogieron las células por centrifugación a 3000 g durante 10 minutos a 4°C y se resuspendieron en 30 ml de una solución de CaCl₂ 60mM y glicerol al 15% (v/v) en PIPES 10mM, pH 7, todo ello sobre hielo. Se incubó durante 40 minutos en hielo y se centrifugó de nuevo durante 10 minutos a 2000g. Se resuspendieron las células de nuevo en 6 ml del tampón anterior y se fraccionaron en alícuotas de 200 µl guardándose hasta su utilización a -80°C.

10.2.3. Transformación de bacterias competentes

Para la transformación se añadieron de 0.1 a 1 µg de ADN plasmídico a una alícuota de 200 µl de células competentes previamente descongeladas sobre hielo y se incubó también sobre hielo durante 20 minutos. A continuación se sometieron a choque térmico a 42°C durante 45 segundos, se añadieron 800 µl de LB y se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación. Por último se centrifugó el cultivo y se sembraron 100 µl en placas selectivas de LBA-ampicilina-Xgal. Las placas se dejaron crecer a 37°C durante toda la noche. Las colonias con plásmidos recombinantes mostraron color blanco por la inactivación insercional del gen *lacZ* mientras que las que no poseían inserto eran de color azul.

10.2.4. PCR de colonias

Para asegurarnos de que las colonias poseían inserto se realizaron reacciones de PCR en las que el ADN molde venía dado por la propia bacteria. Para ello se recogían las colonias con una punta amarilla de micropipeta y se añadía ésta al tubo de reacción en el que previamente se habían puesto 10.35 µl de H₂O ultrapura. A continuación se añadían el resto de los reactivos necesarios para la reacción en un volumen total de 15 µl:

Tampón polimerasa 10x	1.5 µl
MgCl ₂ (25mM)	1.5 µl
dNTPs (10µM)	0.3 µl
cebador 1 (10pmoles/µl)	0.6 µl
cebador 2 (10pmoles/µl)	0.6 µl
Taq (5U/µl)	0.15 µl

Como cebadores se utilizaron los oligos comerciales T7 y SP6 descritos en la tabla 3. Si la colonia poseía el plásmido con el inserto la electroforesis en gel de agarosa debía mostrar una banda que tuviera un tamaño correspondiente a la suma del tamaño de nuestro inserto más el

correspondiente a la secuencia comprendida entre SP6 y T7 en el vector pGEM-T-easy.

10.2.5. Preparación del ADN plasmídico molde

Para la síntesis de la sonda fue necesario aislar una cantidad suficiente de ADN plasmídico y linearizarlo digiriendo con las enzimas de restricción adecuadas para dejar actuar a las ARN polimerasas SP6 y T7 y así obtener las sondas sense y antisense. Estas últimas hibridaban con los transcritos de los genes estudiados mientras que las sondas sense servían de control negativo.

La extracción del ADN plasmídico de bacterias se realizó utilizando el kit “Wizard™ Plus Miniprep DNA Purification System” (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit está basado en el método de la lisis alcalina (Maniatis *et al.*, 1982).

10.2.6. Digestión del ADN plasmídico

Para verificar si el plásmido contenía el inserto se realizaron digestiones con la enzima EcoR I que tiene dos sitios de corte que flanquean el inserto y se comprobó que efectivamente se separaban dos fragmentos: uno de aproximadamente 3 Kb y otro del tamaño correspondiente al inserto.

Para linearizar los plásmidos se utilizaron enzimas que cortaran el el sitio de clonación múltiple pero no en la secuencia clonada y preferentemente que tuvieran extremos romos para que fuera más difícil que se recircularizara el plásmido.

Clon	SÍNTESIS SENSE		SÍNTESIS ANTISENSE	
	ARN pol.	E. Restricción	ARN pol.	E. Restricción
615.12	SP6	Nco I	T7	Spe I
Naglu.30	SP6	Nco I	T7	Spe I
End.12	SP6	Msp I	T7	Spe I
Hor.14	SP6	Nco I	T7	Spe I
Eca.3.5	SP6	Nco I	T7	Nde I
Poly.2.6	T7	Nde I	SP6	Nco I
EF.7	T7	Spe I	SP6	Nco I

Tabla 4. Enzimas de restricción empleadas en la linearización del plásmido pGEM-T-Easy para la posterior transcripción *in vitro* de cada una de las sondas. ARN pol.: ARN polimerasa.

Las digestiones se realizaron en las condiciones óptimas de tampón, concentración y temperatura fijadas por el fabricante para cada enzima. Se digirieron 5 µg de ADN plasmídico a 37°C durante toda la noche para asegurar la completa digestión lo cual se comprobó después mediante electroforesis en gel de agarosa.

Los plásmidos digeridos fueron purificados con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico para limpiar de contaminaciones con otras proteínas, entre ellas las posibles RNasas que podrían degradar las sondas posteriormente. Para ello se añadió el mismo volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) que había de muestra (50 µl) y se centrifugó a 13000 g durante 5 minutos. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo, se añadió de nuevo un volumen igual de cloroformo/isoamílico y se centrifugó otra vez a 12000g durante 5 minutos. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y el ADN fue precipitado mediante la adición de 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 0.1 volúmenes de acetato sódico 3M pH 5 durante toda la noche a -20°C. Al día siguiente se centrifugó 25 minutos a 12000g a temperatura

ambiente, se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 25 μ l de H₂O-DEPC.

10.2.7. Síntesis de las sondas ARN

Una vez linearizado el plásmido se procedió a la síntesis de la sonda utilizando la siguiente mezcla:

- 2 μ g de plásmido digerido que contiene el clon de interés (10 μ l)
- 2 μ l de tampón de transcripción de la polimerasa 10x
- 1 μ l de inhibidor de RNasas HPRI (130 U/ μ l) (Amersham)
- 2 μ l de digRNA labeling mix 10x (Roche)
- 2 μ l de RNA polimerasas SP6 o T7 (Roche)
- 3 μ l de H₂O-DEPC

La mezcla de transcripción se incubó durante 2 horas a 37°C y posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa para ver si el ARN había sido sintetizado correctamente. El ARN fue precipitado tal y como se ha descrito con anterioridad y resuspendido en 15 μ l de H₂O-DEPC.

11. HIBRIDACIÓN *IN SITU* PARA MICROSCOPIA ÓPTICA

11.1. Prehibridación

Los portaobjetos recubiertos de TESPA sobre los que se habían recogido cortes de 1 y 2 μ m de espesor fueron sometidos a un tratamiento con proteinasa K a una concentración de 1 μ g/ml en el tampón TrisHCl 100mM pH 8, EDTA 50mM incubando a 37°C durante 20 minutos. La proteinasa K digiere las proteínas unidas a los ARNs por acción del fijador. Posteriormente se lavaron los portaobjetos con PBS, se bloquearon con glicina 2mg/ml en PBS durante 2 minutos y se volvieron a lavar dos veces con PBS. A continuación se incubaron durante 10

minutos a temperatura ambiente con trietanolamina 100mM pH 8 y otros 10 minutos con una solución de trietanolamina 100mM en la que se había añadido un 0.25% de anhídrido acético. Tras la acetilación se deshidrataron con un gradiente creciente de alcoholes: etanol 30%, etanol 50%, etanol 70%, etanol 90% y etanol 100% y se dejaron secar durante varias horas a temperatura ambiente.

11.2. Hibridación

Para la solución de hibridación se preparó la siguiente mezcla para dos cubres. Se utilizaban 25 µl de solución de hibridación por cubre y se preparaban dos por muestra: uno para la sonda sense y otro para la antisense:

25 µl de formamida desionizada

10 µl de 50% sulfato de dextrano

1 µl de 50x Denharts (Ficoll 25mM, BSA 25mM, PVP (polivinilpirrolidona) 25mM)

3 µl de NaCl 5M

1 µl DTT 3M

1 µl de inhibidor de RNAsas PRI (Amersham).

5 µl de solución TrisHCl 100mM, EDTA 10 mM, pH8

0.5 µl tRNA (10mg/ml)

0.5 µl H₂O-DEPC

Se tomaron 23.5 µl en dos tubos eppendorfs y se les añadió 1.5 µl de las sondas sense y antisense siendo la primera el control negativo del experimento. Los 25 µl de mezcla fueron depositados sobre los cortes y extendidos y tapados con un cubreobjetos. Se incubaron a 50-55°C en cámara húmeda durante toda la noche.

11.3. Lavados

Se realizaron una serie de lavados en jarras Coplin para eliminar la sonda que no se había unido específicamente al ARN de los cortes. Las soluciones de lavado se prepararon a partir de 20x SSC (citratato sódico 300mM, NaCl 3M, pH 7).

Se lavó con SSC 2x durante 5 minutos. Después se incubó en una solución de RNasa A (20µg/ml) preparada en SSC 2x durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó con DTT 1mM en SSC 2x durante 30 minutos a temperatura ambiente haciéndose cambios de solución de lavado cada 5 minutos. A continuación se lavó con DTT 1mM en SSC 0.1x durante 60 minutos también realizando cambios cada 5 minutos a la temperatura utilizada para la hibridación (50-55°C).

11.4. Detección inmunocitoquímica de la sonda

Para detectar la sonda marcada con digoxigenina unida al ARN de las secciones se lavó primero con PBS en jarra Coplin durante 5 minutos para eliminar los restos de SSC, después con NH₄Cl 0.1M en PBS y por último se volvió a lavar con PBS 2 veces más. A continuación se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda con BSA al 5% y Tween 20 al 0.1% en PBS para bloquear las proteínas que pudieran reaccionar inespecíficamente con el anticuerpo anti-digoxigenina. Tras el bloqueo se incubó con el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con oro coloidal de 10 nm de diámetro diluido 1:40 en BSA al 0.5%, Tween 20 al 0.01% en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente también en cámara húmeda. Posteriormente se lavó 2 veces con PBS y 3 veces con H₂O bidestilada. Para detectar la sonda se utilizó el método de la intensificación con plata "silver enhancement" (Stierhof *et al.*, 1992 y 1995). Este método está basado en

el hecho de que las partículas de oro en presencia de cationes plata y un agente reductor pueden actuar como catalizadores de la reducción de los cationes a plata metálica que se deposita sobre las partículas de oro aumentando su tamaño. Este hecho permite la visualización mediante microscopía óptica de las partículas de oro de unos cuantos nanómetros sólo visibles en principio al microscopio electrónico. Para ello, justo en el momento de su utilización se mezclaron volúmenes iguales de los dos componentes de la mezcla del iniciador y el intensificador y se depositó la mezcla sobre los cortes. Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y se lavó abundantemente con H₂O destilada.

Para visualizar las estructuras bajo el microscopio óptico se tiñeron los cortes una vez que estos estaban bien secos con safranina preparada al 1% en etanol y diluida en proporción 1:4 en H₂O destilada.

12. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO: PROLAMINAS

12.1. Extracción de hordeínas y gliadinas

Las hordeínas son un tipo de proteínas pertenecientes al grupo de las prolaminas, proteínas de almacenamiento presentes en todas las gramíneas. Para poner a punto las técnicas de extracción y análisis de las hordeínas durante el desarrollo androgénico de cebada se extrajeron y analizaron previamente las gliadinas (prolaminas del trigo) y las hordeínas de semillas maduras de trigo y cebada en distintos estadios de desarrollo de la semilla 2, 4, 6, 8, 10 y 12 DPA (días postantesis) (fig.2). Posteriormente, se realizaron las extracciones de proteínas de los primeros estadios del desarrollo androgénico de cebada.

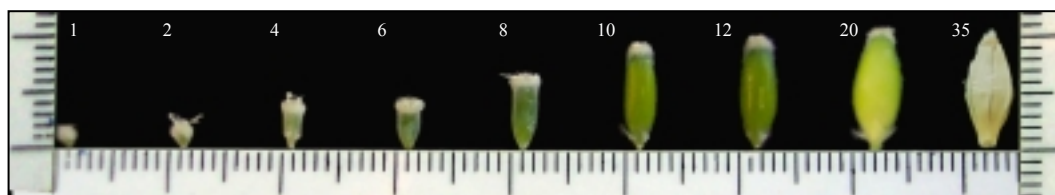


Fig. 2. Semillas de cebada en formación 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 20 y 35 DPA.

Las gliadinas y las hordeínas, al igual que el resto de las prolaminas, son solubles en etanol al 60% en agua por lo que se utilizó esta mezcla para separarlas del resto de las proteínas de almacenamiento.

- Para extraer las gliadinas y las hordeínas de las semillas maduras se molieron 0.125g de semillas con un molinillo de café hasta que adquirieron la consistencia de una harina. A continuación, se añadieron 5 ml de etanol al 60% y se pusieron en un agitador orbital durante 1 hora para que se extrajeran completamente las gliadinas y hordeínas. Tras la extracción se centrifugó a 3220g durante 10 minutos para eliminar toda la fase sólida.
- Para extraer las gliadinas y las hordeínas de las semillas en desarrollo se utilizó un homogenizador Ultra-turrax (Janke and Kunkel, Ika Laborstechnik). Se molieron 0.250g de semillas en desarrollo (3, 6, 8 y 10 días después de la antesis) se añadieron 2.5 ml de etanol al 60% y se procedió igual que anteriormente: extracción durante 1 hora y centrifugación a 3220g.
- Para extraer las hordeínas de las microsporas antes (A0) y después de la inducción androgénica (A3) y tras distintos días de cultivo (C3, C6, C9 y C13) se utilizó el homogenizador utilizado para el aislamiento de estas microsporas a velocidad máxima. Posteriormente se extrajo igual que anteriormente con etanol 60% durante 1 hora en agitación y se centrifugó a 3220g para eliminar los restos sólidos.

A partir de los extractos en etanol al 60% se realizaron los análisis por Western blot y los ensayos de ELISA. Estos extractos se pueden conservar durante 1 mes a temperatura ambiente ya que estas proteínas son termoestables.

12.2. Cuantificación de gliadinas y hordeínas mediante ELISA

Para cuantificar las gliadinas y las hordeínas durante el desarrollo zigótico de trigo y cebada utilizamos el método ELISA desarrollado en el laboratorio del Dr. Enrique Méndez para cuantificar prolaminas en todo tipo de muestras (Valdés et al., 2003). Este sistema ELISA “sandwich” utiliza el anticuerpo R5 y consigue una alta sensibilidad en la detección: 0.39 ng/ml para la cebada y 0.78 ng/ml para el trigo (Valdés et al., 2003).

Se hicieron 3 diluciones de cada una de las muestras primero en etanol al 60% y posteriormente en Tween 20 al 0.05% en PBS justo en el momento de su utilización para evitar que precipitaran.

Se utilizaron placas de poliestireno EIA/RIA (Costar) en las que los pocillos fueron recubiertos incubándolos toda la noche a 4°C en cámara húmeda con el anticuerpo R5 a una concentración de 2.2 µg/ml en tampón carbonato/bicarbonato 50mM pH 9.6. Se lavaron las placas 3 veces con Tween 20 al 0.05% en PBS en un lavador ELISA 1250 Immunowash (Biorad) y se bloquearon con BSA al 1% y Tween 20 al 0.05% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se incubó con los diferentes extractos de nuestras muestras diluidos en Tween 20 al 0.05% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras esto se incubó con el anticuerpo R5 diluido en proporción 1: 30000 en Tween 20 al 0.05% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las placas 6 veces y se añadió el sustrato de la peroxidasa, el TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina)(Neogen). Se detuvo la

reacción diez minutos después con H_2SO_4 2.5M y se midieron las absorbancias a 450 nm utilizando un lector de microplacas (Microplate reader model 550, Biorad). Se utilizó el estándar europeo de gliadinas para establecer la curva patrón que determinara qué concentración correspondía a cada absorbancia.

12.3. Análisis por Western blot de las hordeínas

12.3.1. Electroforesis

Las muestras se analizaron en geles de poliacrilamida al 18% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Laemli, 1970) según el método desarrollado por el Dr. Enrique Méndez (Rocher et al., 1996). Para ello se tomaron los volúmenes correspondientes de los extractos alcohólicos y se llevaron a sequedad centrifugando a vacío. A continuación se añadieron 20 μl del tampón de ruptura que contenía mercaptoetanol y se resuspendió con la ayuda de un vortex.

Tampón de ruptura

SDS al 20%	6 ml
Tris-HCl 1M pH 6.8	2.4 ml
Azul de bromofenol 0.2%	150 μl
Glicerol	3 ml
β - Mercaptoetanol	1.35 ml
H_2O	100 ml

Tras la resuspensión se desnaturalizaron las proteínas a 100°C durante 3 minutos. A continuación, las electroforesis se realizaron en geles discontinuos compuestos de un gel concentrador y un gel separador.

	Separador	Concentrador
Tampón Tris HCl 2M pH 8.9	2.03 ml	0
Tampón Tris HCl 1M pH 6.8	0	0.31 ml
Acrilamida 40%	2.30 ml	0.2 ml
Bisacrilamida 2%	0.63 ml	0.31 ml
SDS 10%	50 µl	25 µl
Agua	18.8 µl	1.65 ml
TEMED	5 µl	2.5 µl
Persulfato amónico 0.2g/ml	15 µl	9.8 µl

Las electroforesis se realizaron en el tampón de electroforesis TGS (Tris 25mM, glicina 1.92M, SDS 1%, pH 8.3) en un equipo MiniPROTEAN II (Biorad) a una intensidad constante de 50 mA durante 1 hora y 15 minutos. Se utilizó un marcador preteñido de rango amplio (Prestained Protein Marker, Broad Range, Biolabs).

12.3.2. Transferencia

Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon P; poro 0.45 µm, Millipore) utilizando el sistema Trans-Blot Cell (BioRad Lab., Hercules, CA, USA). La electrotransferencia se llevó a cabo en CAPS 10mM (ácido 3-ciclohexilamino-1-propanosulfónico, Sigma, St. Luis, Mo., USA) en metanol al 10% utilizando una intensidad constante de 400 mA durante 2 horas. Antes de la transferencia fue necesario tratar las membranas con metanol, agua ultrapura y CAPS 10mM en ese orden para hacer las membranas menos hidrofóbicas.

12.3.3. Incubación con el anticuerpo

Acabada la transferencia se tiñó el gel de proteínas en solución azul de Coomassie (azul de Coomassie al 0.1%, metanol al 40% y ácido

acético al 10%) para comprobar que la transferencia había transcurrido bien y se bloqueó la membrana toda la noche a 4°C en BSA al 1% y Tween 20 al 0.05% en PBS. Al día siguiente se lavó la membrana 3 veces con Tween 20 al 0.1% en PBS durante 5 minutos con agitación suave. Posteriormente se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación lenta con el anticuerpo CR5 (R5 conjugado con peroxidasa) diluido en proporción 1:5000 en BSA al 0.5%, leche desnatada en polvo al 1% y Tween-20 al en PBS. Antes del revelado de la membrana se realizaron 6 lavados de 5 minutos de duración con Tween 20 al 0.1% en PBS.

12.3.4. Detección por quimioluminiscencia

Se siguió básicamente el protocolo descrito por Valdés et al. (2003). Para el revelado se utilizó el kit ECL Western blotting analysis system (Amersham). Para preparar la solución de revelado se mezclaron 5 ml de las soluciones nº1 y nº2 contenidas en el kit para conseguir 10 ml de la solución de revelado. Esta solución se conserva a 4°C y puede utilizarse hasta 10 veces. En una cámara oscura se retiró la solución de lavado, se añadió la solución de revelado sobre la membrana y se incubó durante 1 minuto. Tras este tiempo en la solución de revelado se sacó la membrana escurriéndola lo más posible y se puso sobre un film transparente de doble cara cubriéndola bien para evitar que se humedeciera la película posteriormente y procurando que no quedaran burbujas. A continuación se puso la película (KONICA AX Q4AD) sobre la membrana y se incubó durante 30 segundos. Posteriormente se reveló la película y dependiendo del resultado se volvió a exponer películas durante más tiempo: 1 minuto, 10 minutos, 30 minutos, 1 hora...

Para la detección de la señal en el caso de las muestras androgénicas se utilizó el sistema de adquisición digital de imágenes Fluor S Max de Biorad.

13. HERRAMIENTAS DE BIOINFORMÁTICA

Se utilizaron diversos bancos de datos para estos estudios, principalmente ENTREZ. ENTREZ es un conjunto de bancos de datos localizado en el National Center for Biotechnology Information al que se accede a partir de la dirección <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>. ENTREZ incluye la conocida base de datos de bibliografía MEDLINE y además permite la búsqueda de secuencias de nucleótidos, aminoácidos y estructuras. Para los estudios de expresión sobre genes relacionados con la gametogénesis, embriogénesis zigótica y androgénesis se realizó una búsqueda bibliográfica utilizando PubMed y otras bases de datos bibliográficos de artículos de interés. A partir de estos artículos, ENTREZ nos proporcionó las secuencias de las proteínas y de los ARNm de los genes de interés. Algunos de estos genes eran de cebada otros sin embargo eran de otras especies. Para estos últimos se realizó una búsqueda utilizando el programa BLAST a partir de la página web del laboratorio de la Dra. Martine Devic (Genoma y desarrollo de plantas de la Universidad de Perpignan, Francia), (<http://lgdp.univ-perp.fr/>), que nos proporcionó las secuencias EST “Expressed Sequence Tags” de cebada homólogas a las secuencias de interés. Se utilizaron dos modalidades distintas de BLAST en esta búsqueda: **tblastn** que alinea la secuencia de la proteína en cuestión con todas las secuencias de nucleótidos traducidas a aminoácidos disponibles en la base de datos (esta modalidad se utilizó para hallar las ESTs de cebada homólogas a la poligalacturonasa de maíz y a la proteína hordeína B1 de cebada) y **tblastx** que traduce la secuencia requerida de nucleótidos a aminoácidos y las alinea con todas las secuencias nucleotídicas traducidas a aminoácidos disponibles en la base de datos (esta fue la modalidad utilizada para conseguir las ESTs de cebada homólogas a los genes *EMB615* y *Naglu* de *arabidopsis*).

Las secuencias obtenidas por RT-PCR fueron analizadas mediante dos programas Sequencher y el BioEdit.



Resultados

1. ESTABLECIMIENTO DE PARÁMETROS MACROSCÓPICOS INDICADORES DEL ESTADIO DE DESARROLLO DE LAS MICROSPORAS DE CEBADA.

Con objeto de poder establecer una relación entre las fases de desarrollo del polen y caracteres externos de la espiga y la antera fácilmente evaluables se analizaron algunos parámetros morfológicos de las espigas y de las anteras a lo largo del periodo de floración de la cebada (tabla 5). Los parámetros considerados fueron: la posición de la espiga con respecto a las lígulas de la hoja bandera (fig. 3B), el color de la espiga y el color de las anteras. En paralelo, se tiñeron las anteras con DAPI para determinar la fase de desarrollo en la que se encontraba el polen de cebada en cada momento. Así establecimos unos criterios para seleccionar las anteras cuyo polen estaba en el estadio óptimo para la inducción androgénica lo que facilitaba la selección de las espigas. Este estadio en el caso de cebada es microspora vacuolada (fig. 3A). La tabla 5 muestra los resultados para los caracteres analizados correspondientes a los diferentes estadios del polen determinados mediante tinción con DAPI.

Estos parámetros también nos permitieron establecer el momento en el que se producía la antesis. La antesis marca el inicio del desarrollo zigótico, definir este momento facilita el seguimiento de dicho proceso en el tiempo. Así, el estudio de las anteras nos permitió establecer que las anteras de color verde oscuro se iban tornando amarillentas conforme el polen bicelular que contenían sufría la segunda mitosis. Cuando estas anteras eran prácticamente amarillas sufrían una elongación muy rápida (sólo un par de horas) que marcaba el momento preciso de la antesis en el que prácticamente todas las microsporas de la antera se encuentran en el estadio de polen tricelular. Justo en este momento dos tercios de la espiga se encontraban ya en el exterior.

Estadio del polen (DAPI)	Posición relativa espiga y hoja bandera	Color de la espiga	Color de la antera
Tetrada	-4.5 cm	verde muy claro	verde blanquecino
Microspora Joven	0 cm	verde muy claro	verde muy claro
Microspora Vacuolada	1-2 cm	verde claro	verde claro
Polen Bicelular	3-5 cm	verde	verde oscuro, rayas
Polen Tricelular	7cm	amarillo	amarillo

Tabla 5. Relación entre el estadio de desarrollo de las microsporas dentro de la antera y la posición de las barbas de la espiga con respecto de la lígula de la hoja bandera (considerando 0 cuando están al mismo nivel), el color de la espiga y el color de la antera.

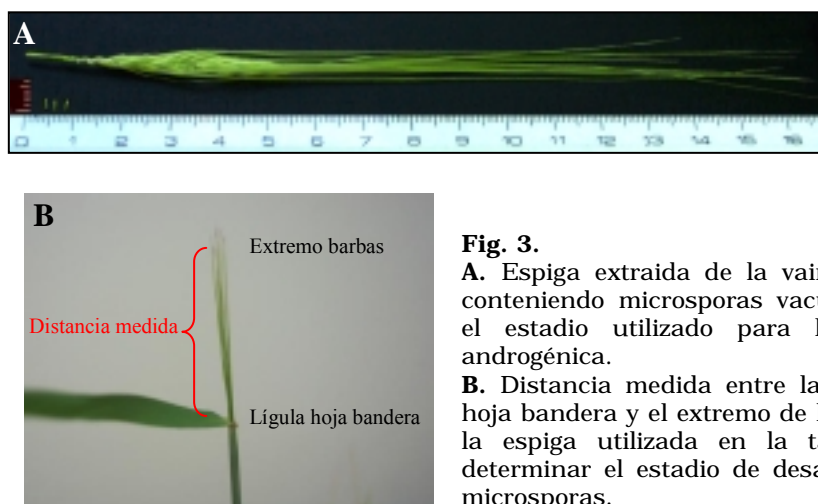


Fig. 3.

A. Espiga extraída de la vaina y anteras conteniendo microsporas vacuoladas (A0), el estadio utilizado para la inducción androgénica.

B. Distancia medida entre la lígula de la hoja bandera y el extremo de las barbas de la espiga utilizada en la tabla 5 para determinar el estadio de desarrollo de las microsporas.

2. ESTUDIO CITOLÓGICO DEL DESARROLLO GAMETOFÍTICO DEL POLEN DE CEBADA.

Al establecer la relación entre los distintos parámetros macroscópicos y el estadio de desarrollo del polen pudimos estudiar algunas características citológicas del desarrollo gametofítico del polen de cebada. En la figura 4 se muestran fotos de las distintas etapas del desarrollo del polen obtenidas mediante tinción con DAPI sobre

aplastados (figs. 4A-F), que nos permitió seguir la evolución de los núcleos, y en semifinos teñidos con azul de toluidina (figs. 4G-K), que nos permitió ver los cambios estructurales que se producen en el polen durante su desarrollo gametofítico. La célula madre del polen de cebada presentaba una morfología poliédrica (fig. 4G), poseía un citoplasma muy pobre y en su núcleo la cromatina estaba muy condensada. La célula madre del polen después de la meiosis daba lugar primero a la formación de las diadas (fig. 4A) y seguidamente a la formación de las tetradas (fig. 4B) que permanecían unidas encerradas dentro de una pared de calosa. Tanto las diadas como las tetradas presentaban núcleos con una cromatina muy condensada e igual intensidad de fluorescencia. En el estadio de microspora joven o microspora recién liberada (fig. 4C) el núcleo ocupaba una posición central en la microspora y la cromatina aparecía más descondensada que en el estadio anterior. Posteriormente, en el estadio de microspora vacuolada el núcleo era desplazado hacia la periferia por la presencia de una gran vacuola que ocupaba una gran parte del citoplasma (figs. 4D e I). Este es el estadio más adecuado para la inducción androgénica ya que produce los mejores resultados de obtención de embriones. Tras la división asimétrica de la microspora vacuolada, en el estadio de polen bicelular joven, (figs. 4E y J) se observaron dos núcleos: el núcleo vegetativo que poseía una cromatina más dispersa y el núcleo generativo que tenía una mayor condensación cromatínica y por tanto una mayor intensidad de fluorescencia. Posteriormente, en el polen bicelular maduro el núcleo vegetativo ocupaba una posición central en la célula vegetativa mientras que el núcleo generativo, que presentaba una mayor intensidad de fluorescencia, se disponía próximo al núcleo vegetativo. Finalmente, el polen bicelular tras la división simétrica del núcleo generativo daba lugar al polen tricelular maduro (figs. 4F y K). El polen tricelular estaba formado por la célula vegetativa que poseía un núcleo con una cromatina

muy descondensada y por los dos núcleos espermáticos procedentes de la división de la célula generativa que presentaban una cromatina muy condensada y una alta intensidad de fluorescencia (fig. 4F). Durante esta última etapa del desarrollo la célula vegetativa acumulaba una gran cantidad de sustancias de reserva en forma de almidón (fig. 4K).

Fig. 4. Distintas fases del desarrollo gaméfitico en cebada.

Figs. **A-G:** Tinción con DAPI para ADN en aplastado. **A:** Diada con sus dos núcleos con una intensidad de fluorescencia semejante, **B:** Tetradas con sus cuatro núcleos fluoresciendo, **C:** Microspora joven con un núcleo central, **D:** Microspora vacuolada el núcleo se encuentra en un extremo de la microspora ocupada principalmente por una gran vacuola (V). **E:** Polen bicelular en el que el núcleo generativo (NG) presenta una mayor intensidad de fluorescencia que el núcleo vegetativo (NV). **F:** Polen tricelular los dos núcleos espermáticos (NE) presenta mayor intensidad de fluorescencia que el núcleo vegetativo (NV).

Figs. **G-K:** Secciones semifinas teñidas con azul de toluidina. **G:** Célula madre del polen en profase meiótica. **H:** Diadas en las que se distinguen restos de calosa (Ca). **I:** Microspora vacuolada la pared de las microsporas ya está formada, el citoplasma y el núcleo se distribuyen en la periferia de la microspora relegadas por la gran vacuola (V). **J:** Polen bicelular joven con su células vegetativa con gran nucleolo (CV) y generativa (CG) bien visibles en polos opuestos del grano que conserva la vacuola (V). **K:** Polen tricelular en el que el citoplasma de la célula vegetativa es muy rico en almidón (al).

Las barras representan 10 μm .

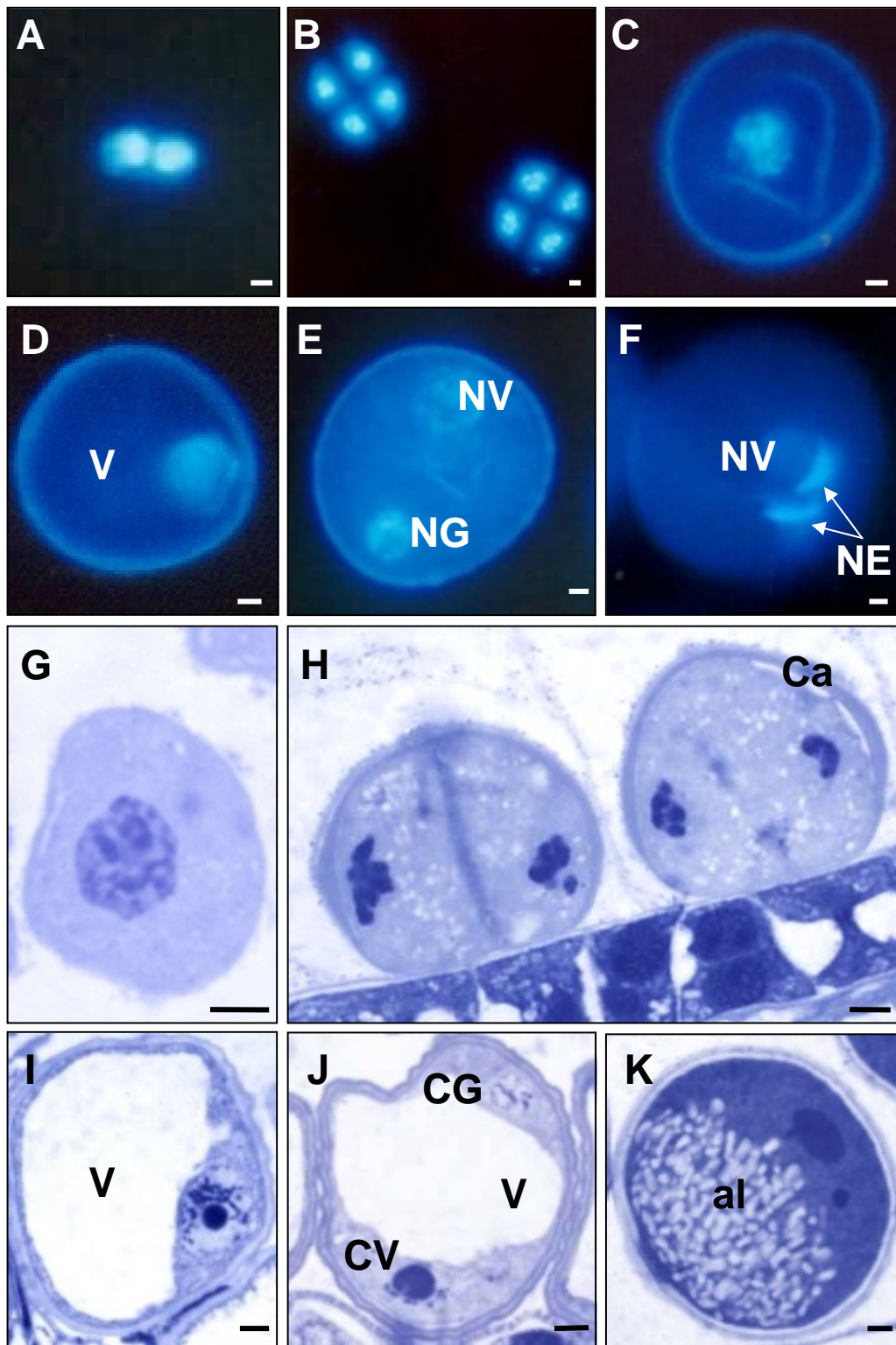


Fig. 4

3. CAMBIOS ESTRUCTURALES DURANTE LA INDUCCIÓN Y LAS PRIMERAS ETAPAS DE LA ANDROGÉNESIS.

Con el fin de estudiar la inducción y las primeras etapas del proceso androgénico se analizaron, en primer lugar, las anteras control, es decir anteras antes de ser sometidas al pretratamiento de inducción (denominada fase A0). Para la inducción androgénica en cebada se utilizaron, como anteras de partida, anteras que contenían microsporas en el estadio de microspora vacuolada porque este estadio era el que producía un mayor rendimiento en la producción de embriones. En estas anteras las microsporas vacuoladas se distribuían en la periferia del lóculo de la antera en contacto directo con el tapetum (fig. 5A). Algunas de estas microsporas presentaban un tamaño menor y se localizaban en parejas con una de las microsporas más hacia el interior del lóculo de la antera. El número de estas microsporas dimórficas era pequeño si se comparaba con el número total de microsporas presentes en la antera.

Fig. 5. Inducción embriogénica en cultivo de anteras.

Figs. **A,D,E:** Secciones semifinas teñidas con azul de toluidina. **A:** Antera antes de la inducción androgénica (A0) microsporas vacuoladas distribuidas en la periferia de la antera. Nótese la presencia de microsporas de menor tamaño (estrellas). **D:** Anteras después de 15 días en frío (F15) las microsporas pierden su contacto con el tapetum y se distribuyen más al azar haciéndose menos redondeadas. Algunas son muy similares a las microsporas vacuoladas de anteras no pretratadas pero en otras se distinguen ya dos células (flechas). **E:** Anteras después de la inducción androgénica tras cuatro días en manitol (fase A4), las microsporas se ven menos redondeadas muchas veces parecen vacías y como en el caso de (F15) se observan también microsporas con dos células (flechas).

Figs. **B y C:** Tinción con DAPI para ADN en aplastado. **B:** Después de la inducción (A4) nótese la presencia de un polen embriogénico binucleado en el que los dos núcleos presentan igual intensidad de fluorescencia resultado de una división simétrica junto con una microspora uninucleada que parece no haber respondido a la inducción. **C:** Después de la inducción (A4) polen binucleado en el que los dos núcleos presentan distinta intensidad de fluorescencia resultado de una división asimétrica.

Las barras representan 100 μm .

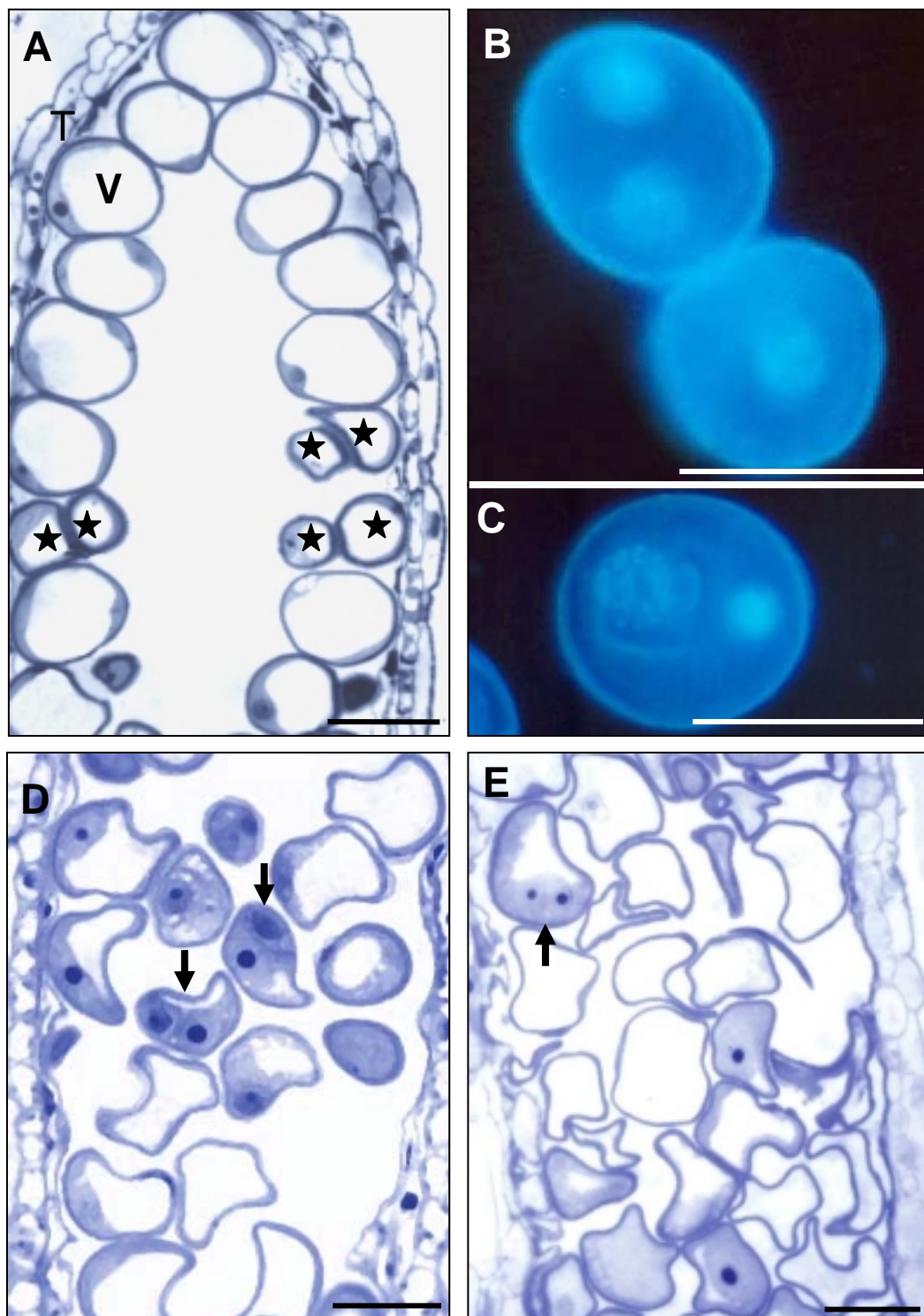
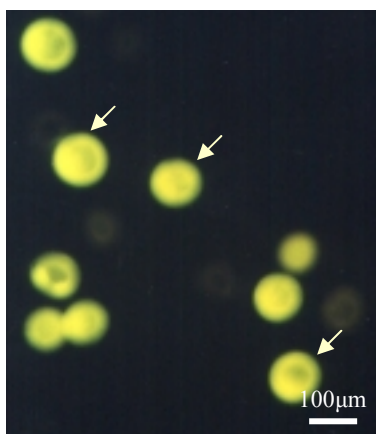


Fig.5

Para la inducción androgénica en cebada se utilizaron dos pretratamientos de inducción diferentes: por un lado, un tratamiento con manitol (A3 o A4), que ocasionaba un estrés por ayuno combinado con un estrés osmótico y por otro, un tratamiento de choque frío (F15), estrés ocasionado al someter a las anteras dentro de las espigas a una temperatura de 4°C durante 15 días.

El pretratamiento con manitol fue de dos tipos dependiendo de si posteriormente se iba a realizar el cultivo de anteras (manitol 0.7M durante 4 días, denominado A4) o de si se iba a realizar un cultivo de microsporas aisladas (manitol 0.3M durante 3 días, denominado A3).

Las microsporas, independientemente del pretratamiento de inducción aplicado (F15, A3 o A4), aparecían desorganizadas dentro de la antera perdiendo el contacto que la mayoría de ellas tenía, antes de la inducción, con el tapetum. Además, ya no presentaban su redondez original ni su aspecto homogéneo. Así, junto a algunas que parecían no haber cambiado mucho su aspecto, encontrábamos otras vacías y algunas con dos células (figs. 5D y E).



Tinción con FDA. Las microsporas viables presentan fluorescencia (flechas blancas)

La respuesta a estos diferentes métodos de inducción fue evaluada además mediante tinción con FDA (foto al margen). Esta tinción nos mostró la viabilidad del polen tras los pretratamientos de inducción. El FDA es un fluoróforo que penetra en las células viables que presentan entonces una fluorescencia de color verde a diferencia de las células muertas en las que no penetra y por tanto no presentan fluorescencia. El pretratamiento de anteras con frío proporcionó una baja

respuesta a la inducción por lo que para este método de inducción nos limitamos a estudiar solamente las divisiones obtenidas tras el pretratamiento de frío durante 15 días (denominado F15). Nuestros estudios sobre el desarrollo androgénico se basaron en los resultados obtenidos con los otros dos métodos de inducción: cultivo de anteras y cultivo de microsporas aisladas pretratadas en ambos casos con manitol. La diferencia básica entre ambos métodos es que en el segundo caso se aislaron las microsporas del tejido esporofítico de la antera. Este hecho nos permitió a su vez ver la influencia del tejido esporofítico sobre el proceso de inducción androgénica.

3.1. Seguimiento de la evolución de los núcleos.

El DAPI es un fluorocromo que permite ver la evolución de los núcleos, su posición dentro de las microsporas y el grado de condensación de la cromatina, por lo que es de gran utilidad para el seguimiento de las primeras divisiones androgénicas obtenidas tras los pretratamientos de inducción. La tinción con DAPI se aplicó tanto sobre material aplastado (figs. 5 y 6) como sobre secciones semifinas (fig. 7) de anteras sometidas a los distintos pretratamientos y posteriormente de anteras y microsporas aisladas cultivadas durante 3, 6, 9 y 13 días tras los pretratamientos con manitol. Independientemente del método de inducción utilizado para la obtención de embriones la tinción con DAPI mostró que los resultados obtenidos eran semejantes en cuanto a las primeras divisiones obtenidas. Así, junto a microsporas que no habían respondido al pretratamiento de inducción se observaron, por un lado, divisiones simétricas (más abundantes) que daban como resultado dos núcleos idénticos (figs. 5B y 6E) y, por otro lado, divisiones asimétricas que producían núcleos de diferente tamaño y con distinto grado de

condensación cromatínica, similares a los núcleos vegetativo y generativo del polen bicelular (figs. 5C y 6A).

Fig. 6. Inducción embriogénica en cultivo de microsporas aisladas.

Figs. **A-G:** Tinción con DAPI para ADN en aplastado. La respuesta a la inducción y cultivo de microsporas no es ni homogénea ni sincrónica. **A y E:** Microsporas inmediatamente después de la inducción con manitol (A3). **A:** Divisiones asimétricas: dos núcleos con distinto grado de condensación de la cromatina y **E:** simétricas: dos núcleos iguales. En algunos casos (fig. **A**) aparece ya una segunda división de la célula con el núcleo más fluorescente.

C y D: Microsporas cultivadas durante 3 días después de la inducción (C3). El resultado no es homogéneo hay microsporas vacías y otras que han sufrido divisiones sucesivas. Población no sincrónica de pólenes embriogénicos es decir que se han dividido un número distinto de veces. En ellos pueden verse además de distinto número de núcleos, núcleos a veces con igual y otras con distinta intensidad de fluorescencia. **C:** División asimétrica inicial, pueden ser más abundantes los núcleos más fluorescentes. **D:** También es posible distinguir en algunos casos los cromosomas (C) de células en división y una cierta polarización de los núcleos (estrella blanca).

B: Microspora cultivada durante 6 días después de la inducción (C6). División asimétrica seguida de posteriores divisiones de la célula con el núcleo menos fluorescente.

F y G: Microsporas cultivadas durante 9 días después de la inducción (C9). **F:** Proembrión con gran número de núcleos en los que puede verse la salida de la pared de la microspora. **G:** o en casos más avanzados sólo los restos de dicha pared (puntas de flecha blancas).

Las barras representan 100 μm .

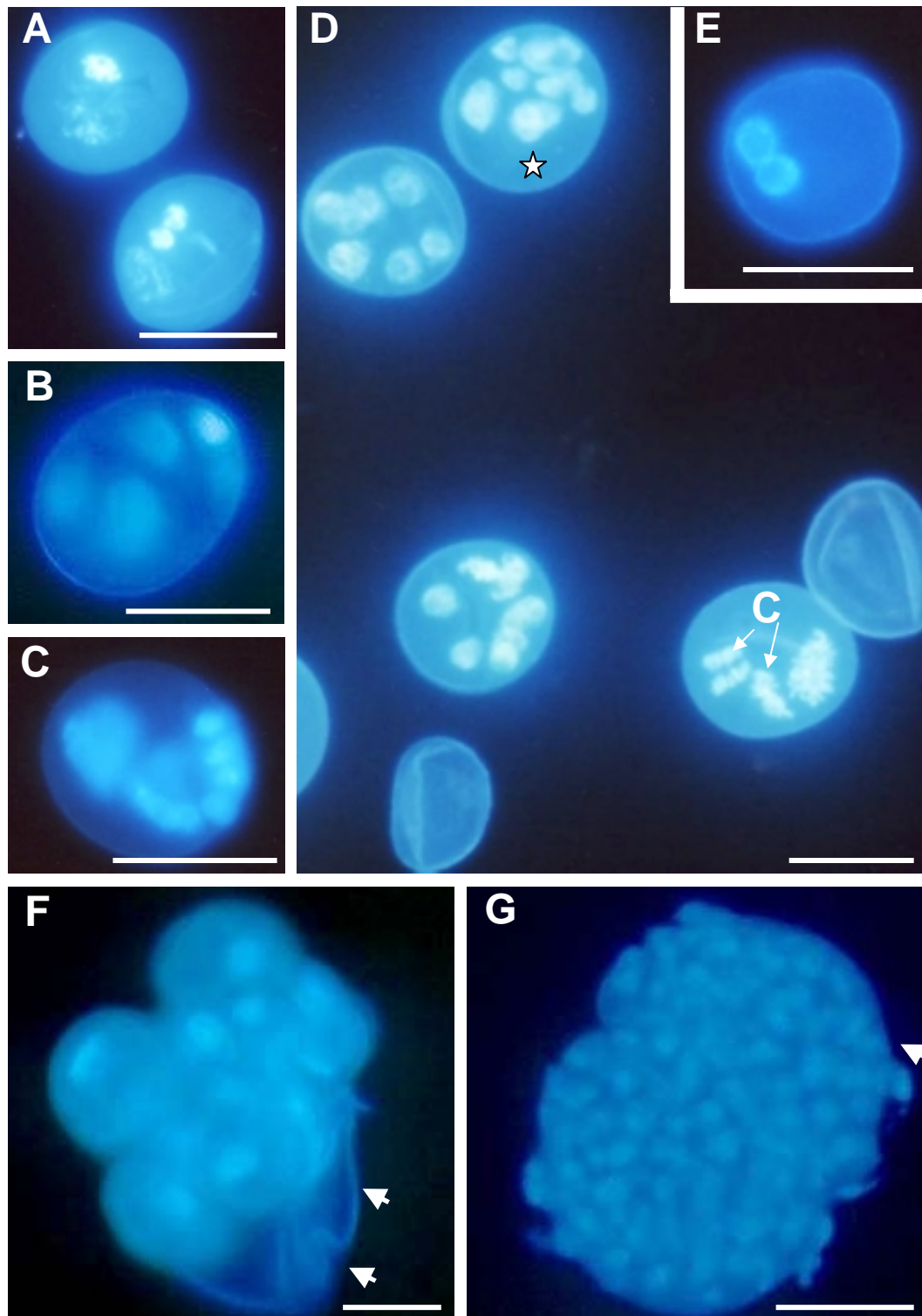


Fig. 6

Posteriormente, cuando se cultivaron las anteras y las microsporas durante tres días en sus respectivos medios tras los pretratamientos con manitol, se observó que en ambos casos, a las primeras divisiones bien simétricas, bien asimétricas siguieron nuevas divisiones (figs. 6 y 7) siendo los granos multinucleares procedentes de la división simétrica, con núcleos iguales entre sí, mucho más abundantes. En el caso de las divisiones asimétricas se observaron por un lado granos multinucleares en los que el núcleo con una menor condensación cromatínica semejante al núcleo de la célula vegetativa del polen bicelular, se había dividido posteriormente varias veces mientras que el núcleo con una cromatina más condensada, similar a la del núcleo de la célula generativa, no había sufrido ningún tipo de división (fig. 6B) y, por otro lado, también se observaron otros granos en los que tanto el núcleo menos fluorescente como el núcleo más fluorescente se habían dividido tras la primera división asimétrica.(fig. 7C).

Fig. 7. Inducción embriogénica en cultivo de anteras.

Figs. **A-C:** Tinción con DAPI para ADN en secciones semifinas. **A:** Distribución de las microsporas vacuoladas en las anteras antes de someterlas a ningún tratamiento (A0). **B:** Antera cultivada durante 6 días después de la inducción (C6). Microsporas que no parecen responder a la inducción androgénica junto con otras en las que se han producido distinto número de divisiones. **C:** Antera cultivada durante 9 días después de la inducción (C9). Granos multinucleados con distinto tamaño y número de núcleos que además presentan distinta intensidad de fluorescencia. Proembrión con dos tipos de células unas con núcleos más pequeños y alargados en un extremo y otros más grandes y redondeados en otro (flecha blanca). Las barras representan 100 μ m.

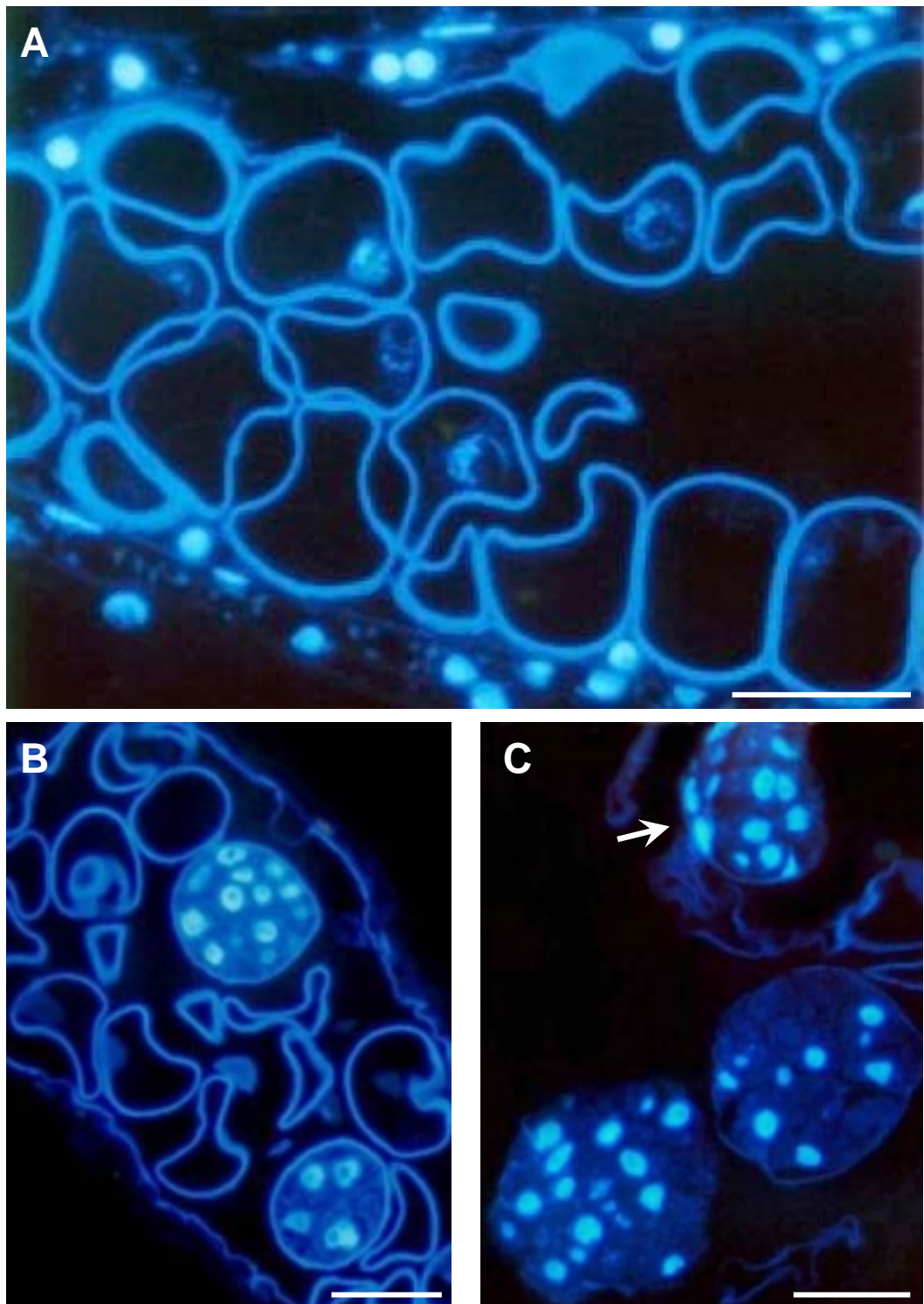


Fig. 7

En líneas generales, el número de núcleos presentes en estos granos multinucleares aumentaba con el número de días de cultivo tanto en el cultivo de anteras como en el de cultivo de microsporas, sin embargo tampoco había sincronización en las microsporas en este sentido (figs. 5, 6 y 7). Tras 6 días de cultivo se encontraron granos multinucleares en los que se observaba una cierta polarización de manera que los núcleos se localizaban en uno de los polos del grano de polen apareciendo el otro vacío (fig 6D). La autofluorescencia que presenta la pared con la luz UV que excita el DAPI nos permitió observar dónde estaban situadas las estructuras embriogénicas en la antera (fig. 7B). Posteriormente, tras 9 días de cultivo se observó que en algunos granos de polen multinucleares la pared de la microspora, que continuaba presentando autofluorescencia, parecía romperse y liberar la estructura embriogénica (fig. 6F y G). En algunos casos esta ruptura se producía antes, tras 6 días de cultivo. Los proembriones de 9 días poseían ya un número considerable de núcleos (fig. 6G), de manera que al aplastarlos se producía una gran fluorescencia que hacía difícil determinar si los núcleos que los componían eran similares en cuanto a condensación de la cromatina o no. En cambio la tinción con DAPI sobre secciones semifinas evitaba este problema y nos permitía ver que en anteras cultivadas durante 9 días (fig. 7C) tras el pretratamiento de inducción se observaban unos núcleos situados en la periferia del grano similares entre sí y diferentes del resto de núcleos que componían el grano. Estos núcleos diferentes parecían proceder de aquellas microsporas que, como se ha descrito anteriormente, se habían dividido por primera vez asimétricamente.

3.2. Cambios citológicos tras la inducción androgénica.

Aunque la tinción con DAPI permite obtener una gran información sobre las primeras divisiones androgénicas es necesaria la observación de secciones semifinas teñidas con azul de toluidina para ver con más detalle los cambios morfológicos que se producen en las microsporas y anteras en cultivo tras los pretratamientos de inducción.

Tras el pretratamiento por choque térmico (F15) las anteras de cebada contenían microsporas que habían sufrido divisiones tanto simétricas como asimétricas, microsporas que no habían sufrido aparentemente ningún cambio y por último otras que parecían muertas (fig. 5D). Muchas de estas microsporas habían perdido el contacto directo con el tapetum y aquellas que presentaban divisiones tenían, en general una localización más o menos central en el lóculo de la antera.

Por otro lado, el estudio de las anteras que habían sido pretratadas con manitol (A3 o A4) daba lugar a resultados similares. Al igual que ocurría con el tratamiento de frío, estas anteras contenían microsporas que se habían dividido junto a otras que o no parecían haber sufrido ningún tipo de cambio o parecían haber muerto (Fig. 5E). El pretratamiento con manitol (A3 o A4) también produjo desestructuración en las microsporas, en la que se producía una pérdida del contacto directo de las microsporas con el tapetum. Como se ha explicado con anterioridad, el estrés por frío dió como resultado un rendimiento más bajo de inducción androgénica por lo que no se prosiguió su estudio de manera que, en adelante, nos limitaremos a la descripción de los cambios citológicos producidos en anteras y microsporas cultivadas tras los respectivos pretratamientos en manitol.

3.2.1. Cultivo de anteras.

Cuando se cultivaron las anteras de cebada durante 3 días tras el pretratamiento de inducción con manitol (lo que denominamos C3) se confirmó que la respuesta a la inducción no había sido homogénea: mientras que algunas microsporas habían respondido dividiéndose y mostrando diferente número de células, otras no habían sufrido aparentemente ningún cambio o habían muerto (fig. 8A). Esta situación como era de esperar se repitió en cultivos más prolongados (C6, C9, C13) (figs. 8 y 9). Entre las microsporas que sí habían respondido, había algunas que presentaban unos dominios multinucleados, es decir, varios núcleos entre los que no era posible encontrar paredes celulares (fig. 8B). Sin embargo la mayoría de los granos de polen multicelulares sí mostraban entre sus células las paredes celulares completas (fig. 8C). En muchos de estos granos multicelulares se apreció una cierta polarización debido a la presencia de una o varias vacuolas de gran tamaño que probablemente procedían de la vacuola de la microspora vacuolada inicial (figs. 8B y C). Tras 6 días de cultivo (C6) la respuesta a la inducción siguió sin ser homogénea (fig. 9). Dentro de la antera encontramos una población de granos de polen multicelulares en los que se podían distinguir por un lado unos granos formados por células semejantes entre si (fig. 9A) a los que llamamos granos multicelulares homogéneos y por otro granos multicelulares, a los que llamamos heterogéneos, que eran mucho menos frecuentes y contenían dos tipos de células de diferente morfología (figs. 9B y C).

Fig. 8. Cultivo durante tres días (C3) de anteras tras la inducción androgénica. Figs. **A-D**: Secciones semifinas teñidas con azul de toluidina. **A**: Antera en la que se distinguen granos multicelulares o multinucleares (en los que no se han formado la paredes entre células), junto con microsporas que parecen seguir como al inicio (microsporas vacuoladas) y con microsporas muertas. **B**: A mayor aumento detalle de polen multinuclear. **C** y **D**: Granos multicelulares con distinto número de células y restos de la vacuola de la microspora vacuolada de diferente tamaño (estrella blanca). Las barras representan 10 μ m, salvo que se especifique otro valor.

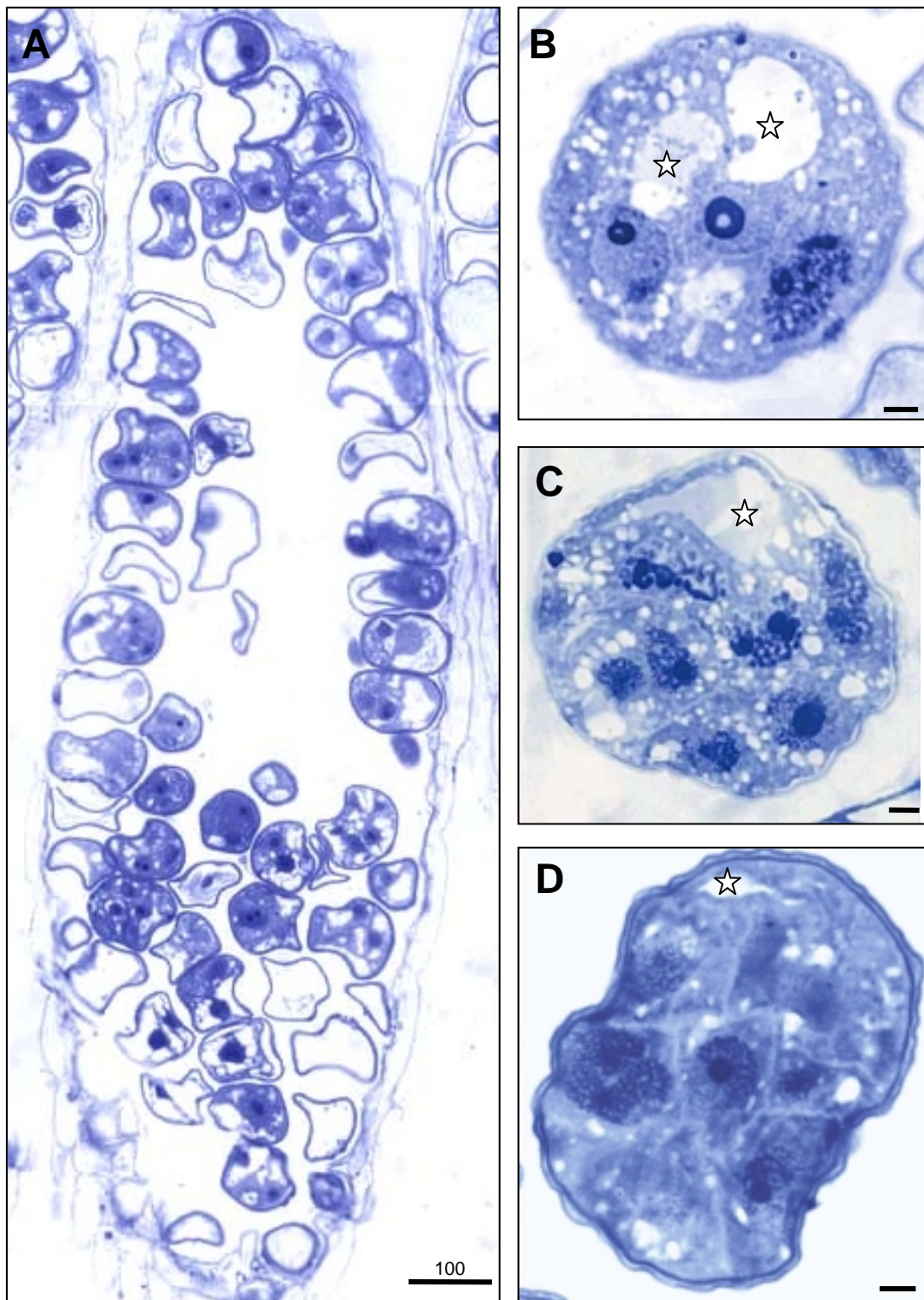


Fig. 8

En los granos de polen multicelulares heterogéneos las células situadas en el centro poseían unas características similares a las células de los granos homogéneos descritos anteriormente mientras que las células del otro tipo celular que se disponían hacia la periferia del grano, poseían un citoplasma mucho más denso (fig. 9B). A pesar del gran número de células que poseían los granos multicelulares tras 6 días de cultivo, la pared que los rodeaba permanecía intacta en la inmensa mayoría de ellos. Sin embargo, en este momento del cultivo, encontramos por primera vez algunos granos multicelulares en los que esta pared había comenzado a romperse (fig 9C). Los granos que presentaban la pared rota pertenecían en general a los que hemos denominado heterogéneos y la pared se rompía precisamente justo donde se encontraban las células de citoplasma más denso. Estas células parecían liberar al lóculo de la antera el material de su citoplasma que allí se disgregaba.

Fig. 9. Cultivo durante seis, nueve y trece días (C6, C9 y C13) de anteras tras la inducción androgénica.

Figs. **A-F**: Secciones semifinas teñidas con azul de toluidina. Figs. **A, B** y **C**. Cultivo de anteras después de 6 días (C6), granos de polen embriogénicos con distinto tamaño y número de células. A estas estructuras también se las denomina granos embriogénicos, granos de polen multicelulares o granos multicelulares. **A**: Grano multicelular constituido por un único tipo de células (homogéneo). **B**: Grano de polen multicelular homogéneo junto con otros dos de tipo heterogéneo (con dos tipos distintos de células) todos desarrollándose dentro de la pared del polen **C**: Polen multicelular heterogéneo en el que se observa la ruptura de la pared del polen. Fig. **D**: Proembrión con un gran número de células encontrado tras nueve días de cultivo (C9), quedan algunos restos de pared (puntas de flecha). Figs. **E** y **F**. Estructuras de aspecto embrionario ("embryo like structures") semejantes al embrión tipo bate o pera de la embriogénesis zigótica obtenidas tras trece días de cultivo (C13). **F**: estructura embrionaria más avanzada que la de la fig. **E**, en la que la protodermis (Pr) parece ya diferenciada. Las barras representan 20 μm .

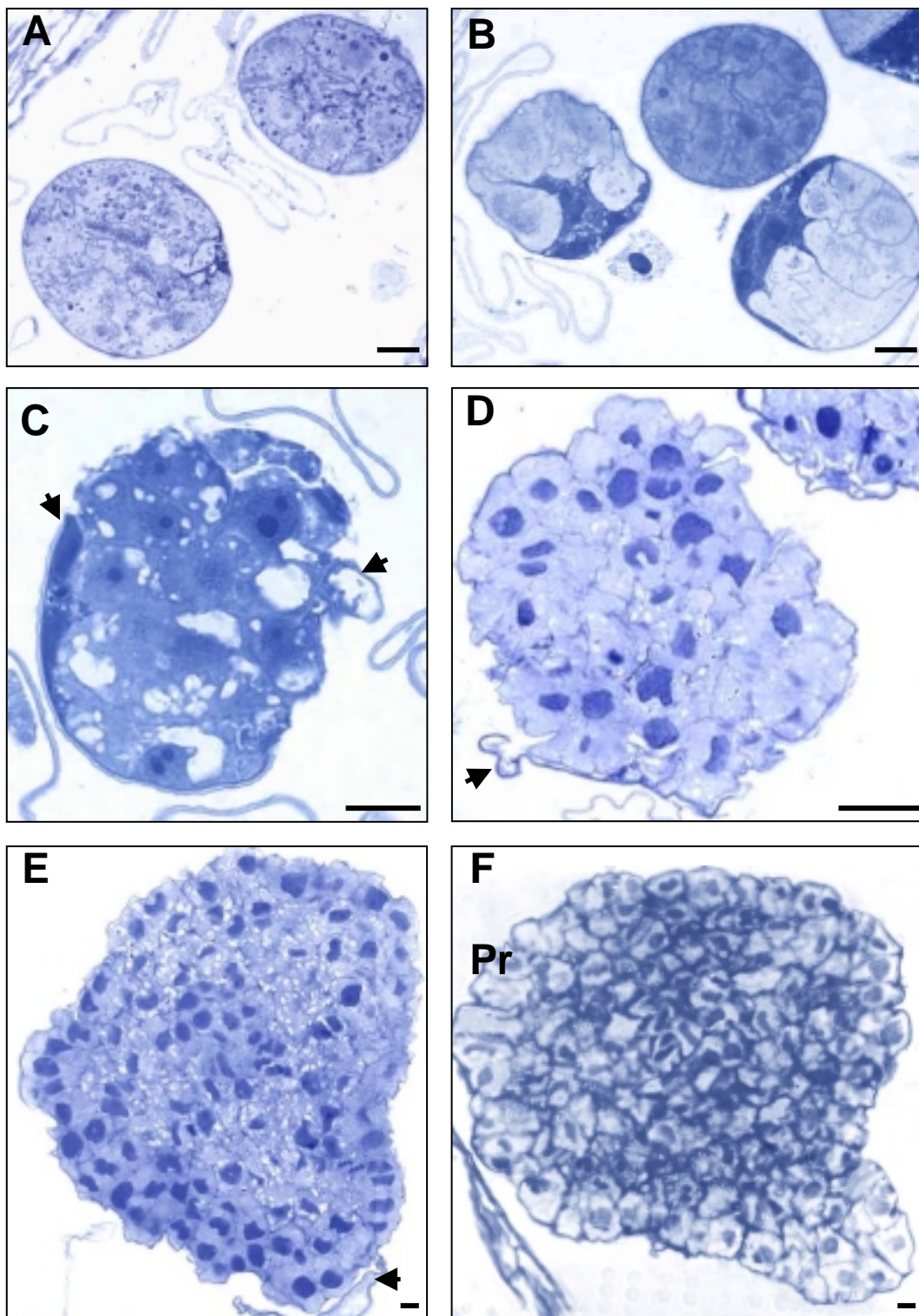


Fig. 9

Después de 9 días de cultivo, el número de células y el tamaño de las estructuras multicelulares aumenta. En estos proembriones la pared aparecía generalmente rota (fig. 9D). En prácticamente todos los casos la ruptura ocurrió justo al lado de las células de citoplasma denso y se continuó después a lo largo del resto de la estructura multicelular. Tras 13 días de cultivo se observó que las estructuras multicelulares globulares empezaron a dar paso a un estructuras embrionarias bipolares con una forma semejante a la del embrión zigótico globular avanzado con forma de bate o pera (figs. 9E y F). En estos embriones más avanzados nunca se observó el tipo celular con citoplasma denso, sólo se encontraban células de citoplasma poco denso. Las estructuras embrionarias más avanzadas mostraban claramente algunos signos de diferenciación como la presencia en su capa más externa de unas células de morfología semejante a las que integran la protodermis en el embrión zigótico (fig 9F).

Fig. 10. Cultivo durante tres, seis y nueve días (C3, C6 y C9) de microsporas aisladas tras la inducción androgénica.

Figs. **A-G:** Secciones semifinas teñidas con azul de toluidina. Figs. **A-D.** Cultivo de microsporas aisladas durante tres días (C3). **A:** Polen bicelular resultado probablemente de una división simétrica. **B:** Polen bicelular en el que una de las células, la más vacuolada (estrella blanca) parece tener el citoplasma mucho más denso que la otra. **C y D:** granos multicelulares con distinto número de células y vacuolas (estrella blanca) de diferente tamaño.

Fig. **F:** Cultivo de microsporas aisladas durante nueve días (C9). Grano multicelular heterogéneo en el que comienza la ruptura de la pared del polen en las células de citoplasma más denso (puntas de flecha), dispersión en el lóbulo de la antera del material de estas células.

Fig. **E y G:** Cultivo de microsporas aisladas durante seis días (C6). **E:** Grano de polen multicelular heterogéneo en el que la pared se conserva íntegra. **G:** Vista general en la que prácticamente todos los granos multicelulares son de tipo homogéneo, otras microsporas parecen no haber reaccionado a la inducción androgénica (punta de flecha), estar a penas empezando a dividirse (estrella negra) o muriendo (M).

Las barras representan 10 μm salvo que se indique otro valor.

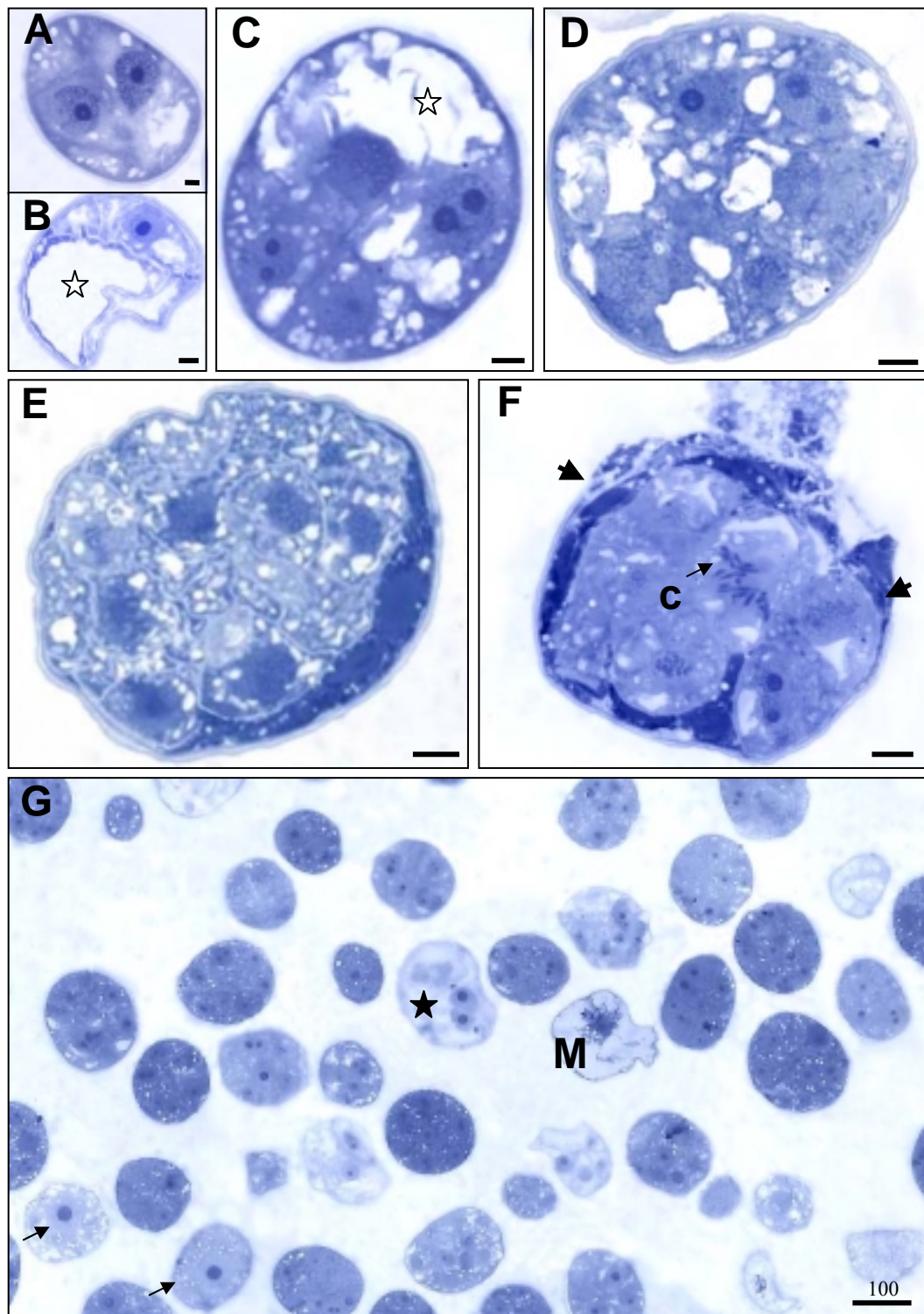


Fig. 10

3.2.2. Cultivo de microsporas.

Cuando estudiamos las microsporas aisladas cultivadas tras el pretratamiento de manitol (figs. 10 y 11) observamos resultados muy similares a los descritos para el cultivo de anteras. A pesar de que tras el pretratamiento con manitol las microsporas fueron aisladas y purificadas mediante un gradiente de maltosa, no se consiguió ni homogeneizar ni sincronizar la respuesta. Así, tras tres días de cultivo (C3) se observaron granos multicelulares con diferente número de células junto con otros que no habían respondido a la inducción y otros que justo estaban sufriendo la primera división simétrica (fig. 10A). También se observaron algunos granos que parecían proceder de una división asimétrica (fig. 10B) en los que las células procedentes de la célula con un citoplasma más denso, semejante al de la célula generativa del polen bicelular, presentaban grandes vacuolas. Estas vacuolas, ya descritas en el cultivo de anteras, también estaban presentes durante los primeros días del cultivo de microsporas aisladas (figs. 10B-D) y se reabsorbían conforme aumentaba el tiempo en cultivo.

Fig. 11. Cultivo durante nueve y dieciocho días (C9 y C18) de microsporas aisladas tras la inducción androgénica.

Figs. **A-C:** Secciones semifinas teñidas con azul de toluidina.

Figs. **A y B:** Cultivo de microsporas aisladas durante nueve días (C9). **A:** Estructura embriogénica semejante a la fase globular del embrión zigótico, restos de pared del polen aún visible y ruptura por células de citoplasma más denso (flechas abiertas). **B:** Inicio de la polarización de la estructura embriogénica con restos de células de citoplasma denso (flecha abierta).

Fig. **C:** Cultivo de microsporas aisladas durante dieciocho días (C18). Estructura embrionaria más avanzada con claros signos de diferenciación, células meristemáticas (Me) y células de la protodermis (Pr)

Las barras representan 10 μm salvo que se indique otro valor.

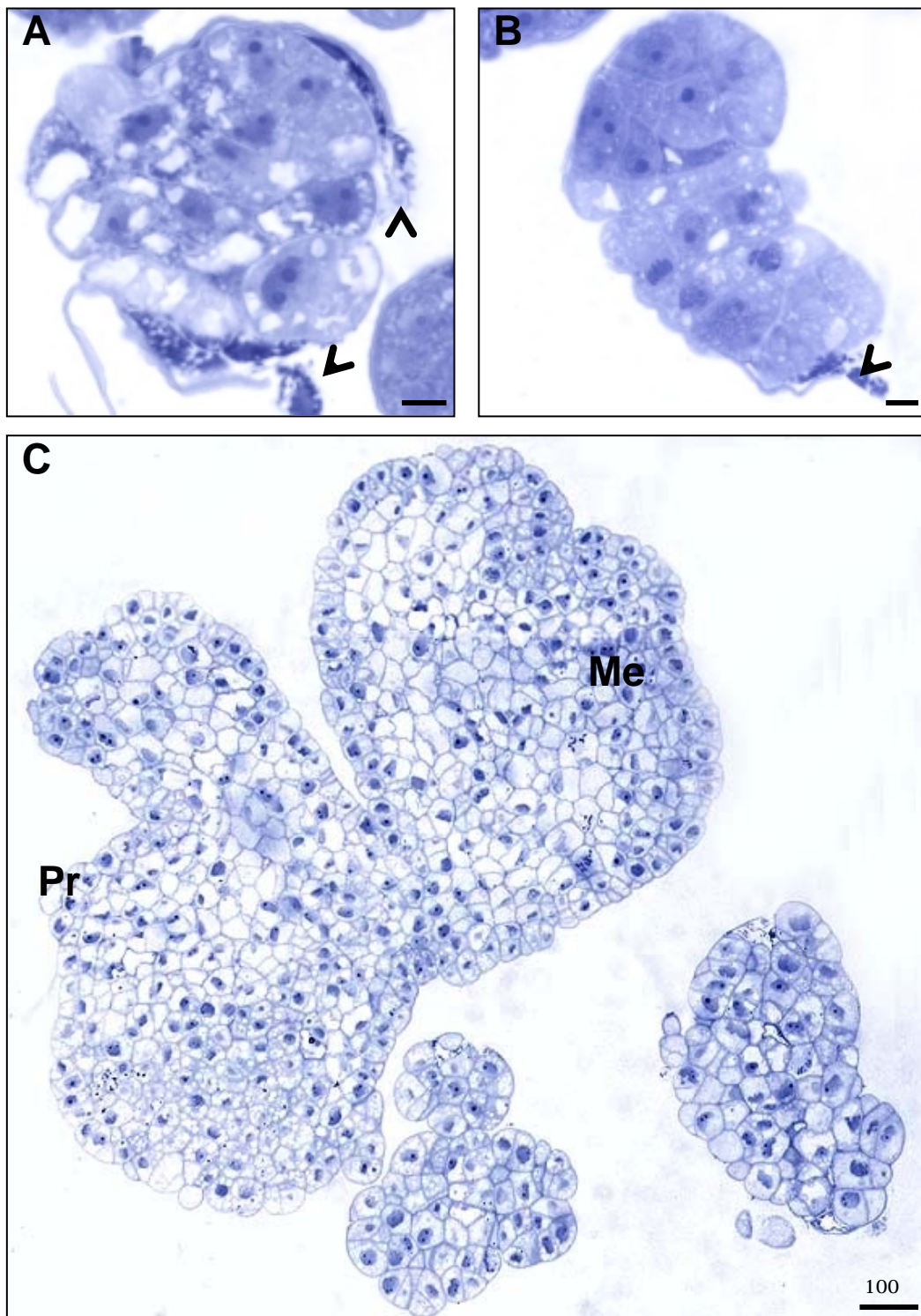


Fig. 11

Tras 6 días de cultivo (C6) la respuesta siguió sin ser homogénea ni sincrónica (fig. 10G). Así se observaban granos multicelulares con distinto número de células junto con microsporas unicelulares cuyo citoplasma normalmente presentaba una gran cantidad de almidón y otras que parecían vacías o muertas. Los granos multicelulares tras 6 días de cultivo, aunque algunas veces eran heterogéneos (fig. 10E), en su mayoría eran granos homogéneos (fig. 10G). Sin embargo, tras 9 días de cultivo las estructuras multicelulares en las que se estaba rompiendo la pared eran, al igual que ocurría en el cultivo de anteras, mayoritariamente heterogéneas (figs. 10F y 11A y B) y la pared también se rompía justo donde se encontraban las células de citoplasma más denso que parecía salir al lóculo de la antera. Algunas de estas estructuras embrionarias empiezan a presentar cierta polaridad (fig. 11B). Tras 18 días de cultivo se obtuvieron embriones con un número mucho mayor de células que poseían evidentes signos de diferenciación con células de tipo meristemático y células semejantes a la de la protodermis zigótica (fig 11C).

Fig. 12. Cuerpos proteicos.

Figs. **A-E**: Secciones semifinas de cultivos tanto de anteras como de microsporas aisladas. **A** y **C**: Tinción con azul de toluidina preferencial para proteínas. Secciones de cultivo de microsporas después de 13 (C13) y dieciocho (C18) días de cultivo repectivamente, estructuras embriogénicas en las que se observan cuerpos proteicos teñidos de azul (puntas de flechas). **B**, **D** y **E**: Tinción con el método de la cloramina T-reactivo de Schiff para proteínas, cuerpos proteicos teñidos de rosa intenso (puntas de flechas). **B**: Cultivo de anteras después de 6 días (C6), **D** y **E**: cultivo de microsporas aisladas después de 13 (C13) y 18 días (C18)respectivamente.

Las barras representan 20 μ m salvo que se indique otro valor.

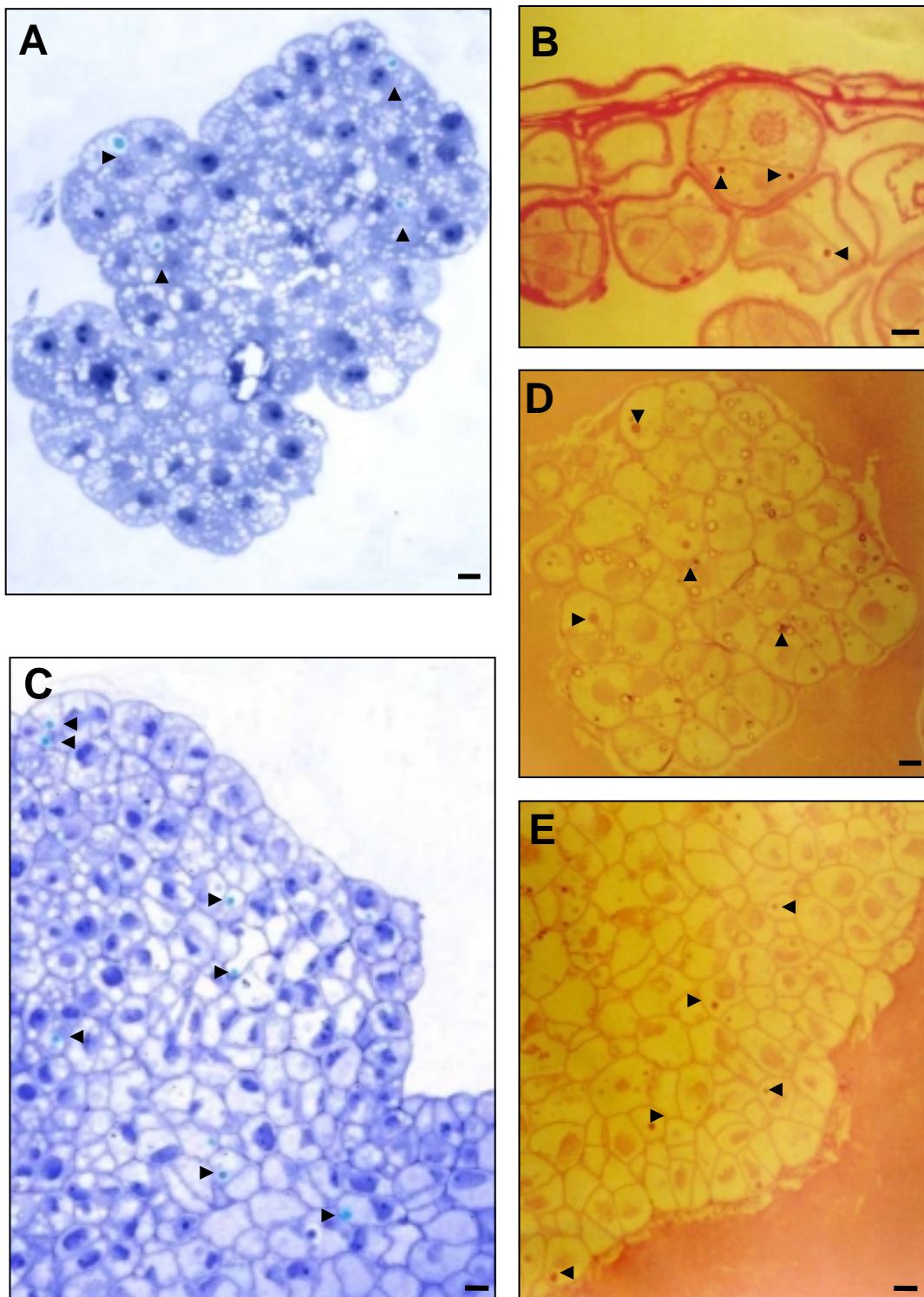


Fig. 12

3.2.3. Cuerpos proteicos durante el desarrollo androgénico.

Para seguir la evolución de las microsporas en la androgénesis obtenida tanto mediante cultivo de anteras como de microsporas aisladas se utilizaron secciones semifinas que fueron teñidas con azul de toluidina. Esta técnica colorea de azul preferentemente las proteínas. En los granos de polen multicelulares obtenidos en la androgénesis observamos con esta técnica lo que parecían ser cuerpos proteicos (fig. 12). Estos cuerpos, presentes a partir de 6 días de cultivo androgénico tanto en cultivos de anteras como de microsporas aisladas, poseían una forma redondeada y presentaban con esta tinción una coloración azul turquesa, clara y brillante (Fig. 12A y C). Los cuerpos se localizaban en el citoplasma, algunas veces en el interior de vacuolas y estaban presentes a lo largo de las primeras etapas del desarrollo de los proembriones androgénicos a partir de 6 días de cultivo, tras 9, 13 y 18 días de cultivo. Para asegurarnos de que eran efectivamente cuerpos proteicos se realizó una tinción citoquímica específica para proteínas, el método de la cloramina T-reactivo de Schiff. Esta citoquímica nos mostró que los cuerpos que encontrábamos presentaban el color rosa intenso que presentan las proteínas con esta citoquímica (fig. 12B, D y E).

Fig. 13. Grado de ploidía.

Figs. **A-D**: Secciones semifinas de cultivos después de 6 días (C6) tanto de anteras como de microsporas aisladas teñidas con azul de toluidina, las estructuras cromosómicas (c) son bien visibles así como los nucleolos (Nu). **A** y **C**: cultivo de microsporas. **B** y **D**: cultivo de anteras

Fig. **E**: Tinción con DAPI para ADN en aplastado cultivo de microsporas (C6) en el que los nucleolos (Nu) se muestran como áreas claras en el núcleo.

Figs. **F** y **G**: Cortes ultrafinos contrastados con Ur-Pb cultivos después de 6 días (C6) mostrando núcleos interfásicos con más de dos nucleolos (Nu). **F**: cultivo de microsporas. **G**: Cultivo de anteras.

Las barras representan 10 μm salvo que se indique otro valor.

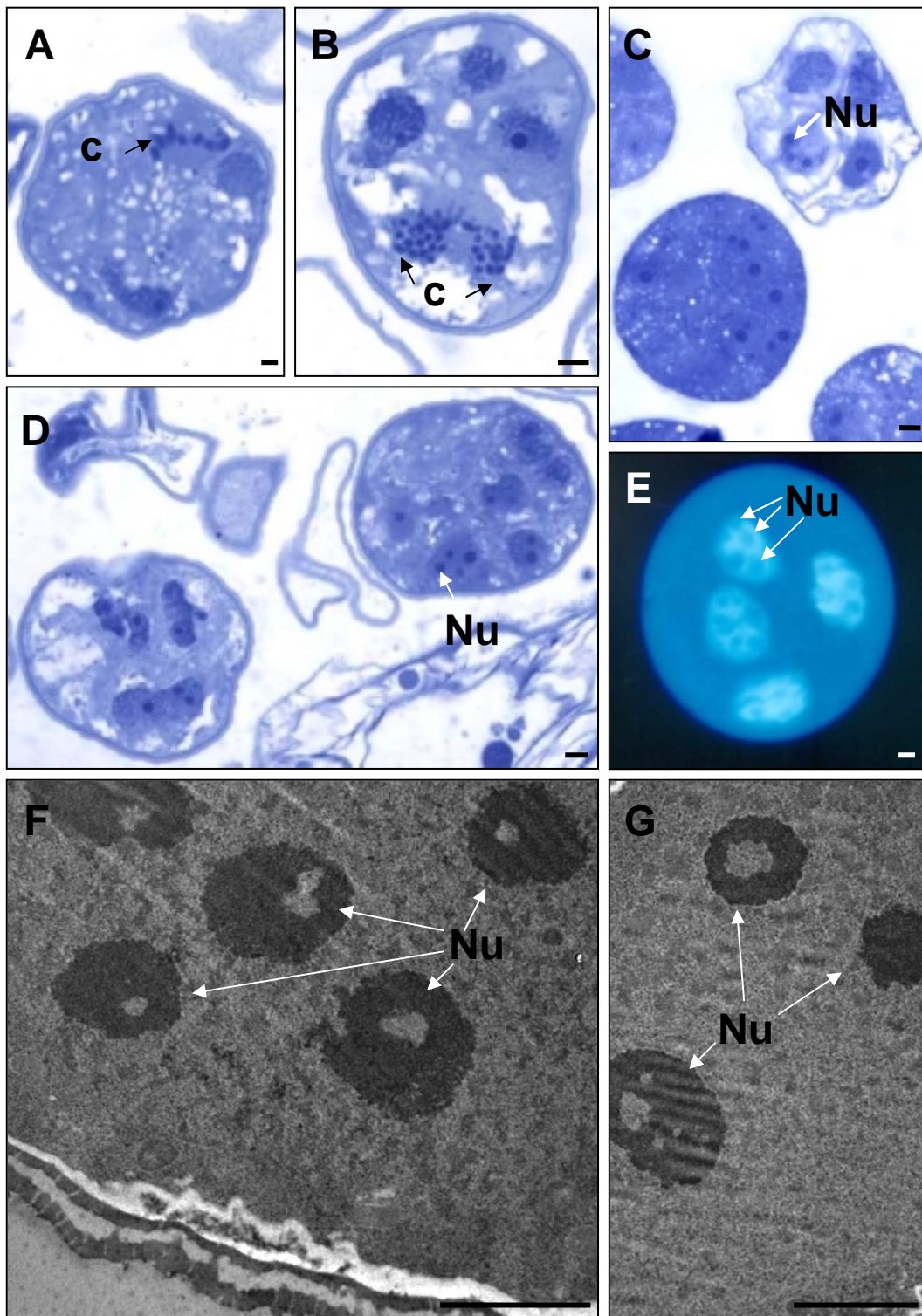


Fig.13

3.2.4. Ploidía durante el desarrollo androgénico.

Estudiando las estructuras multicelulares generadas tras la inducción androgénica (en cultivo de anteras y microsporas aisladas) se encontraron en muchas ocasiones células en división. Estas células permitían distinguir los cromosomas bien patentes. El número de cromosomas visibles en una sección semifina era la mayor parte de las veces igual o menor que 7 (fig. 13A). Sin embargo, se encontraron casos en los que los cortes de las células en división parecían mostrar un número mayor de cromosomas lo que podría ser indicio de un mayor grado de ploidía (fig. 10F y 13B). Teniendo claro que no era posible sacar conclusiones sobre la ploidía de estas células sólo a partir del número de cromosomas que se pudieran contar en secciones semifinas buscamos otros posibles indicadores que apoyaran esta información. Por ello consideramos además el número de nucleolos presentes en los núcleos de células en interfase (figs 13C-G). Los núcleos de cebada tienen sólo 2 organizadores nucleolares por lo que como máximo estas células deberían tener dos nucleolos. Al estudiar las estructuras multicelulares de cultivos de a partir de 6 días (C6) en secciones semifinas teñidas con azul de toluidina, encontramos que en algunas de ellas las células interfásicas tenían 3, 4 y hasta 5 nucleolos (figs. 13C y D). Además, el número de nucleolos de las distintas células que constituían un mismo grano multicelular no era constante y mientras que en algunas células sólo se distinguían 1 o dos nucleolos, existían otras con 4 o 6. En todos los casos hay que tener en cuenta que estábamos estudiando secciones por lo que cabía la posibilidad de que hubiera más nucleolos no visibles en otro plano. Lo mismo ocurría al estudiar cortes ultrafinos de estos granos multicelulares (figs. 13F y G).

Por otro lado, la tinción con DAPI realizada sobre la célula entera en aplastado también si nos permitió calcular exactamente el número de nucleolos en un núcleo ya que éstos, a diferencia del resto del núcleo, no

presentaban fluorescencia. La tinción con DAPI permitió contar 4 o 6 nucleolos en los núcleos de las distintas células que formaban los granos multicelulares (fig. 13E). Además a diferencia de lo que ocurría en secciones tanto semi como ultrafinas aquí el número de nucleolos era prácticamente igual en todas las células que constituían el mismo grano multicelular.

4. CAMBIOS ULTRAESTRUCTURALES Y CARACTERIZACIÓN DE LA PARED CELULAR DURANTE LA INDUCCIÓN Y LAS PRIMERAS ETAPAS DE LA ANDROGÉNESIS.

Para proseguir nuestro análisis de la inducción y primeras etapas de la androgénesis se realizó un estudio de la ultraestructura de las anteras y microsporas antes y después de los pretratamientos de inducción con manitol y tras 3, 6, 9 y 13 días de cultivo en los respectivos medios (figs. 14-18). La observación de los cortes ultrafinos bajo el microscopio electrónico de transmisión de las anteras control (A0), es decir de las microsporas que estaban en la fase óptima para la inducción androgénica, mostraba que en estas microsporas la exina estaba totalmente formada. El citoplasma que presentaba mitocondrias, plastidios y numerosos ribosomas estaba ocupado fundamentalmente por una gran vacuola que desplazaba al núcleo a un extremo de la misma. En el núcleo, la cromatina comenzaba a condensarse y el nucleolo, fundamentalmente formado por componente fibrilar denso, presentaba centros fibrilares homogéneos y pequeñas vacuolas (fig. 14A).

Tras el pretratamiento de inducción con manitol (A3 o A4) o con frío (F15), las microsporas perdían su redondez inicial como se ha mostrado en las imágenes al microscopio óptico (figs. 5D y E) y en general presentaban una ultraestructura muy alterada.

Los granos de polen multicelulares obtenidos tras 3 días de cultivo (C3) tanto de anteras como de microsporas aisladas, presentaban un citoplasma más rico con una gran abundancia de orgánulos. En algunas ocasiones se observaban amiloplastos. Además, eran visibles dictiosomas, numerosas vesículas, gran cantidad de ribosomas y de retículo endoplásmico. Destacaba también el gran número de mitocondrias que aparecían alrededor del núcleo y cerca de la pared celular (figs. 14B y C).

Entre los granos de polen multicelulares obtenidos tras 6 días de cultivo (C6) en cultivo de anteras y en cultivo de microsporas aisladas, encontramos una gran mayoría de los que hemos denominado homogéneos, es decir, formados por células iguales entre si (fig. 15A) y algunos de los que hemos llamado heterogéneos, formados por dos tipos celulares diferentes (figs. 15C-F). Las células de citoplasma menos denso tanto de los granos homogéneos como de los heterogéneos tenían el aspecto de células meristemáticas típicas con un citoplasma rico y conectadas entre si por numerosos plasmodesmos (fig. 14D). Sus núcleos presentaban una cromatina bastante descondensada y contenían, en general, uno o dos nucleolos (fig 15A) sin embargo, como ya se ha descrito, existían también algunas células de granos multicelulares que poseían más nucleolos, a veces hasta 5 eran visibles en un corte ultrafino (figs. 13F y G, 15C).

Fig. 14. Cultivo de anteras observadas al microscopio electrónico

Figs. **A-D:** Cortes ultrafinos contrastados con Ur-Pb.

A: Microsporas antes de haber sido sometida a ningún tratamiento de inducción (A0). Micropora vacuolada avanzada constituida por una gran vacuola (V) que relega al núcleo (N) a uno de los extremos de la misma, con la exina bien formada (Ex) y la intina apenas visible bajo la exina.

Figs. **B y C:** Cultivo de anteras después de 3 días (C3). **B:** Polen multicelular, se distinguen tres células. **C:** detalle a mayor aumento donde se pone de manifiesto la gran riqueza en orgánulos del citoplasma de éstas células, se distinguen: mitocondrias (m), dictiosomas (dc), plastidios con almidón (al), retículo endoplásmico rugoso (flechas) así como numerosos ribosomas.

Fig. **D:** Cultivo de anteras después de 6 días (C6). Detalle de grano multicelular en el que se distinguen numerosos plasmodesmos (P) conectando las células que lo constituyen.

Las barras representan 2 μ m

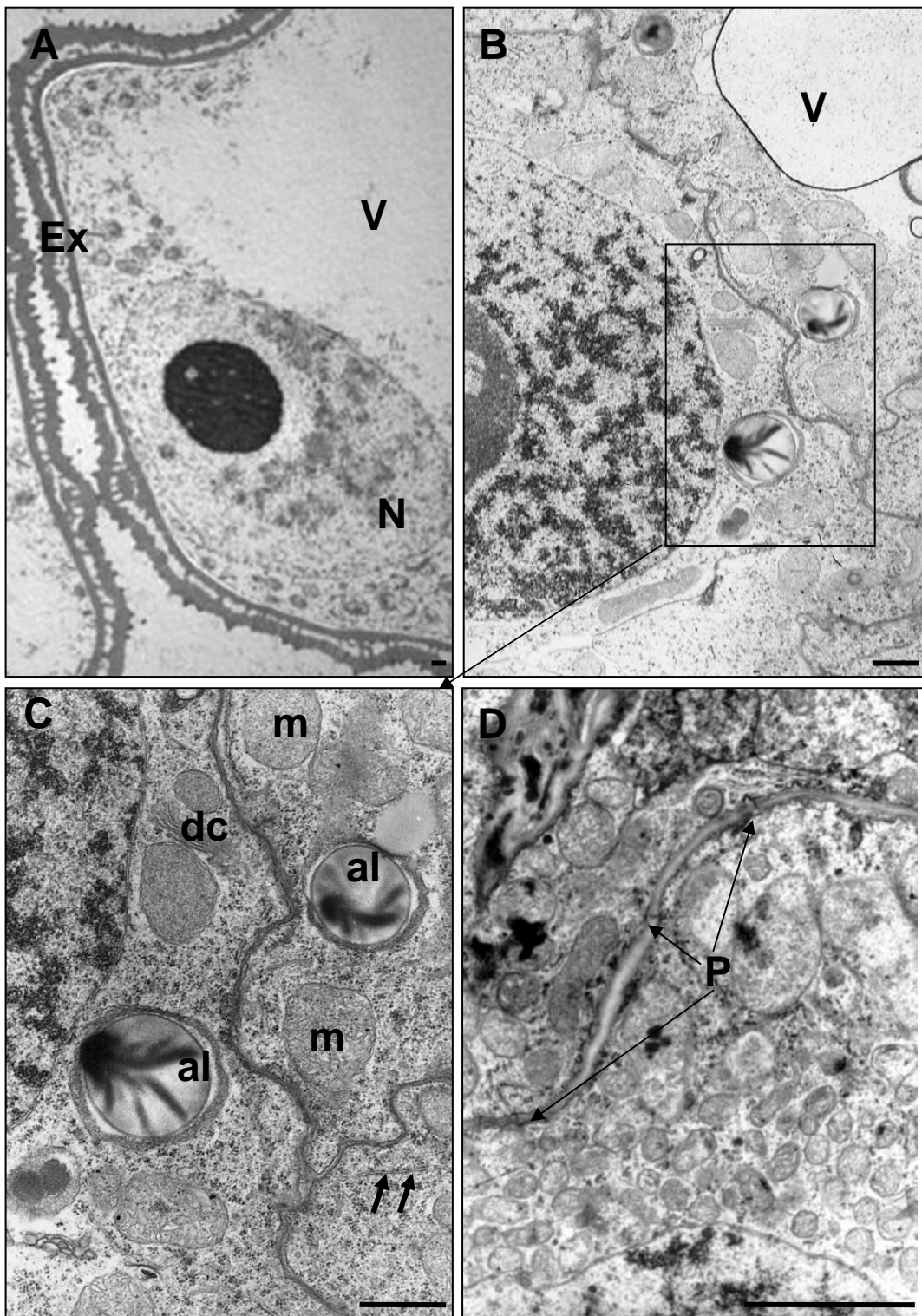


Fig. 14

En los granos multicelulares heterogéneos, las células de citoplasma muy denso se encontraban normalmente en la periferia (figs. 15C y D), sin embargo, en ocasiones, era posible observar este tipo celular en el interior del grano (fig. 15 E) lo que hacía pensar en invaginaciones de este tipo celular dentro de las células de citoplasma menos denso. Estas células de citoplasma más denso poseían siempre un núcleo muy lobulado (fig. 15E) con una cromatina muy condensada y en el que destacaba también la presencia de abundantes granos inter y pericromatínicos (fig. 15 E). La cromatina aparece blanqueada como ocurre en algunos casos al procesar el material para Unicryl.

La pared de la microspora se mantenía intacta en estos granos multicelulares (fig.15A) igual que ocurría en C3, pero en C6 ya se observaban casos en los que esta pared se rompía. La mayoría de los granos multicelulares con la pared rota eran heterogéneos y, en general, la ruptura se producía justo donde se encontraban las células de citoplasma más denso (fig. 15D) aunque también encontramos algunos ejemplos en los que la pared se rompía en la zona de células con citoplasma menos denso (fig. 15 B).

Fig. 15. Cultivo de microsporas aisladas observado al microscopio electrónico. Figs. **A-F:** Cortes ultrafinos contrastados con Ur-Pb de cultivos de 6 días de duración (C6). Figs. **A y B:** Granos de polen multicelulares de tipo homogéneo constituido por células del mismo tipo. **A:** Grano multicelular con pared intacta, la exina (Ex) bien visible todo alrededor del grano lo mismo que la intina (I), cromatina blanqueada por efecto de la inclusión. **B:** Grano multicelular con la pared rota en la zona de células semejantes a las que constituyen los granos homogéneos, el citoplasma sale al exterior del grano. Figs. **C-F:** Granos multicelulares de tipo heterogéneo constituidos por células de dos tipos: unas son semejantes a las que constituyen los granos homogéneos y otras de citoplasma más denso situadas en la periferia (estrellas). **C:** Granos con pared intacta y células homogéneas con más de dos nucleolos (Nu). **D:** Granos con pared rota en la zona de las células de citoplasma más denso (estrellas). **E:** Células de citoplasma más denso (estrellas) en el interior del grano. **F:** Detalle del núcleo de una célula densa con las masas de cromatina (blanqueada) muy condensada (Cr) rodeadas por numerosos granos inter y pericromatínicos. Nucleolo (Nu) de aspecto muy irregular constituido fundamentalmente por componente fibrilar denso. Las barras representan 2 μm

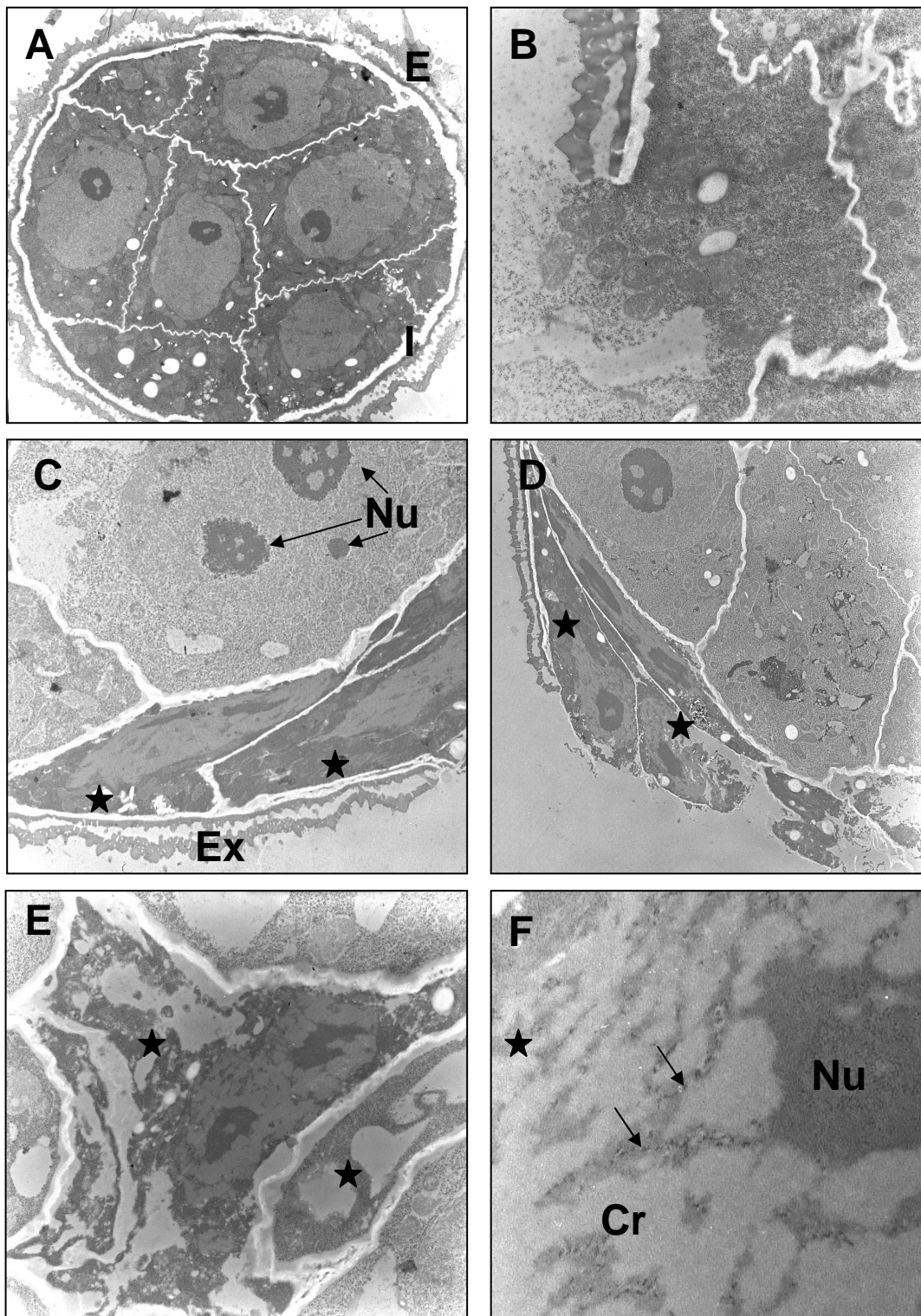


Fig. 15

Tras nueve y trece días de cultivo se encontraban granos multicelulares de los dos tipos descritos junto con estructuras de aspecto más parecido a los embriones zigóticos en etapas tempranas de desarrollo. Los casos de granos multicelulares con paredes rotas se hacían mucho más abundantes y a medida que se alargaba el tiempo en cultivo sólo se observaba algún resto de pared y las células de citoplasma más denso iban siendo más raras.

Fig. 16. Ultraestructura paredes. Cultivo de anteras.

Figs. **A-C:** Cortes ultrafinos contrastados con Ur-Pb de cultivos de 3 días de duración (C3). **A:** Aspecto de la pared de un grano de polen embriogénico multicelular; la exina (Ex) se conserva como en las microporas sin tratar (A0) pero la intina presenta un engrosamiento muy acusado (I). **B:** Pared lateral formándose a partir del fragmoplasto entre dos células recién divididas (flechas negras). **C:** Pared lateral (flechas blancas) en contacto directo con la intina (I).

Las barras representan 1 μm

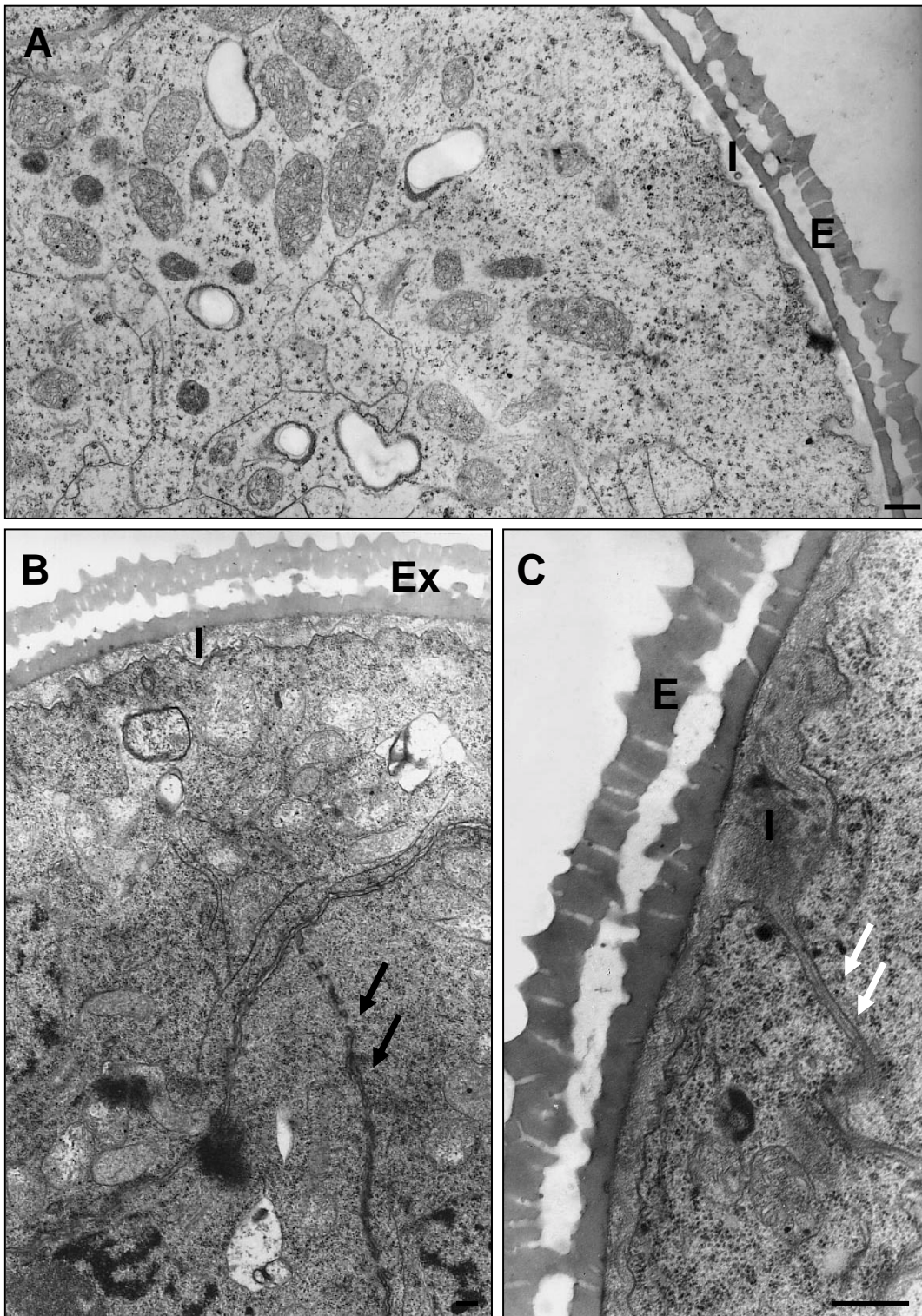


Fig. 16

4.1. La pared celular en androgénesis inducida mediante cultivo de anteras.

La pared celular ejerce un papel muy importante en los procesos de división, elongación y comunicación célula-célula por lo que tiene importantes implicaciones en la embriogénesis y por tanto en la androgénesis. Las microsporas vacuoladas tienen una pared en la que se puede distinguir la exina extremadamente electrondensa y la intina (fig. 14A). Cuando estudiamos las microsporas de anteras que habían sido sometidas al pretratamiento en manitol (A4), observamos que las paredes que las rodeaban sufren un engrosamiento en la intina (fig. 16). Este engrosamiento, permaneció visible mientras la pared de la microspora estuvo presente en los granos de polen multicelulares resultado de la inducción. Todas las microsporas de una antera no se comportaban igual pero la ruptura de la pared se iniciaba tras 6 días de cultivo (C6) y en cultivos más avanzados (C13) la pared de la microspora prácticamente había desaparecido de las estructuras multicelulares.

Las paredes que separaban las células que formaban los granos de polen multicelulares presentaban numerosos plasmodesmos (fig. 14D). Estas paredes se formaban a partir de la placa celular (fig. 16B). Sin embargo, en ocasiones, observamos algunas paredes que parecían formarse como una prolongación de la intina (Fig. 16C).

Fig. 17. Ultraestructura paredes. Cultivo de anteras y microsporas aisladas (C6). Figs. **A-C:** Cortes ultrafinos contrastados con Ur-Pb. **A:** Microsporas sin tratar (A0) en la que se observa la exina (Ex) y la intina es a penas visible. **B:** Grano multicelular obtenido tras cultivo de anteras en el que se observa la intina (I) engrosada. **C:** Polen multicelular obtenido tras cultivo de microsporas aisladas presentando también un engrosamiento en la intina (I) en la que aparecen unos precipitados densos a los electrones (flechas). Las barras representan 1 μm

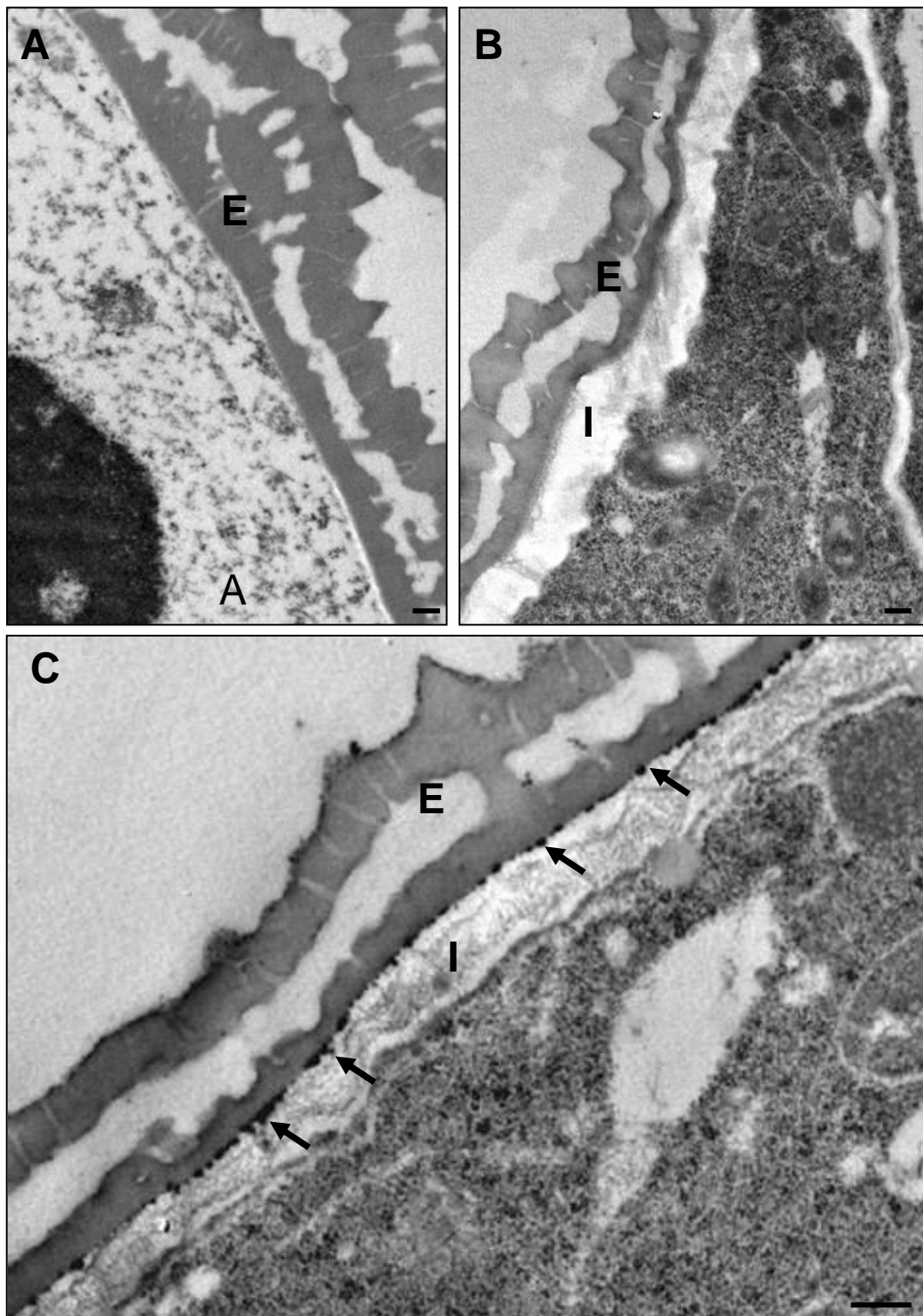


Fig. 17

4.2. La pared celular en androgénesis inducida mediante cultivo de microsporas.

La pared de los granos de polen embriogénicos obtenidos mediante cultivo de microsporas aisladas presentaba, como en el caso de los obtenidos mediante cultivo de anteras, un engrosamiento en la intina que se hacía patente desde el pretratamiento con manitol (A3) y permanecía tras 3, 6 y 9 días de cultivo, mientras era posible detectarla (figs. 17 y 18). Sin embargo, en la parte más externa de la intina de la pared de los granos multicelulares obtenidos tras 3 días de cultivo de microsporas aisladas aparecían además unos depósitos densos a los electrones (fig. 17C) que no eran visibles en la intina de los obtenidos mediante cultivo de anteras (fig. 17B). Estos precipitados no estaban presentes en ninguna microspora ni antes (A0) ni justo después de la inducción (A3). Además, estaban presentes en aquellas microsporas que parecían vivas pero no se observaban en las vacías o muertas. Los depósitos se mantenían a lo largo de las primeras etapas del desarrollo de los granos embriogénicos tras 3 (fig. 18A), 6 (fig. 18B), 9 (fig. 18C) e incluso 13 días de cultivo (fig. 18D) en todas aquellas estructuras multicelulares en las que la pared de la microspora estuviera todavía presente aunque fuera ya fragmentada.

Fig. 18. Depósitos de las paredes de los granos de polen embriogénicos obtenidos mediante cultivo de microsporas aisladas. Figs. **A-D**: Cortes ultrafinos contrastados con Ur-Pb. **A**: Cultivo de 3 días de duración (C3), grano multicelular con la intina (I) engrosada en donde observan depósitos densos a los electrones (flechas) **B**: Cultivo de 6 días de duración (C6) polen multicelular en el que se distinguen depósitos densos (flechas) tanto en la intina (I) como en las paredes de las células que lo integran. **C**: Cultivo de 9 días de duración (C9) grano multicelular de tipo heterogéneo en el que la pared del mismo está rota pero los depósitos de la intina (flechas) son aún visibles. **D**: Cultivo de 13 días de duración (C13) en el que además de los proembriones más desarrollados se encuentran también granos multicelulares menos avanzados en los que en la zona apertural (Ap) se detectan los depósitos densos (flechas). Las barras representan 1 μ m

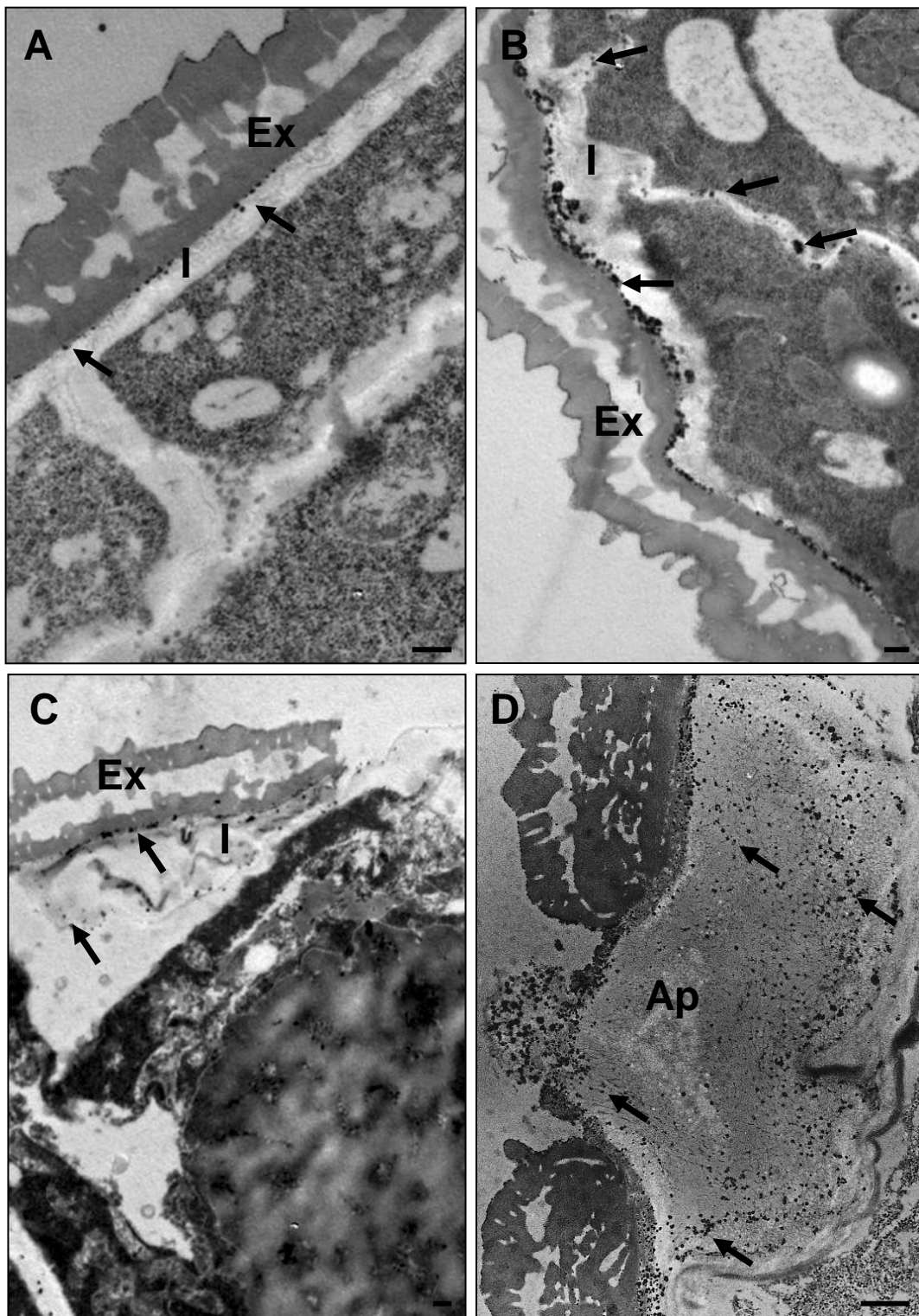


Fig. 18

Depósitos similares eran visibles también en las paredes que separaban las células de los granos multicelulares tanto homogéneos como heterogéneos cuando estas paredes estaban en contacto directo con la intina (fig. 18B). Las aperturas de los granos de polen embriogénicos también presentaban también gran cantidad de estos depósitos (fig. 18D).

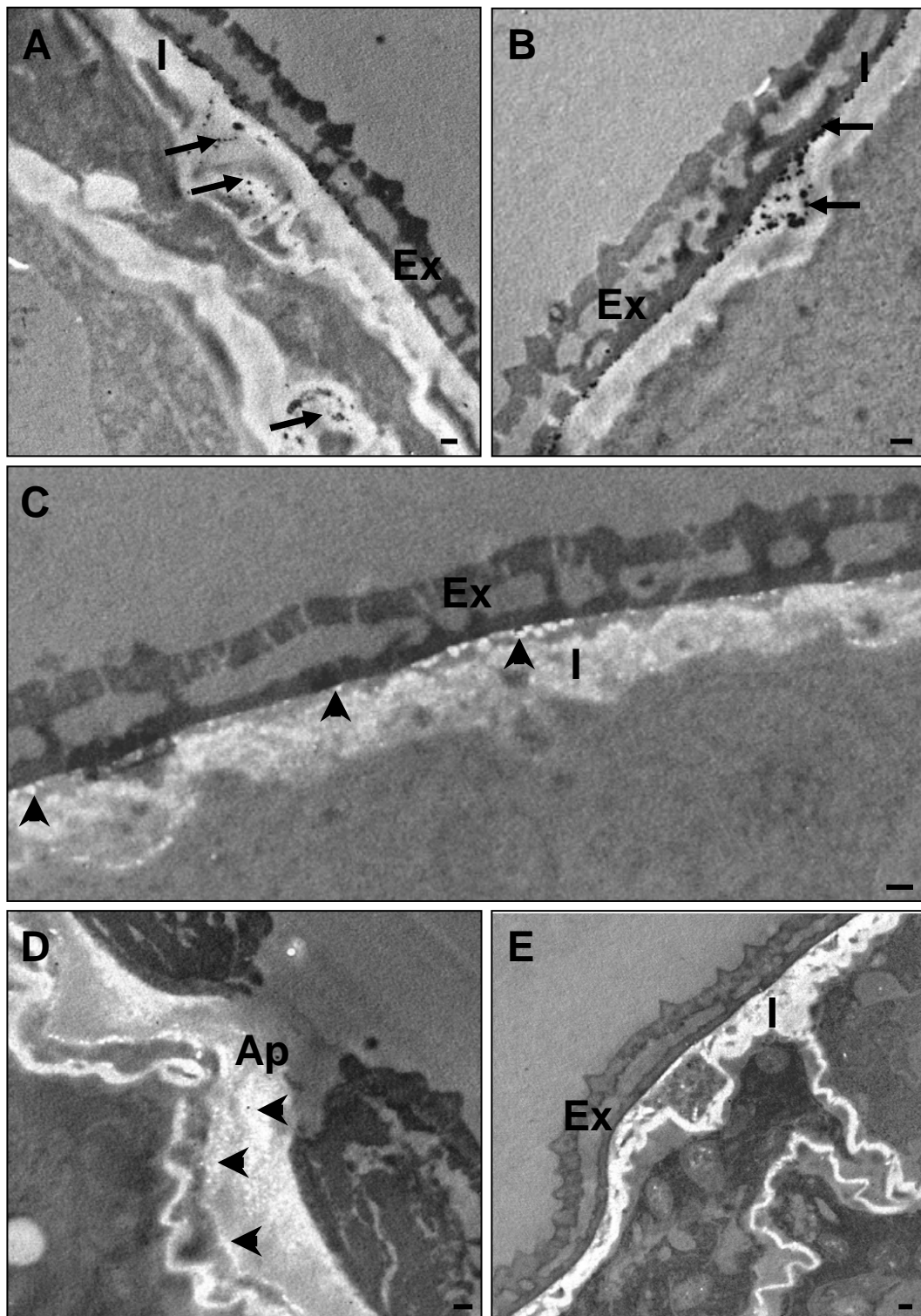
4.3. Determinación de la naturaleza de los precipitados presentes en la pared celular durante la androgénesis inducida mediante cultivo de microsporas aisladas.

Con el fin de conocer la naturaleza de estos depósitos se realizaron distintas pruebas citoquímicas.

4.3.1. Tratamiento con proteinasa K.

Para saber si los depósitos de la pared de los granos embriogénicos que se producían tras el cultivo de microsporas aisladas tenían carácter proteico las muestras se trataron con altas concentraciones de proteinasa K. Los resultados de estas digestiones aplicadas después de distintos días de cultivo (C3, C6, C9 y C13) mostraron que los depósitos permanecían intactos tanto en la intina como en las paredes laterales donde estaban presentes (figs. 19A y B).

Fig. 19. Tratamientos con proteinasa K y EDTA. Ultraestructura paredes. Cultivo de microsporas aisladas. Figs. **A-B:** Cortes ultrafinos tratados con proteinasa K. **A:** Cultivo de 9 días de duración (C9) grano multicelular en el que los cúmulos de material denso a los electrones (flechas) siguen siendo visibles después del tratamiento con la enzima tanto en la intina (I) como en las paredes laterales. **B:** Cultivo de 3 días de duración (C3) grano con depósitos (flechas) en la intina (I). Figs. **C-E:** Cortes ultrafinos tratados con EDTA. Cultivo de 9 días de duración (C9). **C:** Depósitos de la intina digeridos (puntas de flechas). **D:** Depósitos de la apertura (Ap) digeridos (puntas de flechas). **E:** Grano multicelular en el que no se observan depósitos electrodensos en ninguna pared. Las barras representan 1 μm



4.3.2. Tratamiento con EDTA.

Fig. 19

Para determinar si estos depósitos tenían carácter catiónico se trataron las muestras con EDTA. Cuando tras aplicar este tratamiento se observaron las muestras bajo el microscopio electrónico los depósitos habían desaparecido de la intina (fig. 19 C), paredes laterales (fig. 19 E) y las aperturas (fig. 19D).

4.3.3. Microanálisis de rayos X de los depósitos.

Para saber cual era el catión que quelaba el EDTA, nuestro siguiente paso fue estudiar mediante microanálisis de rayos X estos precipitados.

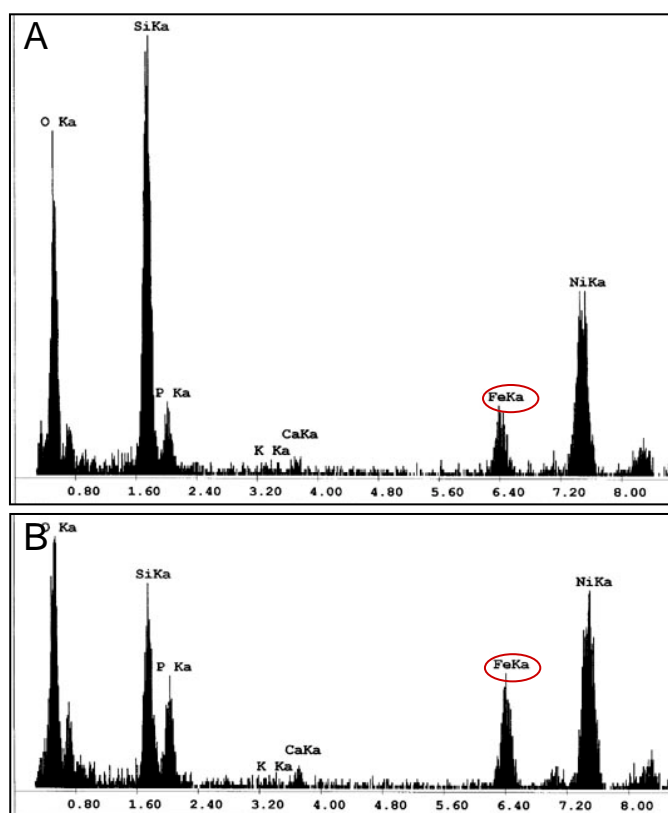
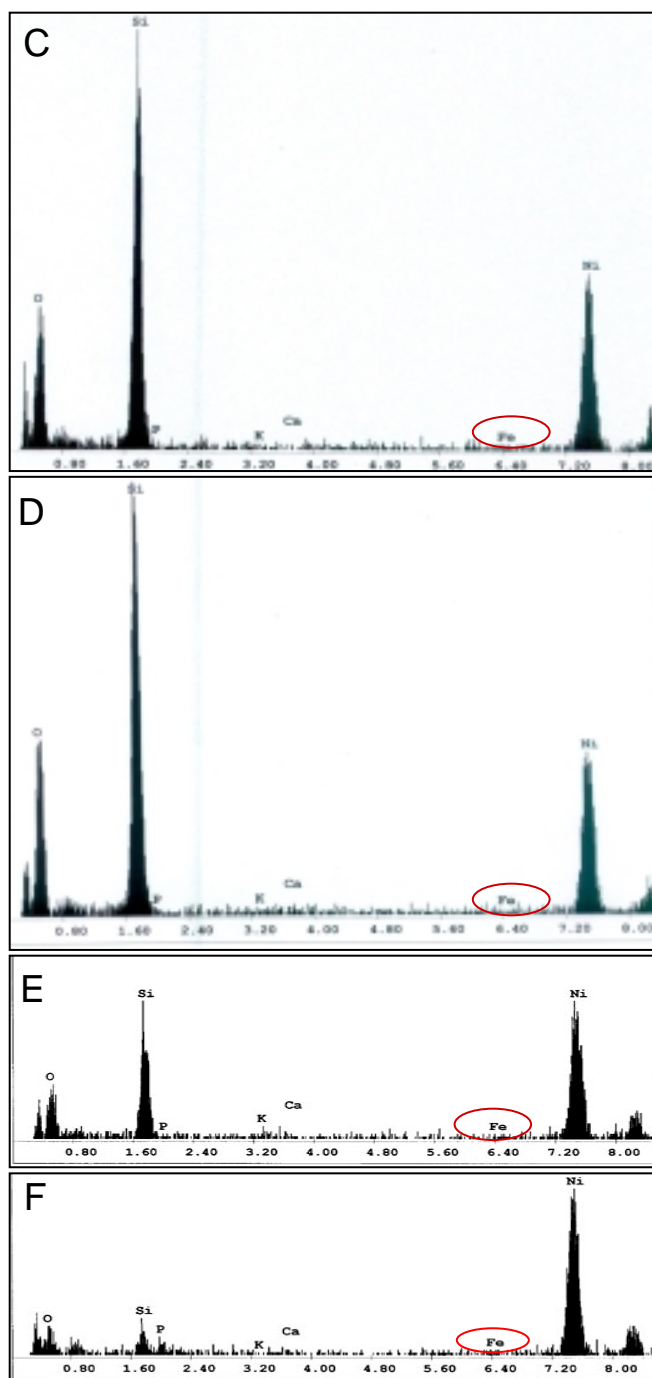


Fig. 20. Espectros de microanálisis de rayos X obtenidos usando microscopía electrónica de transmisión. Figs. **A-F**: Cultivo de microsporas aisladas de 9 días de duración (C9). Espectros de **A**: depósito denso en la intina, **B**: depósito en pared lateral, **C**: zona de la exina, **D**: zona de la intina sin depósitos, **E**: zona de la pared lateral sin depósitos y **F**: zona del citoplasma de un grano multicelular. (Escala vertical: 150).



La figura 20 representa algunos de los espectros más representativos de los obtenidos cuando se analizaron por microanálisis de rayos X distintos puntos de los granos multicelulares inducidos con el cultivo de microsporas aisladas.

En los espectros correspondientes a los depósitos densos a los electrones tanto en la pared del grano (intina) como de las paredes producto de las divisiones androgénicas se identificaron picos correspondientes a los elementos: O, Si, P, K, Ca, Fe y Ni (figs. 20A y B). El pico del Fe resultó ser el más característico de estos depósitos; los picos de Ca y K eran muy poco visibles mientras que los del O y Si eran muy evidentes. Por último, el del Ni correspondía a las rejillas sobre las que se depositaron los cortes para el análisis.

Cuando se analizaron zonas de la intina o de las paredes laterales que no contenían depósitos se observó que el pico correspondiente al Fe no estaba presente en los espectros correspondientes (figs. 20 D y E). Lo mismo ocurría en los espectros obtenidos en zonas tomadas al azar de la exina (fig. 20 C) o del citoplasma de las células que constituían los granos multicelulares (figs. 20 F).

Fig. 21. Cultivo de microsporas aisladas utilizando distintas concentraciones de Fe. Figs. **A-D:** Cortes ultrafinos contrastados con Ur-Pb. Ultraestructura de paredes. **A y B:** Microsporas cultivadas durante 6 días (C6) en un medio de cultivo con una concentración de Fe 2.5 veces superior a la utilizada al inicio para cultivo de anteras y de microsporas aisladas (40 mg/ml de FeNa₂ EDTA). **A:** Un buen número de granos multicelulares encontrados en estas condiciones presentan síntomas de degeneración celular, parecen estar muriendo. En la intina de estos granos son bien visibles un gran número de depósitos densos a los electrones (flechas negras). **B:** Los granos multicelulares con mejor aspecto también presentan depósitos densos a los electrones incluso en las paredes que separan las células que los componen (flechas negras). **C y D:** Microsporas cultivadas (C6) en un medio de cultivo sin Fe. **C:** Granos multicelulares con una intina (I) muy sinuosa pero que no presenta cúmulos de material denso a los electrones. **D:** Grano multicelular con la pared (exina (Ex), intina (I)) mejor conservada en la que no pueden verse depósitos densos a los electrones, las paredes laterales también están libres de depósitos (flechas blancas). Las barras representan 1 μ m

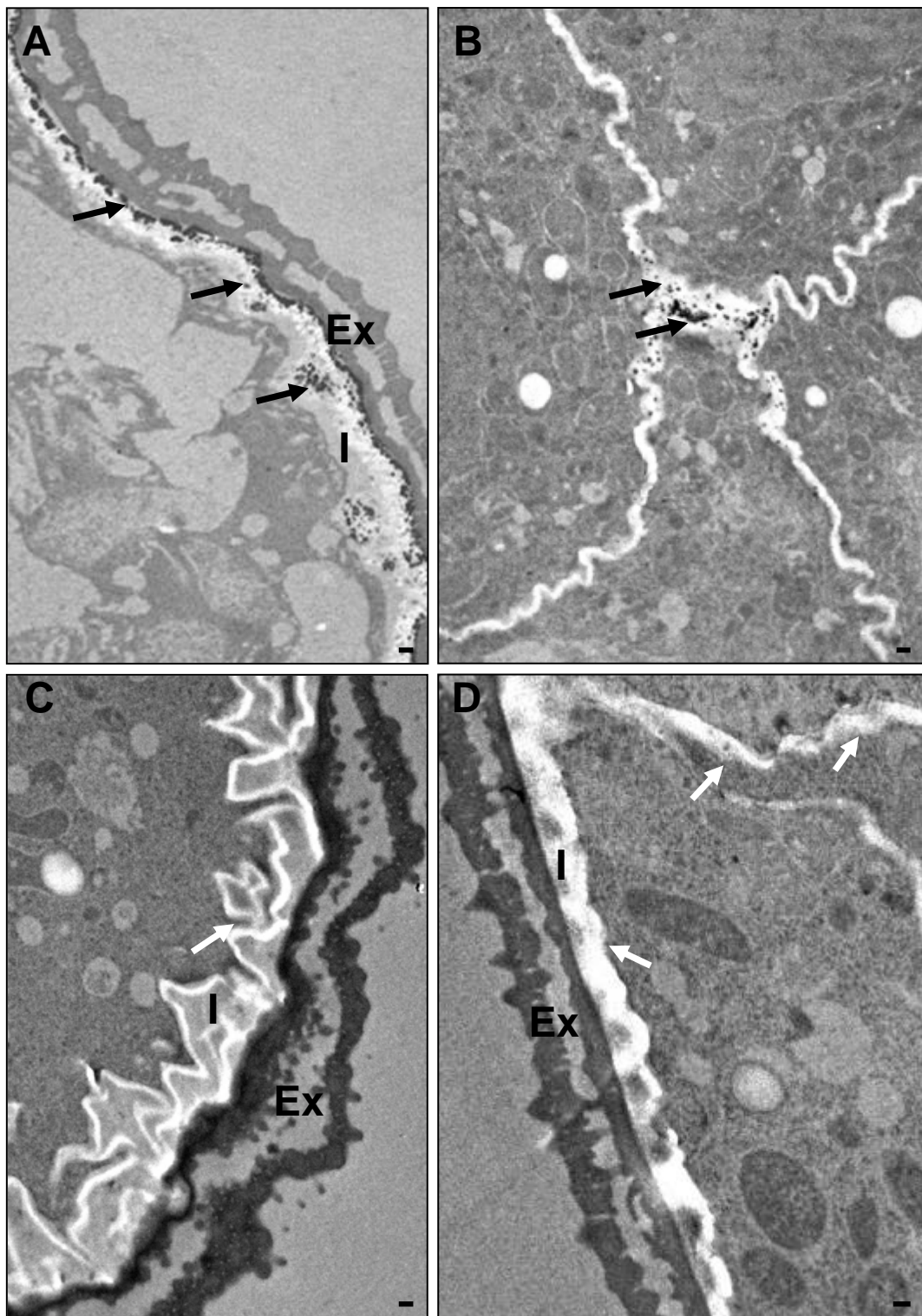


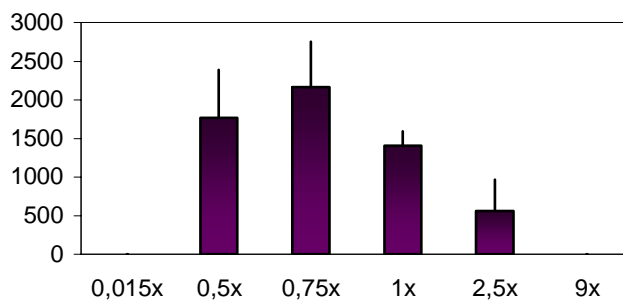
Fig. 21

Para confirmar que los depósitos contenían hierro y que probablemente procedía del medio de cultivo se realizaron nuevos ensayos de cultivo de microsporas aisladas utilizando un medio de cultivo exactamente igual al inicial pero que contenía distintas concentraciones de Fe: 0.015x, 0.5x, 0.75x, 1x, 2.5x, 9xFe y sin Fe (siendo 1xFe la concentración inicial de FeNa₂EDTA que se aplicaba tanto al cultivo de anteras como al de microsporas aisladas, es decir, 40 mg/ml). La inducción en todos los casos se llevó a cabo, igual que al inicio, pretratando con manitol 0.3M.

Cuando se estudiaron las estructuras multicelulares obtenidas utilizando los medios que contenían una concentración superior a 1xFe se observaba que los depósitos densos a los electrones estaban presentes en la parte más externa de la intina (fig. 21A) y en las paredes que separaban las células de los distintos granos multicelulares (fig. 21B). Sin embargo cuando se eliminó el hierro del medio de cultivo o se utilizaban concentraciones iguales o inferiores a 0.75xFe los depósitos desaparecían por completo de los granos de polen multicelulares resultantes (fig. 21C y D). Además, la observación de la ultraestructura de los pocos granos de polen multicelulares obtenidos cuando las concentraciones de Fe eran altas (2.5X) o inferiores a 0.75x mostró que existían algunas anomalías: algunos granos de polen tenían la pared alterada (fig. 21C) o se estaban muriendo presentando síntomas claros de degeneración celular (fig. 21A).

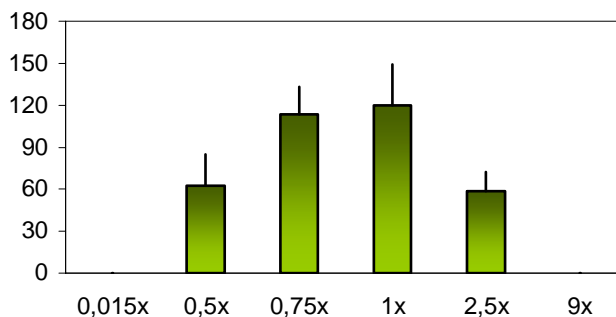
Asimismo, para determinar cómo afectaba la concentración de hierro en el medio a la inducción de androgénesis, se evaluaron el número de proembriones obtenidos así como el número de plantas verdes regeneradas cuando se utilizaban las concentraciones de hierro anteriormente citadas: 0.015x, 0.5x, 0.75x, 1x, 2.5x y 9xFe. Se realizaron 4 ensayos para cada una de las concentraciones y los resultados de los contajes están resumidos en la tabla 6 así como en los histogramas 1 y 2.

Como resumen se puede decir que el número de estructuras embrionarias obtenidas disminuye con la concentración de Fe cuando ésta es superior a 0.75x. Sin embargo el número de plantas verdes regeneradas se incrementa con la concentración de Fe hasta que ésta es 1x, de manera que a partir de esta concentración también disminuye.



Histograma

1. Número de proembriones obtenidos a partir de ensayos de cultivo de microsporas utilizando distintas concentraciones de hierro. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. n=4. p=0.1



Histograma 2. Número de plantas verdes obtenidas a partir de ensayos de cultivo de microsporas utilizando distintas concentraciones de hierro. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. n=4. p=0.1

[Fe]	proembriones	SEM	plantas verdes	SEM
0.015x	0	0	0	0
0.5x	1763	622.95	62	22.53
0.75x	2163	588.02	113	20.11
1x	1404	191.50	120	29.29
2.5x	557	409.79	58	13.96
9x	0	0	0	0

Tabla 6. Número de proembriones y plantas verdes regeneradas a partir de ensayos de cultivo de microsporas utilizando distintas concentraciones de hierro. Los resultados son la media y la desviación estandar (SEM) de 4 experimentos.

4.4. Inmunolocalización de componentes de la pared celular.

Para proseguir con nuestro estudio sobre la pared de la microspora durante la inducción y las primeras etapas de la inducción androgénica se inmunolocalizaron algunos de los componentes de la pared celular vegetal durante este proceso (fig. 22-27). Los componentes estudiados fueron: calosa, pectinas y proteínas arabinogalactanos (AGPs). Para ello se estudió la distribución de estas moléculas en las paredes de microsporas vacuoladas antes (A0) y después del pretratamiento de inducción (A3 y A4) así como en las estructuras multicelulares obtenidas tras el cultivo de anteras y microsporas aisladas (C3, C6, C9 y C13).

Fig. 22. Inmunocitoquímica con anticuerpos anti-calosa. Cultivo de anteras y microsporas aisladas. Figs. **A y B:** Cortes ultrafinos contrastados con Ur. Cultivos de anteras. **A:** Polen embriogénico después de 3 días de en cultivo (C3). El marcado (flechas) se acumula en la parte más externa de la intina (In). **B:** Polen embriogénico después de 6 días de en cultivo (C6). El marcado se acumula en zonas de las paredes que separan las células que componen a estos granos y que corresponden a los plasmodesmos (P). Las barras representan 1 μ m

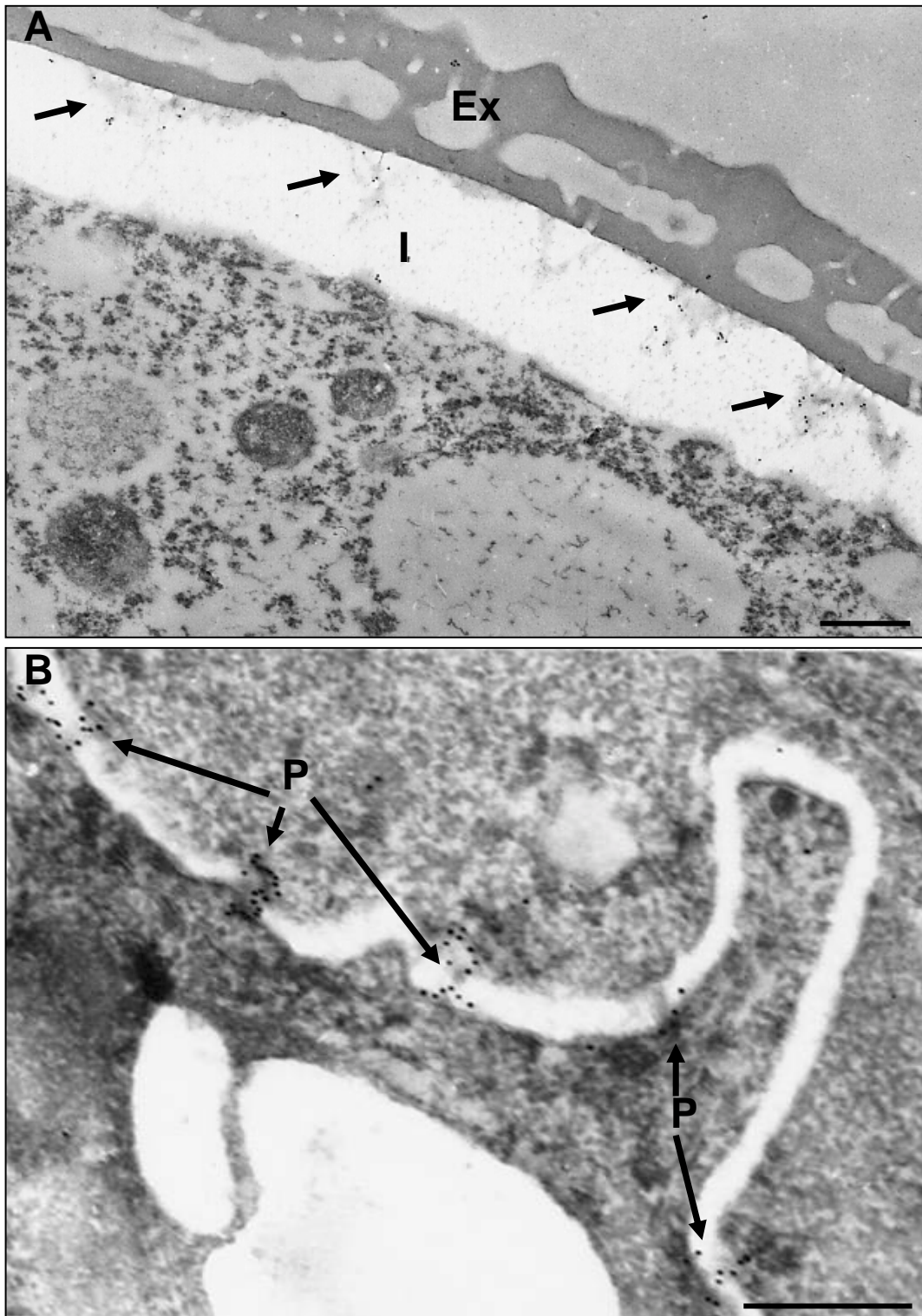


Fig. 22

4.4.1. Calosa.

Para localizar la calosa en las paredes celulares se utilizó un anticuerpo comercial. No se encontró ningún marcado en las microsporas vacuoladas antes de la inducción. Tras la puesta en cultivo el inmunomarcado se distribuyó en la parte más externa de la intina engrosada de los granos multicelulares obtenidos tras 3, 6, 9 y 13 días de cultivo (fig. 22A). También encontramos un marcaje muy abundante para la calosa dentro de los plasmodesmos de las paredes que separaban las células que constituían las estructuras multicelulares en formación (fig. 22B).

4.4.2. Pectinas.

La distribución de pectinas fue estudiada utilizando dos anticuerpos monoclonales: JIM5 (fig. 23), que reacciona frente a pectinas con un bajo grado de esterificación, y JIM7 (fig. 24), que reacciona frente a pectinas altamente esterificadas.

Fig. 23. Inmunodetección de pectinas con bajo grado de esterificación (JIM5). Cultivo de anteras. Figs. **A-E**: Cortes ultrafinos contrastados con Ur. **A** y **B**: Anteras antes de la inducción androgénica (A0). **A**: Tejido de la antera en el que se observa abundante marcado en las paredes (flechas). **B**: Microspora vacuolada donde sólo se observan marcado con oro en algunas zonas de los dictiosomas (dc). **C**: Grano multicelular obtenido tras 3 días de cultivo (C3), en el que la parte más externa de la intina (I) está marcada (flechas). **D** y **E**: Granos multicelulares obtenidos tras 6 días de cultivo (C6). **D**: Las paredes que separan las células que los integran no presentan inmunomarcado. **E**: Las partículas de oro están localizadas en la parte más externa de la intina (I) (flechas). Las barras representan 1 μ m

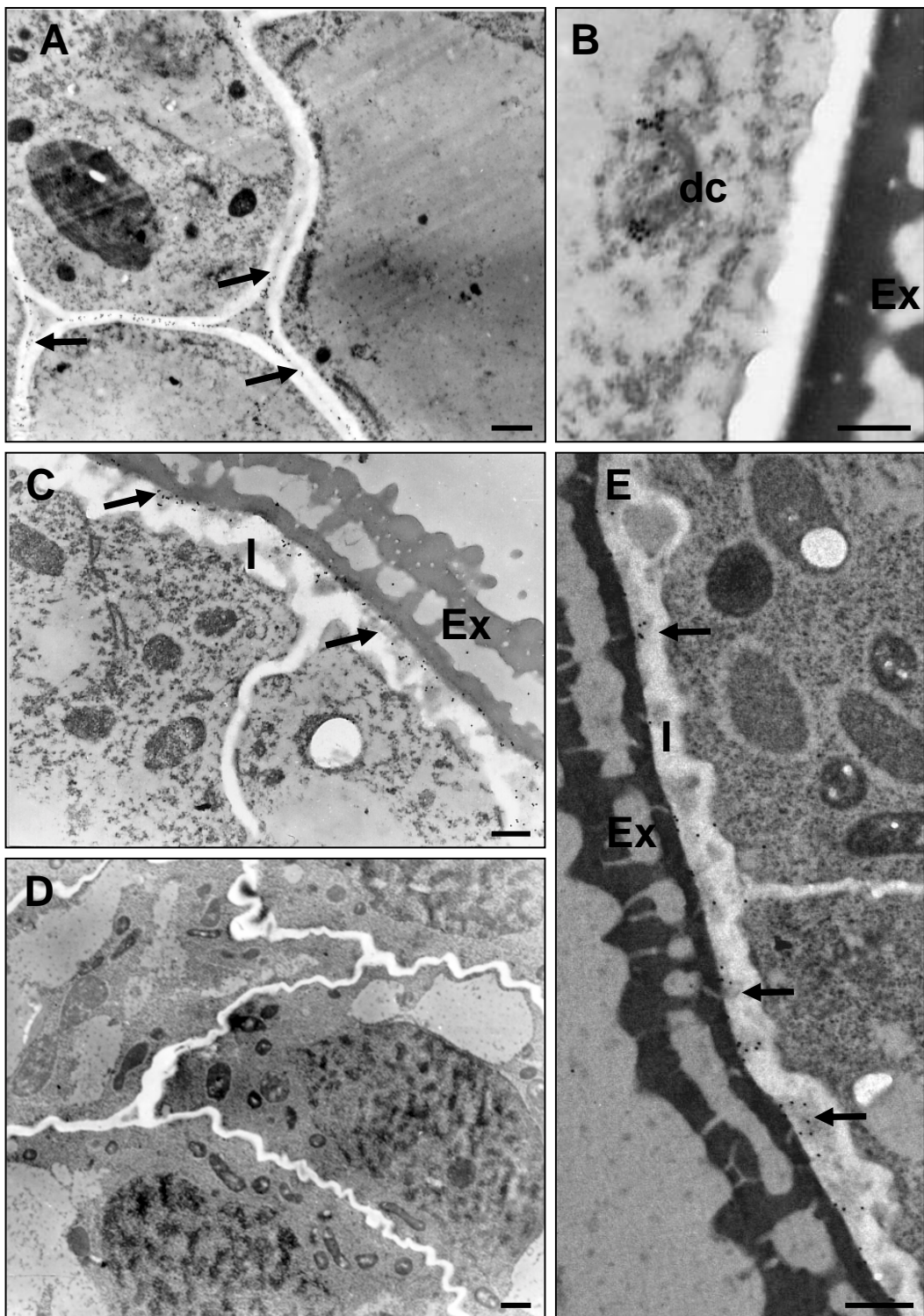


Fig. 25

Antes del pretratamiento de inducción de androgénesis (A0), se observó que tras incubar con ambos anticuerpos, JIM5 y JIM7, el inmunomarcado estaba presente en las paredes de las células de los diferentes tejidos que componen la antera incluyendo epidermis, capas medias y tapetum (fig.23A y 24A). En las microsporas se encontró marcado en la intina cuando incubamos con el anticuerpo JIM7 (fig. 24A), que localiza pectinas metilesterificadas, pero no cuando incubamos con el JIM5, que reconoce pectinas desesterificadas. En las microsporas vacuoladas (A0) sólo encontramos partículas de oro con JIM5 en algunas zonas de los dictiosomas (fig. 23B).

Fig. 24. Inmunodetección de pectinas esterificadas (JIM7) en cultivo de anteras. Figs. **A-D:** Cortes ultrafinos contrastados con Ur. **A:** Antera antes de la inducción androgénica (A0), las células del tapetum (T) presentan inmunomarcado (flechas) también se encuentra marcada la intina de las microsporas (flechas). **B:** Grano multicelular obtenido tras 3 días de cultivo (C3), tanto la intina (I) como la pared lateral visible en este corte están marcadas (flechas). **C y D:** Granos multicelulares obtenidos tras 6 días de cultivo (C6). **C:** Polen multicelular homogéneo marcado tanto en la intina como en las paredes laterales (flechas). **D:** Polen multicelular heterogéneo marcado tanto en la intina como en las paredes laterales (flechas). Las barras representan 1 μm

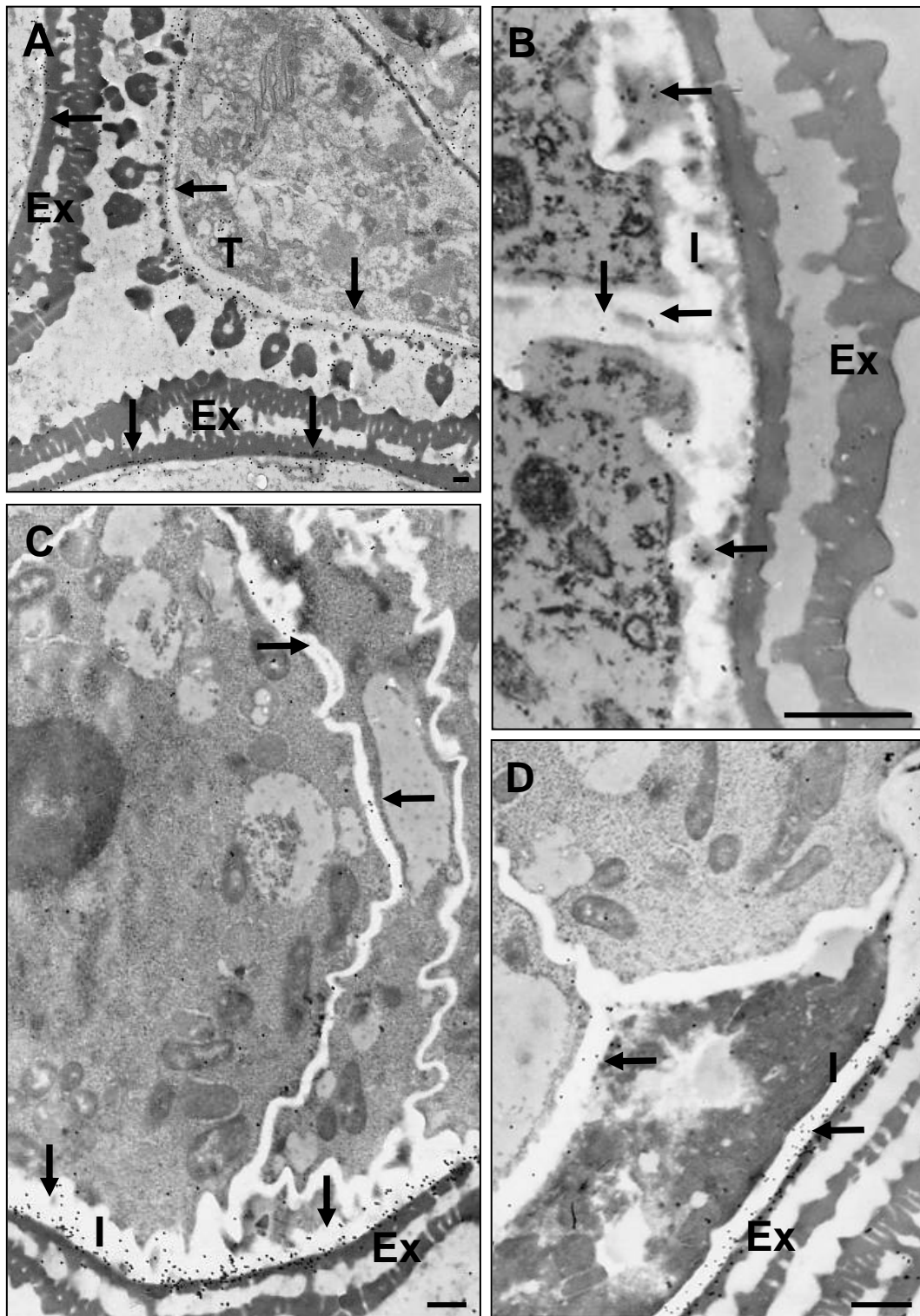


Fig. 24

En los granos de polen multicelulares obtenidos tras el cultivo de anteras durante 3 y 6 días, el inmunomarcado con el anticuerpo JIM7 se encontraba distribuido al azar en la intina engrosada y en las nuevas paredes que se formaban separando las células que constituían estos granos, tanto cuando eran homogéneos como cuando eran heterogéneos (fig. 24B-D). Sin embargo, cuando se incubaban las secciones ultrafinas con el anticuerpo JIM5 las partículas de oro sólo se localizaban en la región más externa de la intina de estos granos tanto tras 3 (fig. 23C) como 6 días de cultivo (fig. 23D). Este patrón de marcado coincidía prácticamente con el de la calosa en la intina, pero con el anticuerpo JIM5 no se encontraba marcado en los plasmodesmos presentes en las paredes laterales como ocurría con el anticuerpo anti-calosa ni en ninguna otra zona de estas paredes (figs. 23C-E). El inmunomarcado de las células de los distintos tejidos de la antera (epidermis, capas medias y tapetum) se mantuvo tanto tras 3 como 6 días de cultivo con ambos anticuerpos.

Fig. 25. Inmunodetección de pectinas en cultivo de microsporas. Figs. **A-B:** Cortes ultrafinos contrastados con Ur. **A:** Inmunodetección de pectinas desesterificadas (JIM5). Polen multicelular obtenido tras 3 días de cultivo (C3), marcado en la parte más externa de la intina (I) (flechas). **B:** Inmunodetección de pectinas esterificadas (JIM7). Polen multicelular obtenido tras 6 días de cultivo (C6) con partículas de oro decorando toda la superficie de la intina (I) (flechas). Nótese la presencia tanto en **A** como en **B** de depósitos densos a los electrones (círculos blancos). Las barras representan 1 μ m

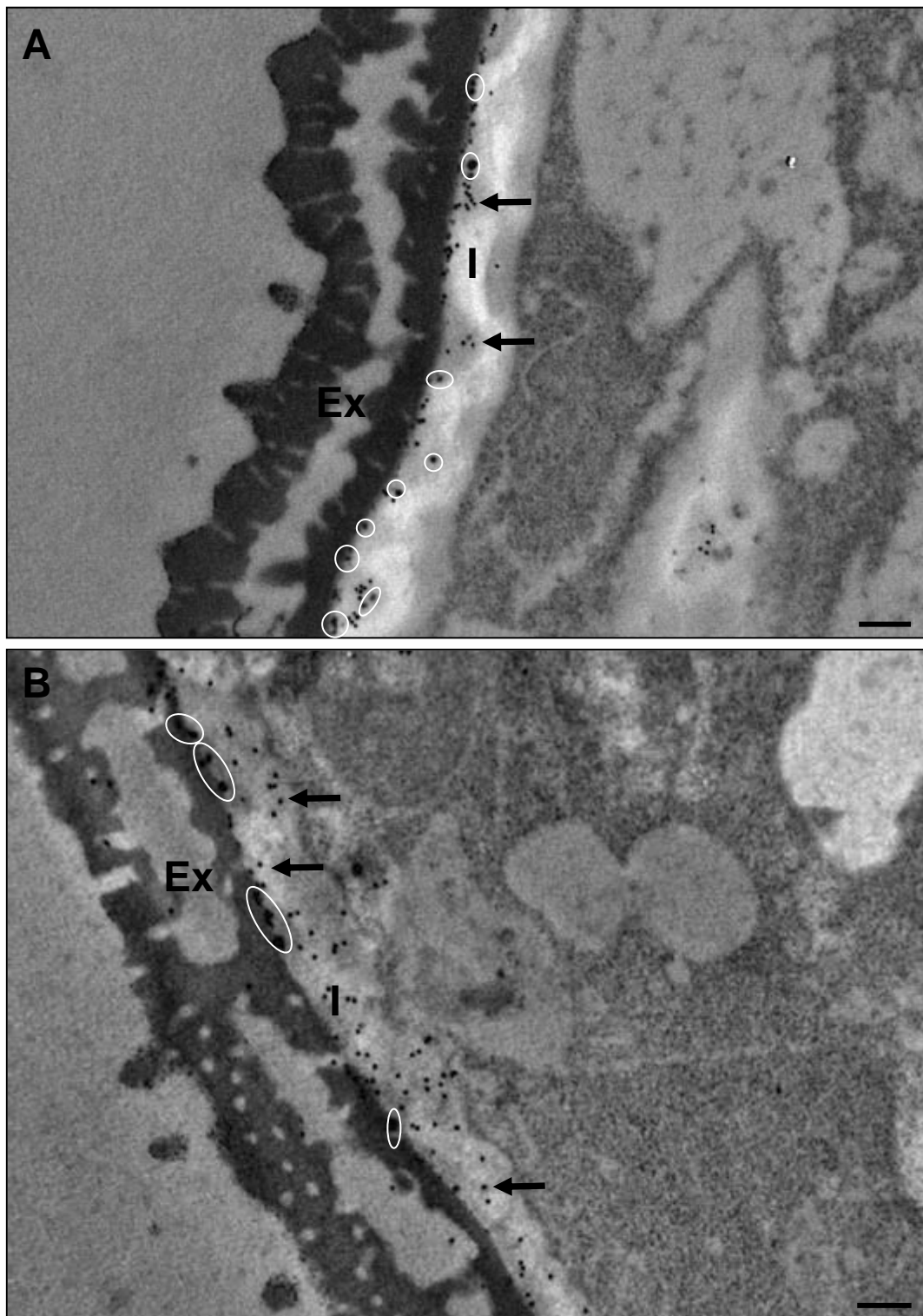


Fig. 25

En las estructuras multicelulares obtenidas tras el cultivo de microsporas aisladas se realizó un estudio paralelo de localización de pectinas tanto esterificadas como desesterificadas (fig.25) para ver si existía alguna diferencia en cuanto a la composición de estas paredes al estar más directamente expuestas a los distintos componentes del medio de cultivo. Al igual que ocurría en el cultivo de anteras, en el cultivo de microsporas aisladas las pectinas metilesterificadas se distribuían a lo largo y ancho de la intina pero las pectinas desesterificadas se localizaban sólo en la parte más externa de la intina, justamente donde se acumulaban especialmente los depósitos densos a los electrones que se han descrito en el capítulo anterior. Sin embargo y a pesar de su proximidad, nunca observamos colocalización de este tipo de pectinas y los depósitos, como se puede observar en la figura 25A. Para distinguir los depósitos del marcado fue necesario fijarse en el menor tamaño y en la forma más redondeada que presentan los granos de oro (fig. 25). Tampoco existía colocalización con las pectinas metilesterificadas (fig. 25B).

4.4.3. Proteínas arabinogalactanos

Dado que se había descrito que existían dos tipos de AGPs implicadas en la embriogénesis somática se estudió si estas proteínas, que reaccionaban frente a los anticuerpos JIM4 y JIM8, también estaban implicadas en la inducción y primeras etapas de la androgénesis (figs. 26 y 27).

Fig. 26. Inmunodetección de AGPs (JIM8) en cultivo de anteras. Figs. **A-D:** Cortes ultrafinos contrastados con Ur. **A:** Microspora vacuolada antes de la inducción androgénica (A0), la intina (I) y distintas zonas del citoplasma especialmente el retículo endoplásmico presentan inmunomarcado (flechas). **B-D:** Granos multicelulares homogéneos marcados tanto en la intina (I) como en las paredes laterales y en zonas membranosas del citoplasma (flechas). **C:** Polen multicelular heterogéneo presenta poco marcado. Las barras representan 1 μ m

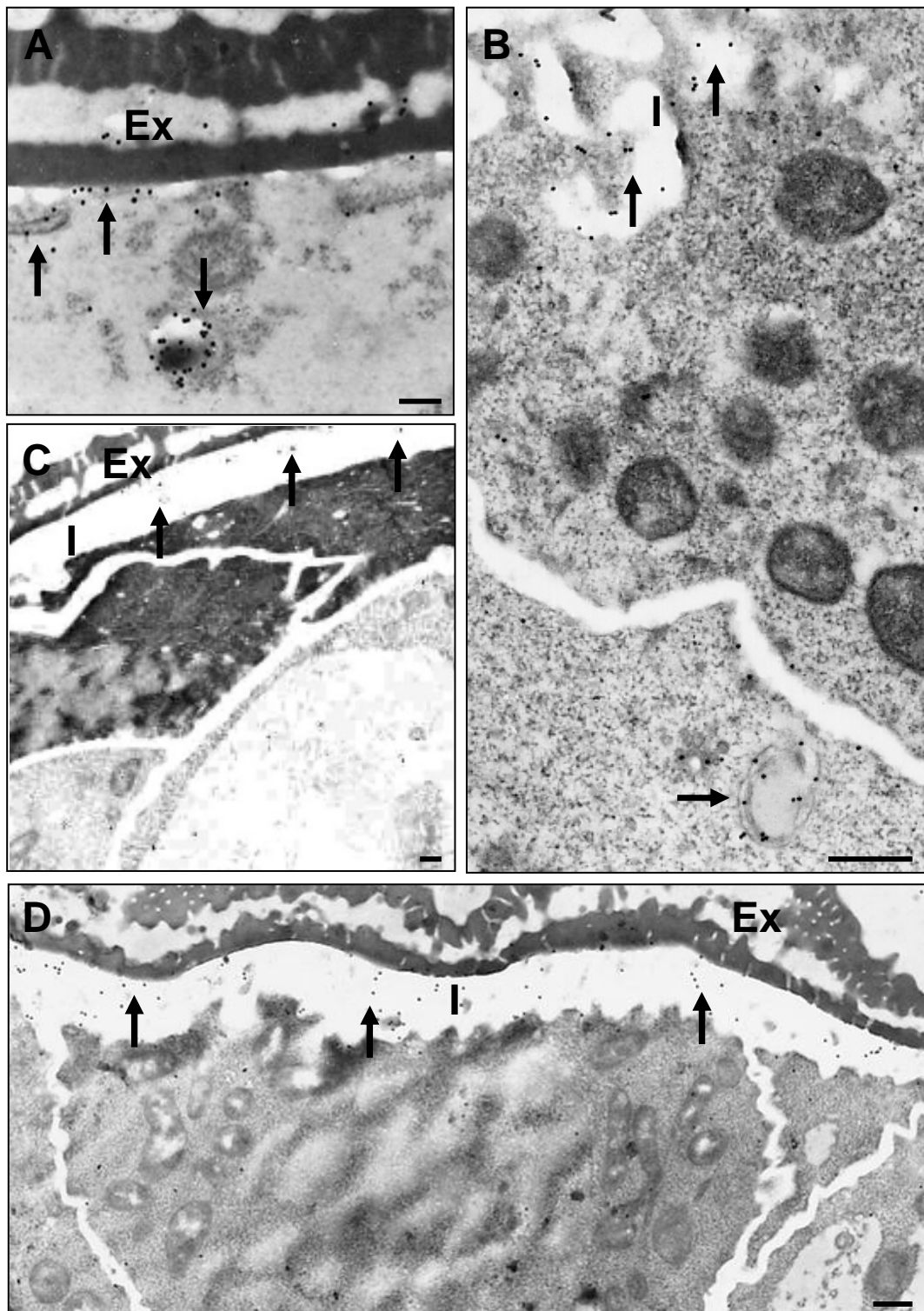


Fig. 26

En cuanto a la distribución de la marca tras la incubación con el anticuerpo JIM8 (fig. 26), en microsporas vacuoladas (A0) se encontró marcado en la intina y en el citoplasma cercano a la pared celular, especialmente en vesículas y en retículo endoplásmico (fig. 26A). Sin embargo, no se encontró inmunomarcado tras el pretratamiento de inducción.

Cuando se incubó con el anticuerpo JIM8 después de 3 y 6 días de cultivo el marcado fue bastante abundante localizándose las partículas de oro en la intina (figs. 26B y D) y en las paredes formadas entre las células que componían el grano multicelular (fig. 26D), especialmente en los granos de polen multicelulares homogéneos. Los granos multicelulares heterogéneos no presentaban prácticamente marca (fig. 26C).

Los resultados obtenidos tras incubar con JIM4 fueron bastante diferentes (fig. 27). No se encontró marcado en las microsporas antes de la inducción de androgénesis. Sin embargo sí se encontró tras la inducción (A4) y en granos de polen multicelulares obtenidos tras 3 y 6 días de cultivo (fig. 27A y B) aunque la marca era muy escasa. En la figura 28 se muestra esquemáticamente la distribución del marcado cuando se utilizó este anticuerpo.

Fig. 27. Inmunodetección de AGPs (JIM4) en cultivo de anteras. Figs. **A** y **B**: Cortes ultrafinos contrastados con Ur. Grano multicelulares obtenidos tras 6 días de cultivo (C6). **A**: Grano multicelular homogéneo, aparece marcado en las paredes laterales y algunas zonas del citoplasma (flechas) **B**: Grano multicelular heterogéneo. El marcado, escaso, aparece en el citoplasma de ambos tipos de células (flechas). Las barras representan 1 μ m

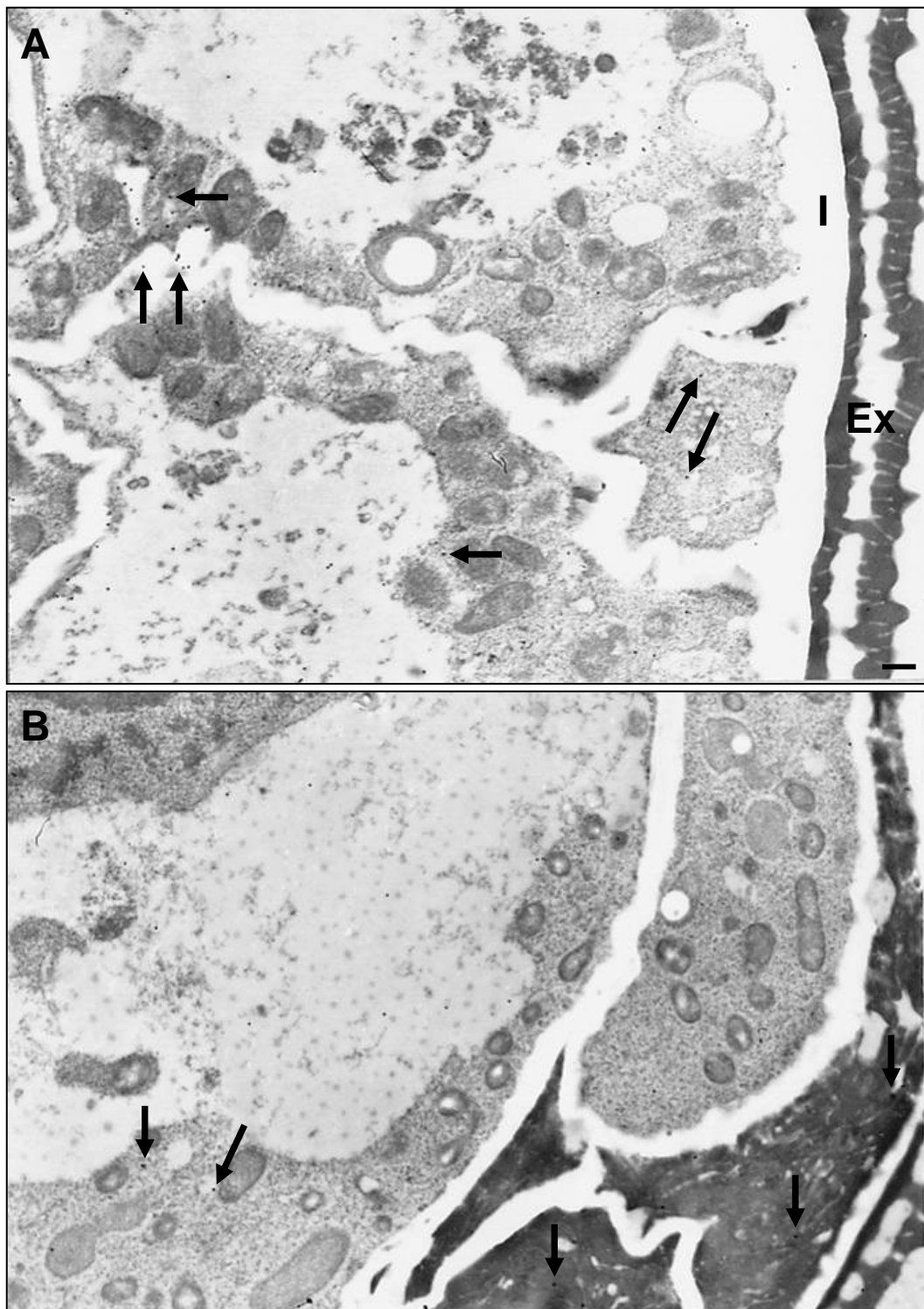


Fig. 27

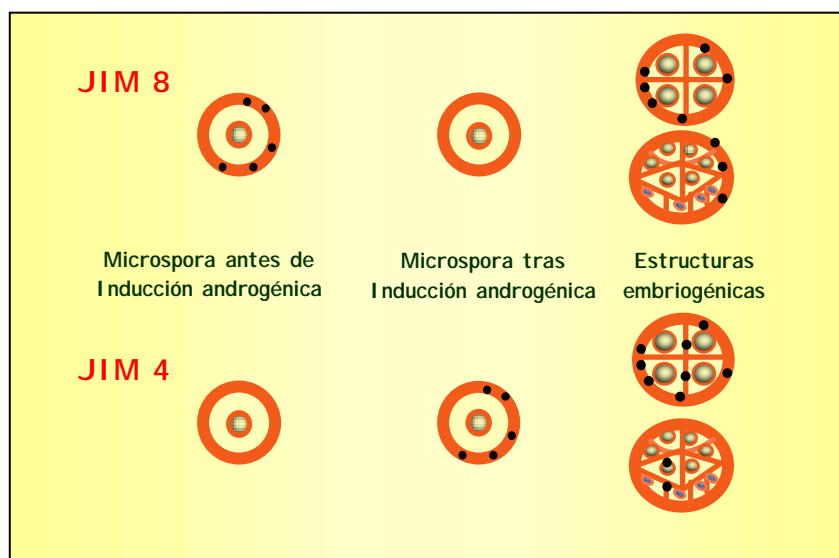


Fig. 28. Esquema de los resultados de las inmunocitoquímicas para los anticuerpos JIM4 y JIM8.

5. HORDEÍNAS.

En nuestro estudio de las primeras etapas de la androgénesis observamos la presencia de unos cuerpos de carácter proteico que ya hemos descritos con anterioridad. Dada la importancia de las proteínas de almacenamiento en cereales, en particular de las prolaminas, se realizó un análisis para ver si estos cuerpos proteicos contenían prolaminas. En primer lugar para poner a punto las técnicas que se iban a utilizar para este estudio, se analizó primero la presencia de prolaminas durante la embriogénesis zigótica de trigo y de cebada puesto que los anticuerpos empleados, cedidos por el Dr. Enrique Méndez (R3, R4 y R5) reaccionaban frente a todas las prolaminas de cereales incluyendo por tanto las gliadinas del trigo y las hordeínas de cebada.

5.1. Prolaminas durante el desarrollo zigótico de trigo y cebada.

5.1.1. Cuantificación de prolaminas mediante ELISA.

Para la cuantificación de prolaminas se utilizó el sistema ELISA “sandwich” desarrollado en principio para determinar la presencia de gluten en alimentos. Los resultados se pueden ver en la tabla 7. Aunque para el análisis de alimentos los resultados se expresan en partes por millón de gluten (ppm), en nuestro estudio que incluye semillas de trigo y cebada en distintos estadios de desarrollo los expresamos como μg de gliadinas u hordeínas en un gramo de muestra (ppm prolaminas).

TRIGO		CEBADA	
DPA	ppm gliadinas	DPA	ppm hordeínas
2	0.093	3	0.065
6	2.15	6	268.55
8	52.75	8	4666.67
10	2590	10	8572
12	3190	12	32440
Semilla madura	14670	Semilla madura	54075

Tabla 7. Cuantificación mediante ELISA de gliadinas y hordeínas durante el desarrollo zigótico de trigo y cebada respectivamente. DPA: días post-antesis. ppm: partes por millón (μg de gliadinas u hordeínas en un gramo de muestra). Los resultados son la media de 3 ensayos El error de esta técnica ha sido valorado en un 10% de acuerdo a las normas ISO.

En la tabla 7 se puede ver que 2 días después de la antesis se pudieron detectar ya gliadinas y hordeínas en las semillas de trigo y cebada respectivamente. Sin embargo, la cantidad de prolaminas fue

realmente baja tanto en trigo como en cebada en este estadio siendo ligeramente superior en trigo que en cebada. Sin embargo, 6 días después de la antesis la cantidad de hordeínas fue ya significativamente mayor en las semillas de cebada que la cantidad de gliadinas en la semilla de trigo. La cantidad de prolaminas aumentaba progresivamente en ambas semillas en formación pero la cantidad de hordeínas seguía siendo mayor que la cantidad de gliadinas incluso en las semillas maduras de cebada y trigo.

5.1.2. Detección de gliadinas y hordeínas mediante inmunofluorescencia.

Para inmunolocalizar gliadinas y hordeínas durante el desarrollo zigótico de las semillas de trigo y cebada se utilizaron los tres anticuerpos antes citados: R3, R4 y R5. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo acoplado a fluoresceína. La observación de estas muestras con el microscopio de fluorescencia mostró que estas proteínas se concentraban en forma de cuerpos proteicos (figs. 29, 30 y 31).

Fig. 29. Inmunolocalización de gliadinas. Secciones semifinas transversales de semilla de trigo en formación 12 DPA. Fig. **A:** Tinción con azul de toluidina. El endospermo amiláceo presenta numerosos cuerpos proteicos (puntas de flecha) que aparecen teñidos de azul. Figs. **B-D:** Inmunolocalización de gliadinas mediante los anticuerpos R3, R4 y R5. **B:** Inmunofluorescencia con el anticuerpo R3: Además de en los cuerpos proteicos (puntas de flecha) aparece marcado en la periferia de los granos de almidón (flechas). No aparece marca en la capa aleurona (A). Figs. **C y D:** Inmunomarcado con R4 y R5 respectivamente. Aparece marcado en los cuerpos proteicos (puntas de flecha) pero no se observa fluorescencia en la superficie de los granos de almidón ni en la capa aleurona (A). Las barras representan 10 μm

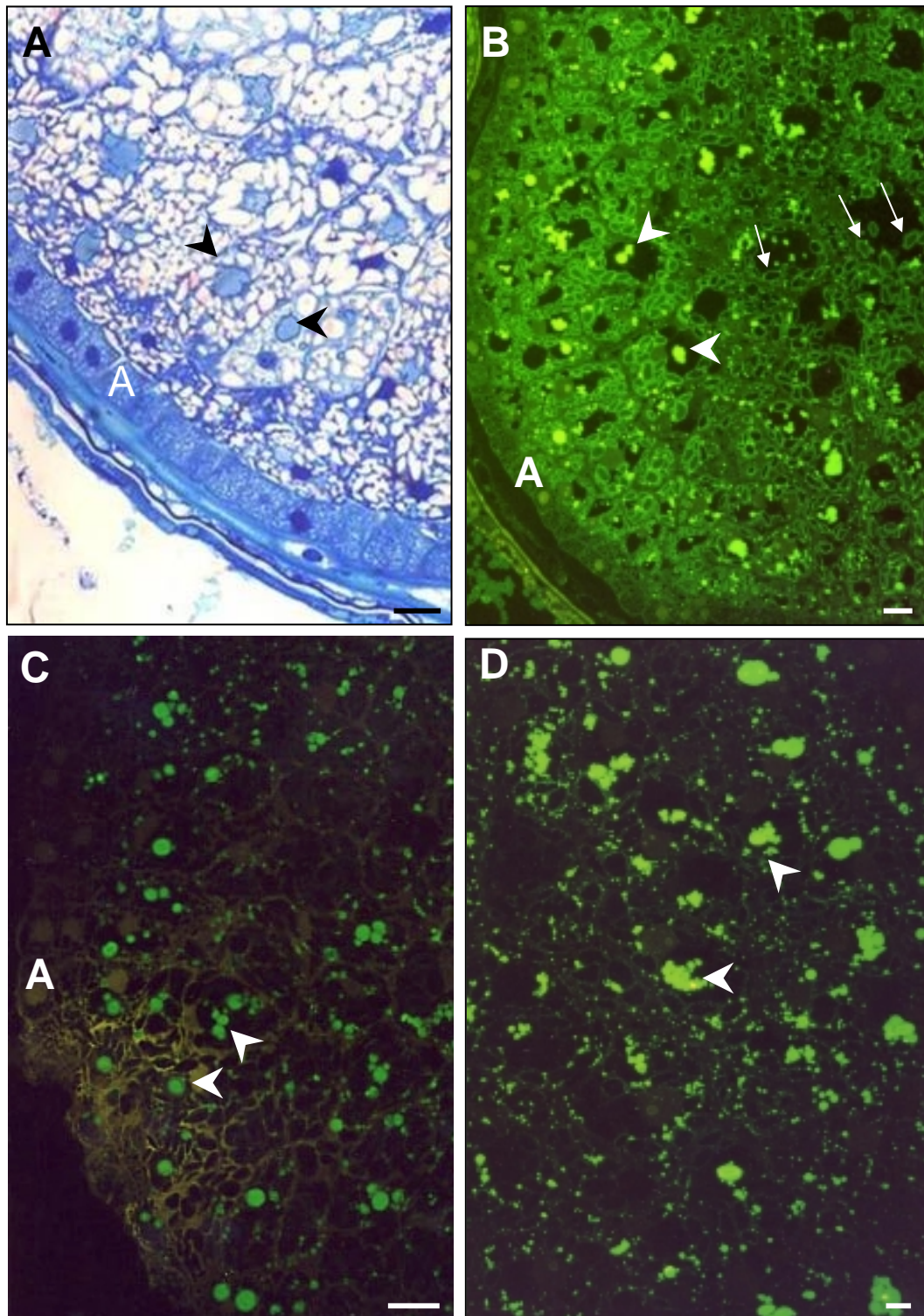


Fig. 29

Estos cuerpos proteicos habían sido observados en el endospermo de las semillas de trigo y cebada mediante microscopía de campo claro al teñir con azul de toluidina (fig. 29A) y no eran visibles hasta 8 días después de la antesis. Cuando se utilizó el anticuerpo R3 se observó que además de los cuerpos proteicos en el endospermo también aparecían marcados los límites superficiales de los granos de almidón (fig. 29B). Esto no ocurría cuando se utilizaba ni el anticuerpo R4 (fig. 29C) ni el anticuerpo R5 (fig. 29D), sin embargo cuando se empleaba este último se observaba una mayor intensidad de fluorescencia por lo que R5 fue el anticuerpo seleccionado a partir de ese momento para los estudios de localización mediante inmunofluorescencia y también el empleado en el análisis mediante Western blot.

Se observó además con los 3 anticuerpos que en todas las ocasiones, la capa de aleurona no presentaba cuerpos proteicos. Estos cuerpos que en la semilla de trigo 10 días después de la antesis presentaban una forma completamente redonda, (fig. 30A) iban creciendo conforme la semilla seguía desarrollándose (fig. 30B) y comenzaban a fundirse unos con otros 14 días tras la antesis. La fusión de los cuerpos proteicos hizo que perdieran su forma redondeada haciéndose más amorfos (fig. 30C). En la semilla madura se observó que la fusión de los cuerpos proteicos daba lugar a una matriz proteica que ocupaba junto con los granos de almidón casi todo el citoplasma (fig. 30D).

Fig. 30. Inmunolocalización de gliadinas con el anticuerpo R5. Fig. **A-C:** Secciones semifinas transversales de semilla de trigo en formación. **A:** 10 DPA, los cuerpos proteicos comienzan a unirse entre si. **B:** 12 DPA los cuerpos proteicos aumentan de tamaño y continúan uniéndose unos a otros. **C:** 14 DPA, los cuerpos proteicos adquieren formas irregulares como consecuencia de su fusión. Fig. **D:** Semilla madura en la que se observa una matriz proteica marcada que está presente prácticamente en todo el citoplasma no ocupado por los granos de almidón(al). La capa aleurona (A) no aparece marcada. Las barras representan 10 μ m

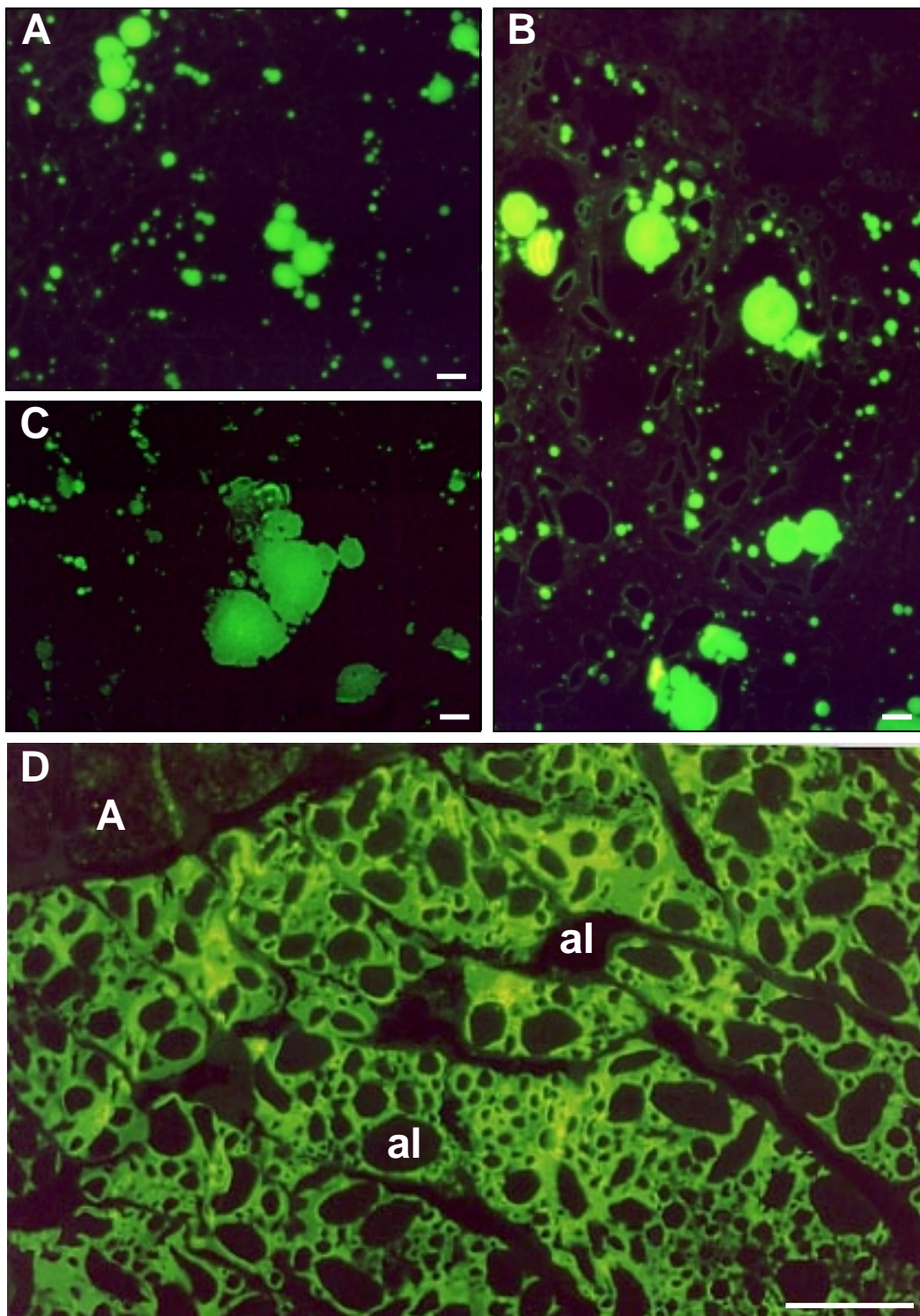


Fig.30

En cuanto a la semilla en formación de cebada, 8 días después de la antesis, en el endospermo todavía en proceso de celularización y desarrollo ya eran visibles los cuerpos proteicos aún de pequeño tamaño (fig. 31C) que se distribuían en el endospermo de la siguiente manera: encontrándose un número mayor de cuerpos proteicos donde el endospermo estaba más desarrollado y disminuyendo esta cantidad hacia el centro del espacio vacuolar central (fig. 31A y B). Los cuerpos proteicos fueron creciendo y desarrollándose en la semilla de cebada, igual que ocurría en la de trigo, hasta formar la matriz proteica característica de la semilla madura (fig. 31E). Los cuerpos proteicos eran también visibles y aparecían marcados con granos de oro cuando se realizaba una inmunocitoquímica para microscopía electrónica con el anticuerpo R5 (fig. 31D).

Fig. 31. Localización de hordeínas en semillas de cebada. Figs. **A-C**: Secciones semifinas transversales de semilla de cebada en formación 8 DPA. **A**: Tinción con azul de toluidina, el endospermo está todavía en formación. Espacio vacuolar central (VC). Figs. **B y C**: Inmunolocalización de hordeínas mediante el anticuerpo R5, el marcado se presenta en cuerpos proteicos. Fig. **D**: Inmunodetección de hordeínas mediante el anticuerpo R5. Cortes ultrafinos de semillas en formación 8 DPA contrastados con Ur. El marcado aparece dentro de los cuerpos proteicos. Fig. **E**: Inmunolocalización de hordeínas con el anticuerpo R5. Secciones semifinas transversales de semilla madura, la matriz proteica presente en prácticamente todo el citoplasma no ocupado por los granos de almidón (al). No aparece marcado en la capa aleurona (A). Las barras representan 100 μm salvo que se indique otro valor.

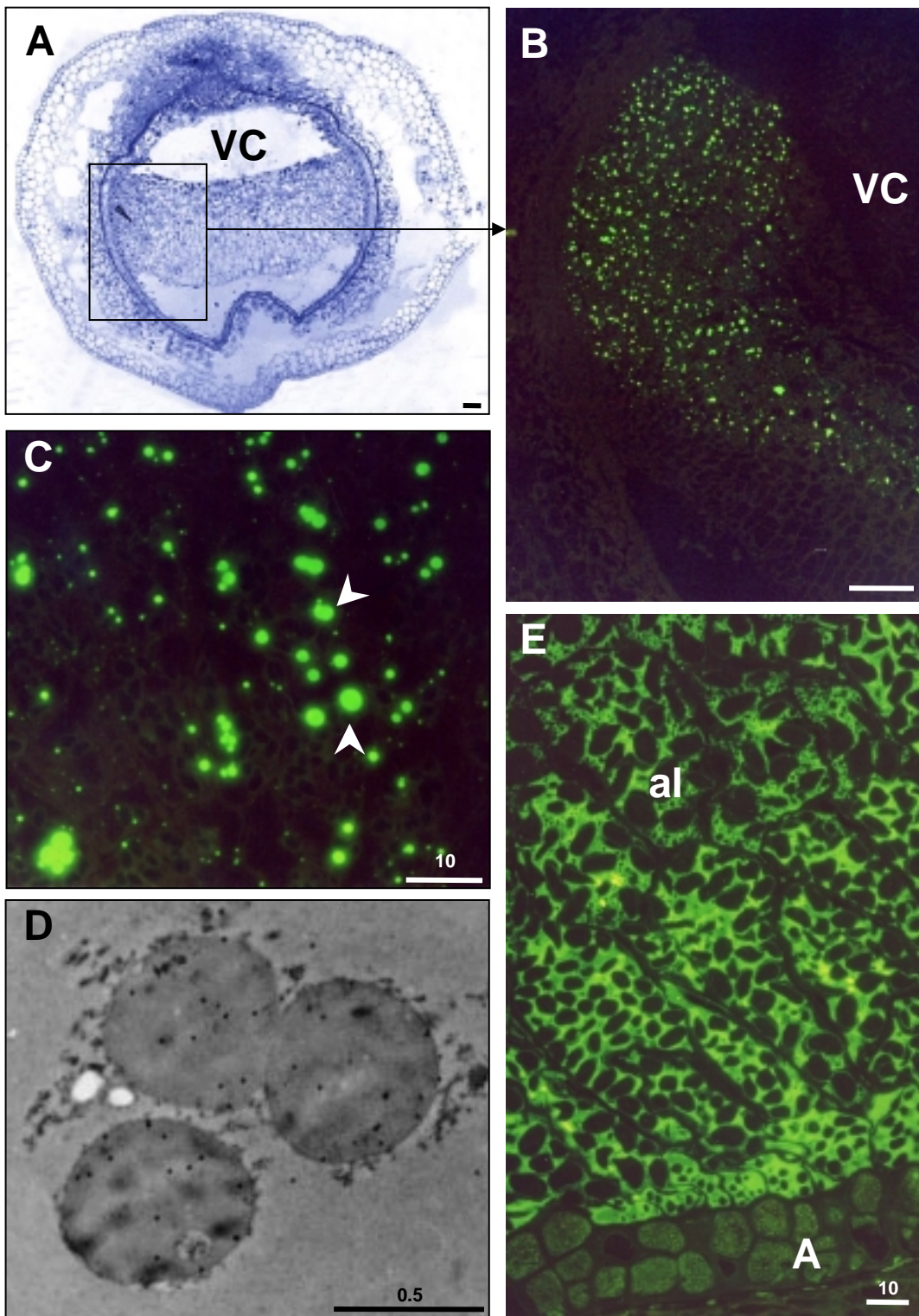


Fig.31

5.1.3. Análisis mediante Western blot.

Los extractos de proteínas de semillas de trigo y cebada en formación fueron separados mediante SDS-PAGE, transferidos a una membrana y detectados con el anticuerpo R5 acoplado a peroxidasa (figs. 32 y 33).

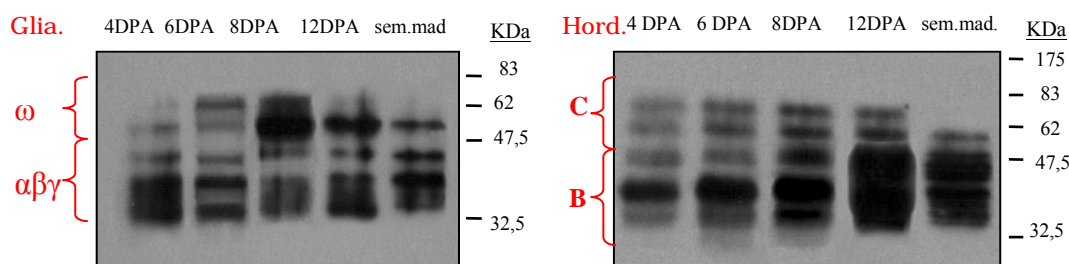


Fig.32. Western blot de gliadinas de semillas de trigo en formación. DPA: días postantesis. Se señala con llaves los distintos tipos de gliadinas.

Fig.33. Western blot de hordeínas de semillas de cebada en formación. DPA: días postantesis. Se señala con llaves los distintos tipos de hordeínas.

No fue posible detectar estas proteínas 2 días después de la antesis mediante esta técnica. En las figuras 32 y 33 se pueden observar los perfiles proteicos correspondientes a las gliadinas y hordeínas obtenidos para las semillas de trigo y cebada en formación, todas las bandas aparecían entre 30 y 70 kDa. Tanto en trigo como en cebada el patrón de estas bandas varió a lo largo del desarrollo de la semilla. Así, en trigo la banda superior, de 70 kDa, que se corresponde con una ω -gliadina y se podía ver claramente en los primeros días de desarrollo de la semilla desaparecía posteriormente y no estaba presente en la semilla madura. Posiblemente esto se debía a que proporcionalmente este tipo de proteínas sean menos abundantes en semillas maduras. Lo mismo ocurrió en cebada, también desaparecía esta banda superior en la semilla madura correspondiente a una hordeína de tipo C. Además, también variaba la abundancia relativa de las proteínas durante el

desarrollo de las semillas de trigo y de cebada. En cebada parecen aumentar las hordeínas tipo B.

Los resultados del estudio de la expresión del gen que codifica para la hordeína B1 en el desarrollo zigótico se detallaran más adelante en comparación con la expresión de este gen durante el desarrollo androgénico y gametofítico.

5.2. Hordeínas durante la inducción y las primeras etapas de la androgénesis

5.2.1. Expresión del gen de la hordeína B1 durante el desarrollo androgénico, zigótico y gametofítico mediante RT-PCR e hibridación *in situ*

Con el fin de estudiar la expresión del gen que codifica para la hordeína B1 en el desarrollo zigótico y androgénico de cebada se extrajo el ARN total de las siguientes muestras entre las que también se incluyeron algunos estadios del desarrollo gametofítico: A0 (microsporas en el estadio de microspora vacuolada), P9 (polen tricelular 9 días después de microspora vacuolada), P12 (polen maduro en anthesis, desprendido de la antera por agitación 12 días después de microspora vacuolada), A3 (microsporas tras 3 días de tratamiento de inducción con manitol), C3 (microsporas aisladas después de 3 días de cultivo), C13 (microsporas aisladas cultivadas durante 13 días), S10 (semillas de cebada en formación 10 días después de la anthesis) y E14 (embriones zigóticos diseccionados de semillas de cebada en formación 14 días tras la anthesis).

Para asegurarnos de que la cantidad de ARN total de partida era equivalente en todas las muestras analizadas, y con objeto de obtener

resultados semicuantitativos, se amplificaron también mediante RT-PCR los transcritos del gen *EF1 α* de cebada (elongation factor 1-alpha, número de acceso al GenBank L11740). Este es un gen que se expresa de manera constitutiva en todos los tejidos, independientemente del estado de la célula. Los resultados de la RT-PCR (fig. 34) utilizando los oligos EF5 y EF3 (tabla 3) mostraron la amplificación de un fragmento de 500 bp de este gen con una intensidad de banda cuantitativamente similar en todos los estadios analizados, lo que sirvió de control de que la cantidad de ARN total de partida era similar en todos los estadios ensayados. Por tanto, se puede concluir que los resultados de la amplificación reflejaban de manera semicuantitativa el nivel de transcritos presentes en cada estadio del desarrollo.

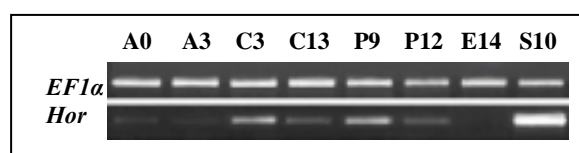


Fig. 34. Expresión del gen de la hordeína B1(*Hor*) estudiada mediante RT-PCR. *EF1 α* : gen del factor de elongación 1 α de cebada. A0: microspora vacuolada. A3: microsporas tras el pretratamiento de inducción. C3: microsporas cultivadas durante 3 días. C13: microsporas cultivadas durante 13 días. P9: polen tritelular 9 días después de microspora vacuolada P12: polen maduro. E14: embriones diseccionados 14 DPA. S10: semillas en formación 10 DPA.

Mediante la pareja de oligos *Hor5* y *Hor3* (tabla 3) se amplificó un fragmento de cDNA de 418 bp homólogo a la secuencia de la proteína hordeína B1 de cebada (número de acceso al Genbank T04474). Los cebadores fueron diseñados a partir de la secuencia EST BE195546 de cebada disponible en la base de datos. Los resultados de RT-PCR (fig. 34) muestran que el gen de la hordeína B1 se expresaba en todos los estadios estudiados excepto en los embriones zigóticos diseccionados de semillas de cebada en formación 14 días tras la antesis (E14). La mayor amplificación se obtuvo, como era esperable, en las semillas en formación

10 DPA. Se observa también un ligero aumento de expresión en las microsporas tras tres días de cultivo.

La distribución espacial de los transcritos del gen de la hordeína B1 se estudió mediante hibridación *in situ* (fig. 35) utilizando una sonda ARN antisense marcada con digoxigenina y visualizada mediante la intensificación con plata de los granos de oro acoplados a un anticuerpo antidigoxigenina. Al igual que en los análisis de RT-PCR se detectó la presencia de transcritos de este gen primero durante el desarrollo gametofítico en las microsporas vacuoladas (fig. 35A), el polen bicelular (fig. 35B) y el polen tricelular (fig. 35C), aunque en estos estadios el marcado era realmente escaso. También se detectaron los transcritos del gen de la hordeína B1 tras el pretratamiento de inducción (fig. 35D), en las primeras etapas del desarrollo androgénico a los 3 (fig. 35E), 6 (fig. 35F) , 9 (Fig. 35G) y 13 (Fig. 35H) días de cultivo. Además, durante el desarrollo de los proembriones androgénicos, no se apreciaban diferencias en el marcado entre los dos tipos celulares presentes en los granos de polen multicelulares heterogéneos tras 6 y 9 días (fig. 35F y 35G) de cultivo ni en ningún tipo de dominio dentro de estos granos de polen multicelulares. Tras 13 días de cultivo (fig. 35H) en los proembriones androgénicos más avanzados se apreciaba una mayor presencia de transcritos en las células situadas en la periferia que en las células situadas en el interior. Estas células tenían, como ya se ha dicho, una apariencia más meristemática. En cuanto al desarrollo zigótico se observó marcado en el endospermo de semillas de cebada en formación 10 días después de la antesis (fig. 35I) pero no en el embrión. En todos estos estadios, no se observó marca en las vacuolas, granos de almidón o paredes celulares lo que constituyó un control interno de la fiabilidad de los resultados de hibridación *in situ* control que se completaba con los resultados negativos obtenidos al usar la sonda sense.

Fig. 35. Localización mediante hibridación *in situ* al microscopio óptico de los transcritos de la hordeína B1. Secciones semifinas teñidas con safranina. Figs. **A-C:** Desarrollo gametofítico. **A y B:** Microspora vacuolada y polen bicelular respectivamente, el marcado escaso (flechas negras), aparece en el citoplasma y núcleo, no se observa marcado en la vacuola (V) o en la pared celular. **C:** Polen tricelular. En el citoplasma son visibles los granos de plata. Figs. **D-H:** Desarrollo androgénico. **D:** microsporas tras la inducción androgénica, presenta escaso marcado. **E y F:** granos de polen multicelulares tras 3 y 6 días de cultivo respectivamente, presentan un marcado abundante tanto en el núcleo como en el citoplasma de todas las células. Fig. **G:** grano de polen multicelular heterogéneo en el que se está rompiendo la pared tras 9 días de cultivo. El marcado aparece igualmente distribuido en los dos tipos celulares. **H:** células periféricas de un proembrión androgénico obtenido tras 13 días de cultivo. Fig. **I:** Endospermo de semilla de cebada 10 DPA en el que son visibles ya los cuerpos proteicos (puntas de flecha blanca) el marcado aparece distribuido en el citoplasma de todas las células. Nótese que no aparecen granos de plata ni en vacuolas, ni en paredes ni en granos de almidón (al). Las barras representan 20 μm .

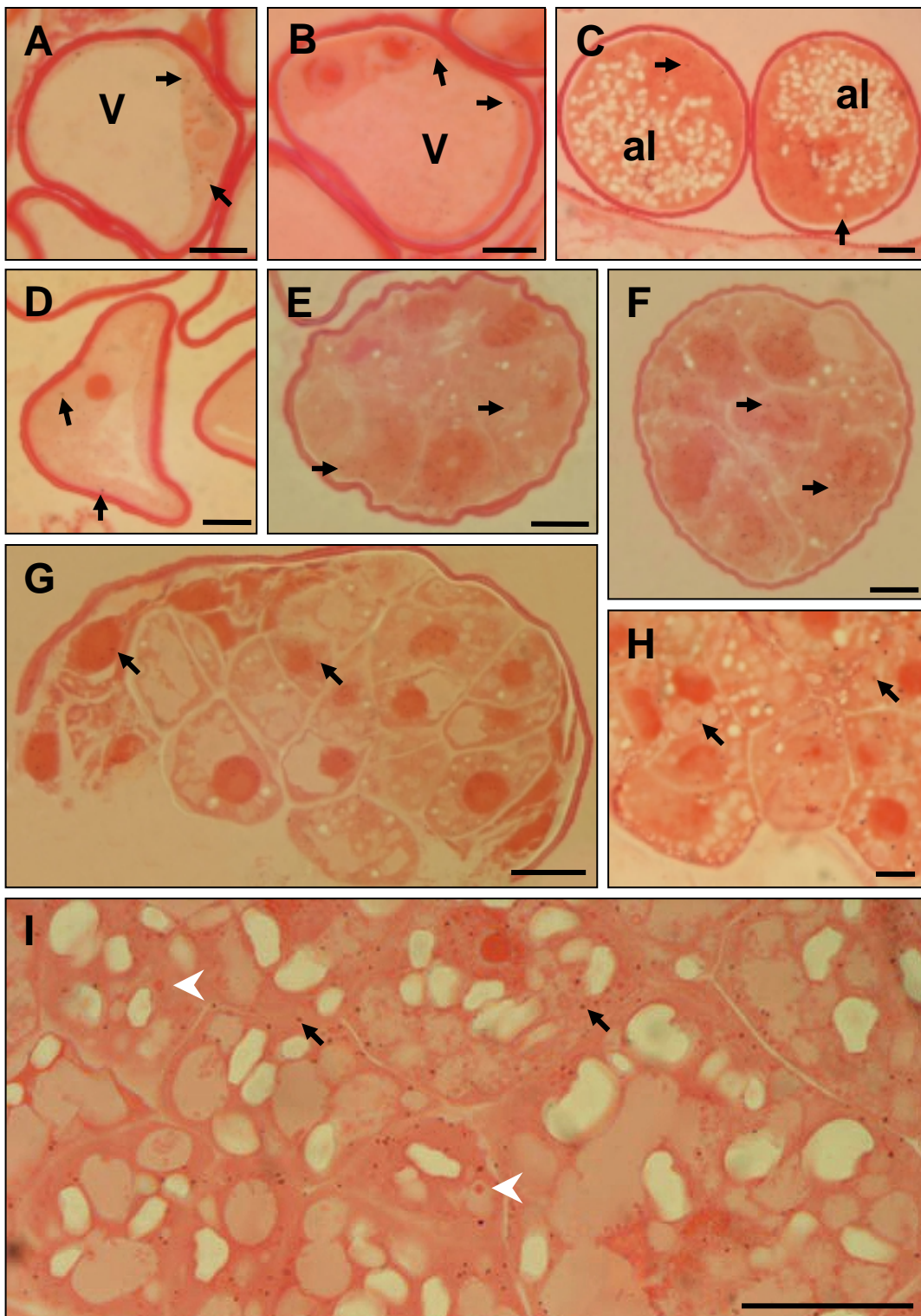


Fig. 35

5.2.2. Cuantificación de hordeínas mediante ELISA

Los extractos alcohólicos de proteínas obtenidos de microsporas antes (A0) y después de la inducción androgénica (A3) y de las microsporas embriogénicas resultado del cultivo durante 3 (C3), 6 (C6), 9 (C9) y 13 (C13) días fueron analizados mediante el sistema ELISA “sandwich” descrito con anterioridad. Los resultados de este análisis cuantitativo aparecen en la tabla 8.

ANDROGÉNESIS EN CEBADA	
Fase	ppm hordeínas
A0	3.85
A3	3.09
C3	94.03
C6	30.58
C9	3.58
C13	19.23

Tabla 8. Cuantificación mediante ELISA de hordeínas durante el desarrollo androgénico de cebada. A0: microspora vacuolada. A3: microsporas tras el pretratamiento de inducción. C3, C6, C9 y C13 microsporas cultivadas durante 3, 6, 9 y 13 días. ppm: partes por millón (μg de gliadinas u hordeínas en un gramo de muestra). Los resultados son la media de 3 ensayos. El error de esta técnica ha sido valorado en un 10% de acuerdo a las normas ISO.

Como se puede ver en la tabla 8 existen ya hordeínas en las microsporas vacuoladas antes del pretratamiento de inducción (A0), aunque en una cantidad muy baja. La cantidad de hordeínas no sufre prácticamente ninguna modificación tras el pretratamiento de ayuno en manitol (A3) y aumenta en gran medida tras 3 días de cultivo en medio rico. Tras 6 días de cultivo la cantidad de hordeínas decrece de nuevo,

disminuyendo aún más a los 9 días de cultivo. Por último tras 13 días de cultivo la cantidad de hordeínas vuelve aumentar.

5.2.3. Análisis mediante Western blot

Puesto que se encontraron hordeínas en las microsporas vacuoladas antes (A0) y después del pretratamiento de inducción (A3) y tras los primeros días de cultivo se realizó un análisis mediante Western blot de los mismos extractos proteicos utilizados para la cuantificación por ELISA. Los resultados se pueden ver en la figura 36. El patrón de bandas resultante para estos extractos mostró que para todos los estadios estudiados (A0, A3, C3, C6, C9 y C13) se podían distinguir las bandas correspondientes a las hordeínas detectadas por el anticuerpo R5.

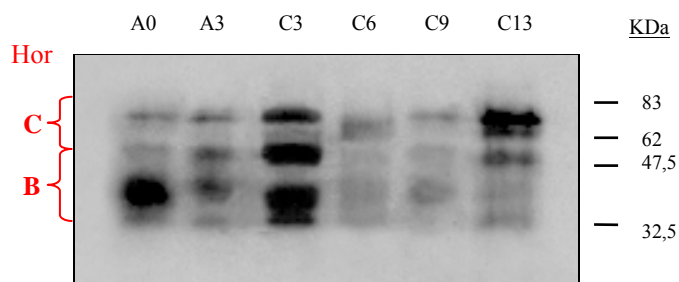


Fig. 36. Western blot de gliadinas de semillas de trigo en formación. DPA: días postantesis. A0: microspora vacuolada. A3: microsporas tras el pretratamiento de inducción. C3, C6, C9 y C13 microsporas cultivadas durante 3, 6, 9 y 13 días tras el pretratamiento de inducción.

5.2.4. Detección de hordeínas mediante inmunofluorescencia durante la androgénesis y el desarrollo gametofítico

Para inmunolocalizar las hordeínas se utilizó el anticuerpo R5 ya que este era el anticuerpo que proporcionaba mejores resultados para la localización de estas proteínas durante la formación de la semilla. Como

resultado de la inmunocitoquímica durante el desarrollo gametofítico (fig.37) se observó fluorescencia en algunos puntos del citoplasma de las microsporas vacuoladas (fig. 37A), del polen bicelular (fig. 37C) y del polen tricelular (fig. E), aunque esta marca era realmente escasa. En cuanto a la inducción y primeras etapas de la androgénesis (figs. 37 y 38), se observó muy poca marca tras el pretratamiento de estrés con manitol (A3) (fig. 37G) aunque posteriormente, tras 3 (C3)(fig. 37I), 6 (C6) (fig. 37J) y 9 (C9) días de cultivo (fig. 37M) se aprecia la presencia de estas proteínas en cuerpos proteicos fluorescentes. Estos cuerpos proteicos estaban presentes en el citoplasma de los dos tipos celulares de los granos multicelulares heterogéneos (figs. 37K y 37M). Estos cuerpos proteicos no eran visibles mediante tinción con azul de toluidina. También se encontró marca en pequeños cuerpos proteicos cuando se observaron los proembriones androgénicos obtenidos tras 13 días de cultivo (fig. 38A), esta marca era más abundante en la periferia de estos proembriones, en las células más meristemáticas. Lo mismo ocurría en proembriones obtenidos tras 18 días de cultivo. Sin embargo, en estos proembriones se podían observar cuerpos proteicos que eran visibles mediante tinción con azul de toluidina (fig. 38E) pero que no presentaban fluorescencia (figs. 38C y 38D) o sólo la presentaban en ciertos puntos de la superficie (fig. 38B). No se observó nada de inmunofluorescencia en embriones zigóticos (fig. 38F).

Fig. 37. Inmunolocalización de hordeínas en la gametogénesis y primeros estadios de la androgénesis. Cada pareja de imágenes está compuesta por una inmunofluorescencia y otra imagen equivalente teñida con azul de toluidina. Figs. **A-F**: Desarrollo gametofítico, se distinguen sólo unos pocos puntos fluorescentes (puntas de flecha). **A** y **B**: Microspora vacuolada. **C** y **D**: Polen bicelular **E** y **F**: Polen tricelular. Figs. **G-N**: Desarrollo androgénico, se hacen patentes más cuerpos fluorescentes (puntas de flecha). **G** y **H**: microspora tras el pretratamiento de inducción con manitol, la marca es muy escasa. **I** y **J**: polen multicelular obtenido tras 3 días de cultivo. La microspora que parece muerta no presenta fluorescencia, la que presenta varias células aparece marcada. **K** y **L**: Polen multicelular heterogéneo obtenido tras 6 días de cultivo. Ambos tipos celulares presentan fluorescencia, el marcado es más abundante y se concentra en forma de cuerpos proteicos que no son visibles mediante tinción con azul de toluidina. **M** y **N**: Polen multicelular heterogéneo obtenido tras 9 días de cultivo en el que la pared se está rompiendo. Ambos tipos celulares presentan inmunofluorescencia.. Barras 20µm.

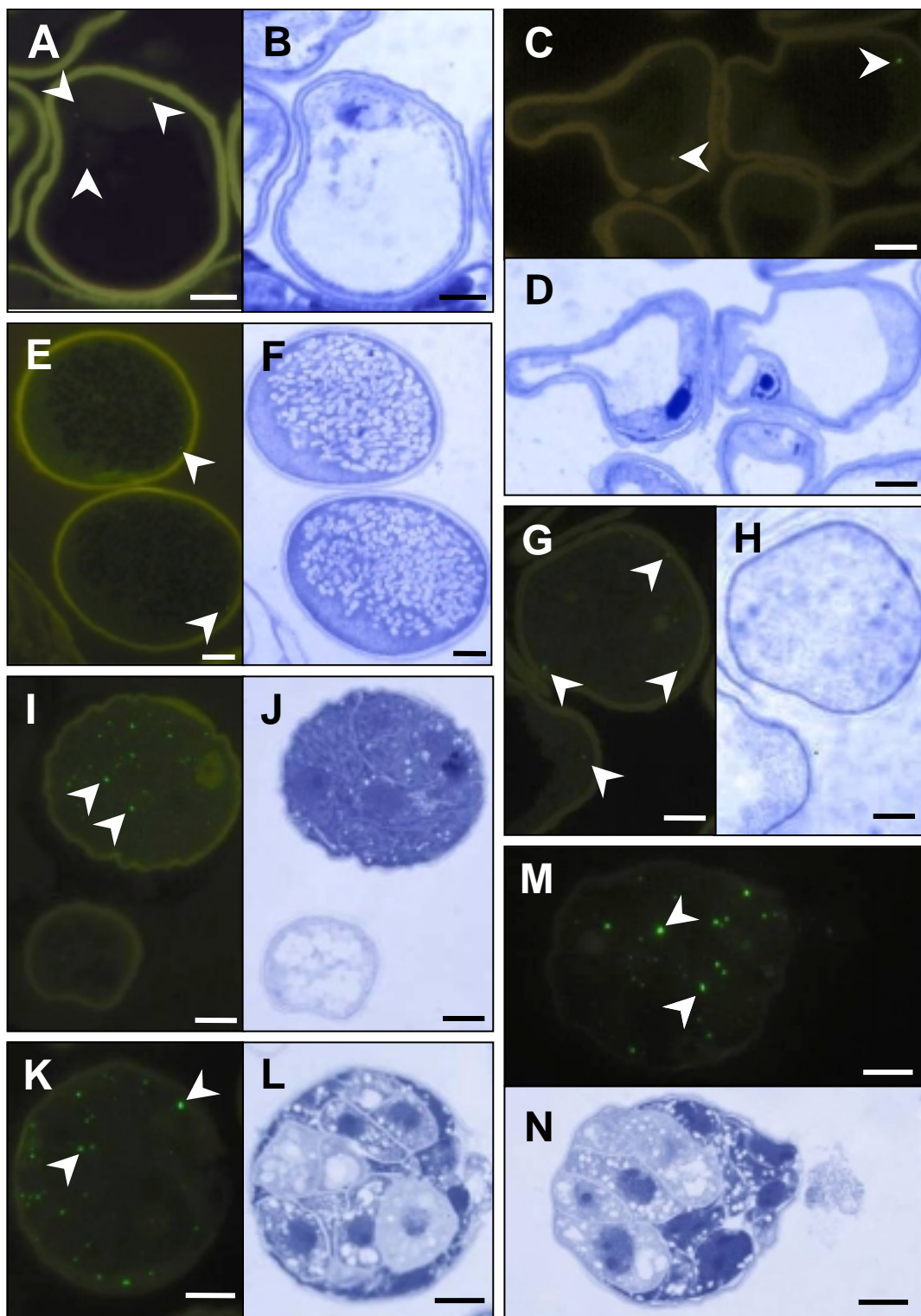


Fig. 37

Fig. 38. Inmunolocalización de hordeínas en androgénesis y embriogénesis zigótica. Figs. **A-E:** Desarrollo androgénico. **A.** Proembrión androgénico obtenido tras 13 días de cultivo la inmunofluorescencia se concentra en pequeños cuerpos proteicos (puntas de flechas blancas). **C-E:** Proembrión androgénico obtenido tras 18 días de cultivo. **B:** Cuerpos proteicos (puntas de flecha blanca) que presentan algo de fluorescencia en su superficie. **C y D:** Cuerpos proteicos que no presentan fluorescencia (flechas). **E:** tinción con azul de toluidina de la imagen correspondiente a la fig. E. Figs. **F y G:** Embrión zigótico 10 DPA, inmunolocalización e imagen equivalente en azul de toluidina respectivamente. No aparece marcado en las células del embrión que se encuentra en el estadio escutelar temprano. Las barras representan 20 μm .

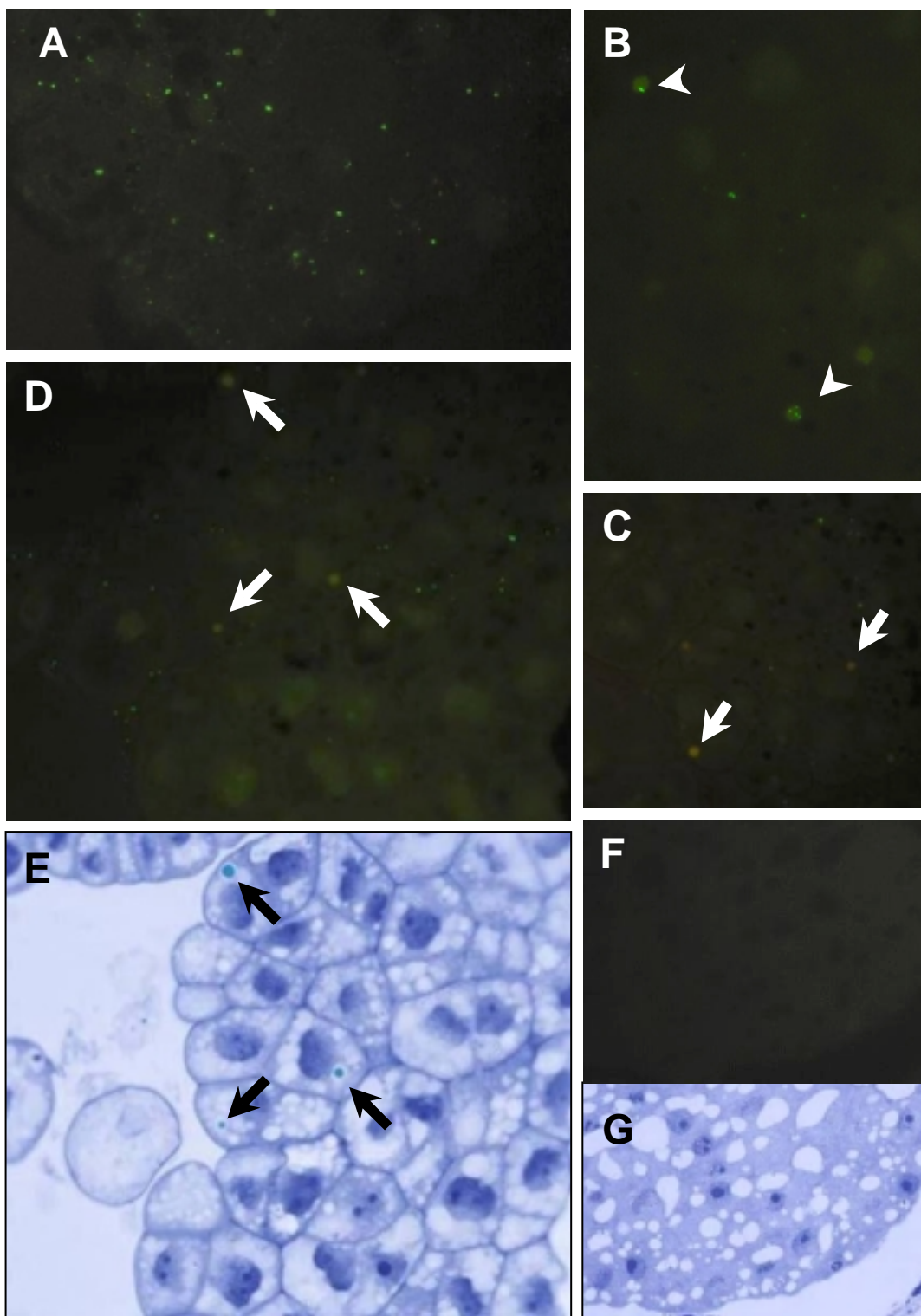


Fig. 38

6. EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE LA INDUCCIÓN Y LAS PRIMERAS ETAPAS DE LA ANDROGÉNESIS.

La androgénesis supone el paso de las microsporas de la ruta gametofítica a la vía esporofítica, por ello se seleccionaron algunos genes implicados en estos procesos y estudiamos su expresión mediante RT-PCR e hibridación *in situ*. Para gametogénesis elegimos el gen homólogo en cebada al de una poligalactarunosa de polen de maíz al que hemos denominado *Hvpg1*, para androgénesis el gen *ECA1*, para embriogénesis zigótica los genes ortólogos en cebada a los genes *EMB615* y *Naglu* (*HvEMB615* y *HvNaglu*) y como marcador de endospermo el gen *END1* de cebada. *EF1a* es el gen del factor de elongación 1-alpha que se expresa de manera constitutiva en todos los tejidos.

Las dos técnicas utilizadas fueron aplicadas a muestras obtenidas en distintas etapas de la androgénesis: A3, C3 y C13 (en el caso de la hibridación *in situ* también se estudiaron en C6 y C9), de la gametogénesis: A0, P9 y P12 y de la embriogénesis: S10 y E14. Los resultados de la expresión temporal de estos genes a lo largo de los distintos puntos de los tres procesos descritos (gametogénesis, androgénesis y embriogénesis zigótica) obtenidos mediante RT-PCR coinciden con los datos obtenidos mediante hibridación *in situ* pero con esta última técnica además obtuvimos información sobre su localización espacial.

Aunque se describirán los resultados obtenidos para cada uno de estos genes, en la figura 39 se presentan juntos los resultados de la expresión de todos los genes mediante RT-PCR. Además, también se estudió la expresión de los genes *Hvpg1*, *HvEMB615* y *HvNaglu* en hoja (fig. 40). Los ARNs de las distintas muestras fueron tratados con DNAsas para eliminar las posibles contaminaciones de DNA genómico,

purificados y sometidos a RT-PCR con los primers de la tabla 4 (materiales y métodos): POLY, ECA, NAGLU, 615, END y EF. En todos los casos se utilizó como control positivo ADN genómico y también se realizó un control negativo para el que no se añadió molde al tubo de PCR.

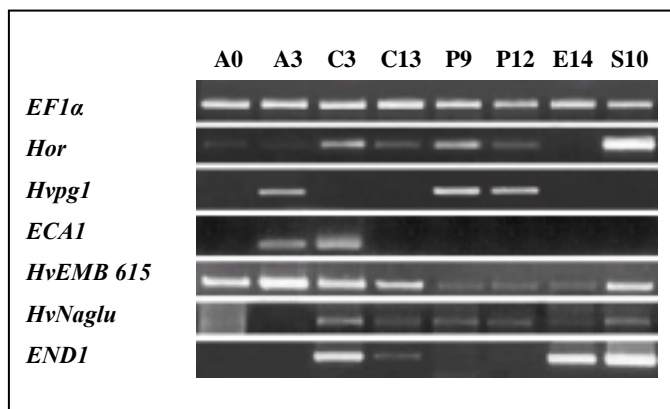


Fig. 39. Expresión de todos los genes estudiados mediante RT-PCR. Los genes estudiados son: gen implicado en gametogénesis: *Hvp1*, gen implicado en la androgénesis: *ECA1*, genes implicados en la embriogénesis zigótica: *HvEMB615*, *HvNaglu* y *Hor* (gen de la hordeína B1) y gen expresado en endospermo: *END1*. *EF1α*: gen del factor de elongación 1α de cebada. A0: microspora vacuolada. A3: microsporas tras el pretratamiento de inducción. C3: microsporas cultivadas durante 3 días. C13: microsporas cultivadas durante 13 días. P9: polen tricelular 9 días después de microspora vacuolada. E14: embriones diseccionados 14 DPA. S10: semillas en formación 10 DPA.

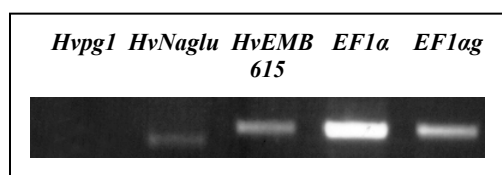


Fig. 40. Expresión de los genes *Hvp1*, *HvNaglu*, *HvEMB615* y *EF1α* en hoja mediante RT-PCR. *EF1αg*: Amplificación mediante PCR del gen *EF1α* sobre ADN genómico.

6.1. Gen expresado en la gametogénesis: *Hvpg1*

De los genes expresados en gametogénesis se seleccionó el gen ortólogo en cebada al de una poligalacturonasa de maiz que había sido descrito como un gen de expresión tardía, es decir, se expresaba tras la división haploide de la microsporas. Así, *Hvpg1* es un fragmento de 353 bp de un gen homólogo al gen de una poligalacturonasa de polen de *Zea mays* (número de acceso a GenBank X57628). Su aislamiento se realizó a partir de RT-PCR utilizando los oligos Poly5 y Poly3 obtenidos a partir de la secuencia EST BQ753380 de cebada disponible en la base de datos.

Los resultados de expresión mediante RT-PCR muestran que este gen, como se puede ver en la figura 41, no se expresaba en microspora vacuolada (A0) pero sí lo hacía tras el pretratamiento de inducción androgénica (A3). También se detectó expresión en polen tricelular (P9) y en polen maduro (P12). Este gen no se expresaba ni en el embrión zigótico ni en las semillas en formación, tampoco se expresa en los polenes multicelulares obtenidos tras la inducción androgénica. En la figura 40 podemos ver que este gen no se expresaba tampoco en hoja.

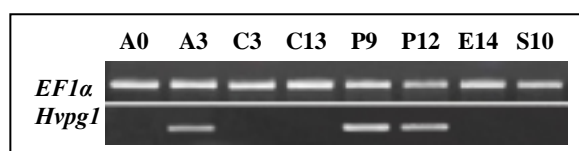


Fig. 41. Expresión mediante RT-PCR del gen de una poligalacturonasa de polen (*Hvpg1*), *EF1α*: gen del factor de elongación 1 α de cebada. A0: microspora vacuolada. A3: microsporas tras el pretratamiento de inducción. C3: microsporas cultivadas durante 3 días. C13: microsporas cultivadas durante 13 días. P9: polen tricelular 9 días después de microspora vacuolada. E14: embriones diseccionados 14 DPA. S10: semillas en formación 10 DPA.

Los resultados de hibridación *in situ* utilizando un ARN antisense marcado con digoxigenina (fig. 42) muestran que los transcritos de este gen no estaban presentes en las microsporas vacuoladas ni en el tapetum (fig. 42A). En el polen bicelular joven (fig. 42B) y en el polen tricelular (fig. 42C) encontramos marcado que también está presente en las células del tapetum (fig. 42B). Tras la inducción androgénica con manitol, las microsporas presentaban poca marca (fig. 42D) pero los tejidos de la antera no estaban marcados. Los controles realizados con la correspondiente sonda sense no presentaron marca. Tampoco se observaron granos de plata en estructuras como la pared, vacuolas o los granos de almidón al hibridar con la sonda antisense.

6.2. Gen expresado durante la androgénesis: *ECA1*.

El gen *ECA1* cuya expresión había sido descrita como específica de androgénesis en cebada se estudió además de en este proceso, en distintos estadios de la gametogénesis y de la embriogénesis zigótica. Utilizando la pareja de oligos Eca5 y Eca3 (Tabla 4) se amplificó un fragmento de 322 bp del gen *ECA1* (número de acceso a GenBank AF109193). Los resultados de la RT-PCR (fig. 43) muestran que este gen se expresaba únicamente tras el pretratamiento de inducción de 3 días en manitol (A3) y después de 3 días de cultivo (C3).

Los resultados de hibridación *in situ* utilizando una sonda antisense de este gen (fig.44) confirmaron que los transcritos de este gen no estaban presentes en las microsporas vacuoladas (fig. 44E) sin embargo si se observaba ya marca en las microsporas tras el pretratamiento de inducción con manitol (fig. 44F) y tras 3 (C3) (fig. 44G). Estos resultados también mostraron que posteriormente, en el polen multicelular obtenido 6 (C6) (fig.44H) y 9 (C9) (fig. 44I) días de cultivo

tras el pretratamiento de inducción, seguía existiendo marcado. Además, en los granos multicelulares heterogéneos el marcado estaba presente en los dos tipos celulares de estos granos (fig. 44I).

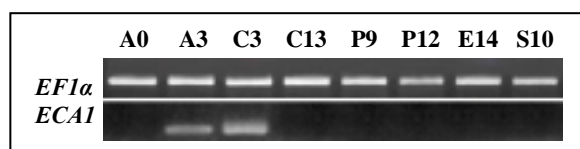


Fig. 43. Expresión del gen *ECA1* obtenida mediante RT-PCR. *EF1α*: gen del factor de elongación 1α de cebada. A0: microspora vacuolada. A3: microsporas tras el pretratamiento de inducción. C3: microsporas cultivadas durante 3 días. C13: microsporas cultivadas durante 13 días. P9: polen tritelular 9 días después de microspora vacuolada. E14: embriones diseccionados 14 DPA. S10: semillas en formación 10 DPA.

Fig. 42. Localización mediante hibridación *in situ* (HIS) al microscopio óptico de los transcritos de *Hvpg1* (gen de una poligalacturonasa de polen) y *ECA1* (gen de androgénesis). Tinción con safranina. Figs. **A-D**: HIS para *Hvpg1*. Fig. **A-C**: Desarrollo gametofítico. **A**: microsporas vacuoladas (A0) en la que no aparece marcado. **B** y **C**: polen bicelular joven y polen tritelular (P9) respectivamente en las que aparece abundante marcado (flechas negras), también hay marcado en el tapetum (T). Tanto la vacuola (V) como los granos de almidón (al) aparecen libres de marca. **D**: Microspora tras el pretratamiento de inducción (A3), presenta escaso marcado. Figs. **E-I**: HIS para *ECA1*. **E**: Microspora vacuolada antes de sufrir el pretratamiento (A0), no presenta marcado. Figs. **F-I**: Desarrollo androgénico. **F**: Microspora tras el pretratamiento de inducción con manitol (A3), presenta ya marcado, aunque este es escaso. **G** y **H**: granos de polen multicelulares obtenidos tras 3 (C3) y 6 (C6) días de cultivo respectivamente que presentan abundante marcado distribuido en todas las células que los componen. **I**: grano de polen multicelular heterogéneo liberándose de la pared de la microspora tras 9 días de cultivo (C9). El marcado aparece en ambos tipos celulares. Las barras representan 20 μm.

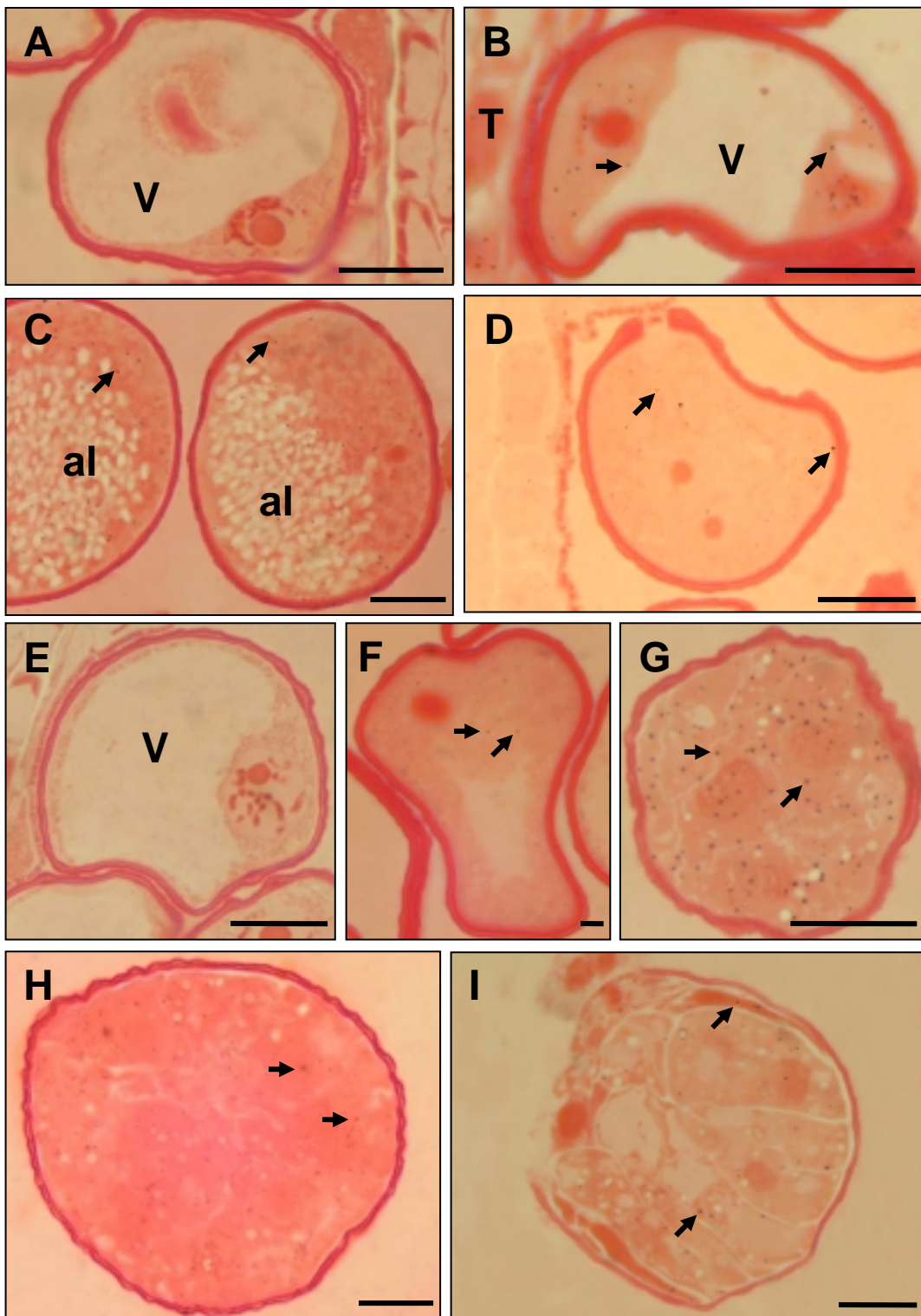


Figura 42

6.3. Genes implicados en la embriogénesis zigótica: *HvEMB615* y *HvNaglu*

Como genes implicados en la embriogénesis zigótica se seleccionaron los genes ortólogos en cebada de dos genes responsables de mutaciones que afectaban a las primeras etapas de la embriogénesis zigótica en *arabidopsis* (*EMB615* y *Naglu*).

6.3.1. *HvEMB615*.

HvEMB615 es un fragmento de 497 bp de un gen homólogo al gen *EMB615* de *A. thaliana* cuya secuencia nos fue proporcionada por la Dra. Martine Devic “Laboratoire Génome et développement des plantes” de la Universidad de Perpignan (Francia). Su aislamiento se realizó mediante RT-PCR utilizando la pareja de oligos 615F y 615R (tabla 4) diseñados a partir de la secuencia EST de cebada AV835069 disponible en la base de datos.

Los resultados de expresión para este gen obtenidos mediante RT-PCR aparecen en la figura 44. Así, se observó que este gen se expresaba en microspora vacuolada antes (A0) y después de la inducción androgénica (A3), y en proembriones androgénicos obtenidos tras 3 y 13 días de cultivo (C3) y (C13). Como era de esperar, al tratarse un gen de embriogénesis zigótica, también se produjo amplificación en semillas de cebada en formación 10 días tras la antesis (S10) y en embriones zigóticos diseccionados 14 días después de la antesis (E14). Este gen también se expresa durante el desarrollo gametofítico en microsporas vacuoladas, polen tricelular y polen maduro (A0, P9 y P12). En la figura 40 además se puede ver que este gen también se expresa en hoja.

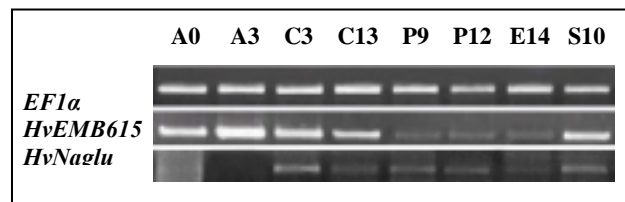


Fig. 44. Expresión de los genes *HvEMB615* y *HvNaglu* obtenida mediante RT-PCR. *EF1 α* : gen del factor de elongación 1 α de cebada. A0: microspora vacuolada. A3: microsporas tras el pretratamiento de inducción. C3: microsporas cultivadas durante 3 días. C13: microsporas cultivadas durante 13 días. P9: polen tricelular 9 días después de microspora vacuolada. E14: embriones diseccionados 14 DPA. S10: semillas en formación 10 DPA.

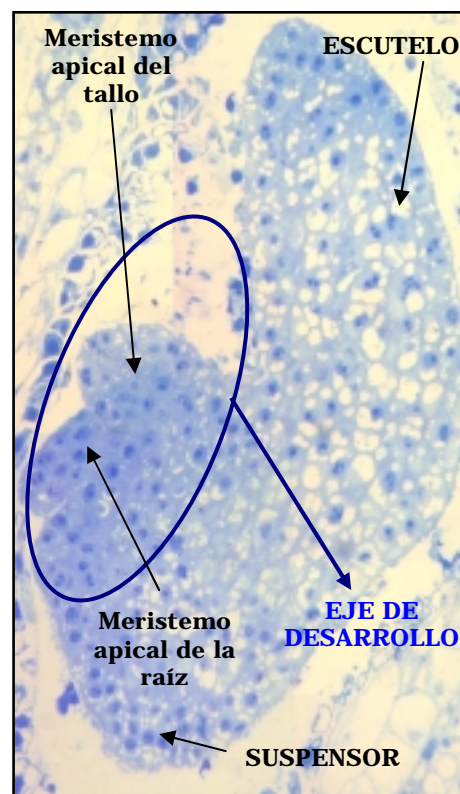


Fig. 45. Sección longitudinal de un embrión zigótico en formación 10 DPA.

Los resultados de hibridación *in situ* utilizando la correspondiente sonda antisense para este gen (fig. 46) confirman los resultados obtenidos mediante RT-PCR y muestran que este gen se expresa en el grano de

polen en desarrollo tanto en microsporas vacuoladas (A0) (fig. 46A) como en polen bicelular y en polen tritelular (P9) (fig. 46B) y también en las microsporas tras el pretratamiento de inducción androgénica (A3)(fig. 46 C) y tras 3 (C3) (fig. 46D), 6 (C6), 9 (C9)(fig. 46E) y 13 (C13) días de cultivo. Además el gen *EMB615* parece expresarse igualmente en los dos tipos celulares presentes en los granos de polen multicelulares heterogéneos (fig. 46E). El marcado se distribuye también homogéneamente en el embrión zigótico 10 DPA (fig. 46F) que se encuentra en el estadio escutelar temprano y en el que ya se puede diferenciar el meristemo apical de la raíz y el meristemo apical del tallo (fig.45). También aparece marcado en el endospermo.

6.3.2. *HvNaglu*

Mediante RT-PCR con los oligos Nag5 y Nag3 se amplificó un fragmento de 354bp de un gen homólogo al gen *Naglu* de *A. thaliana* cuya secuencia nos fue proporcionada por la Dra. Martine Devic “Laboratoire Génome et développement des plantes” de la Universidad de Perpignan (Francia). Los oligos Nag5 y Nag3 (tabla 4) fueron diseñados a partir de la secuencia EST de cebada BG301263 disponible en la base de datos.

Fig. 46. Localización mediante hibridación *in situ* al microscopio óptico de los transcritos de *HvEMB615* (gen de embriogénesis zigótica). Tinción con safranina. Fig. **A:** Microspora vacuolada (A0) con marca (puntasnegras), la vacuola (V)no presenta marcado. Fig. **B:** Polen tritelular (P9), el almidón (al) aparece libre de marca. Figs **C-D:** Desarrollo androgénico. **C:** Microspora tras el pretratamiento de inducción (A3) presenta marcado. **D:** Granos de polen multicelulares homogéneos y heterogéneos obtenidos tras 9 días de cultivo (C9), ambos presentan marcado. Los dos tipos celulares del grano tienen marca. Fig. **E:** Embrión zigótico 10 DPA, estadio escutelar, está homogéneamente marcado en el citoplasma. Las barras representan 20 μ m.

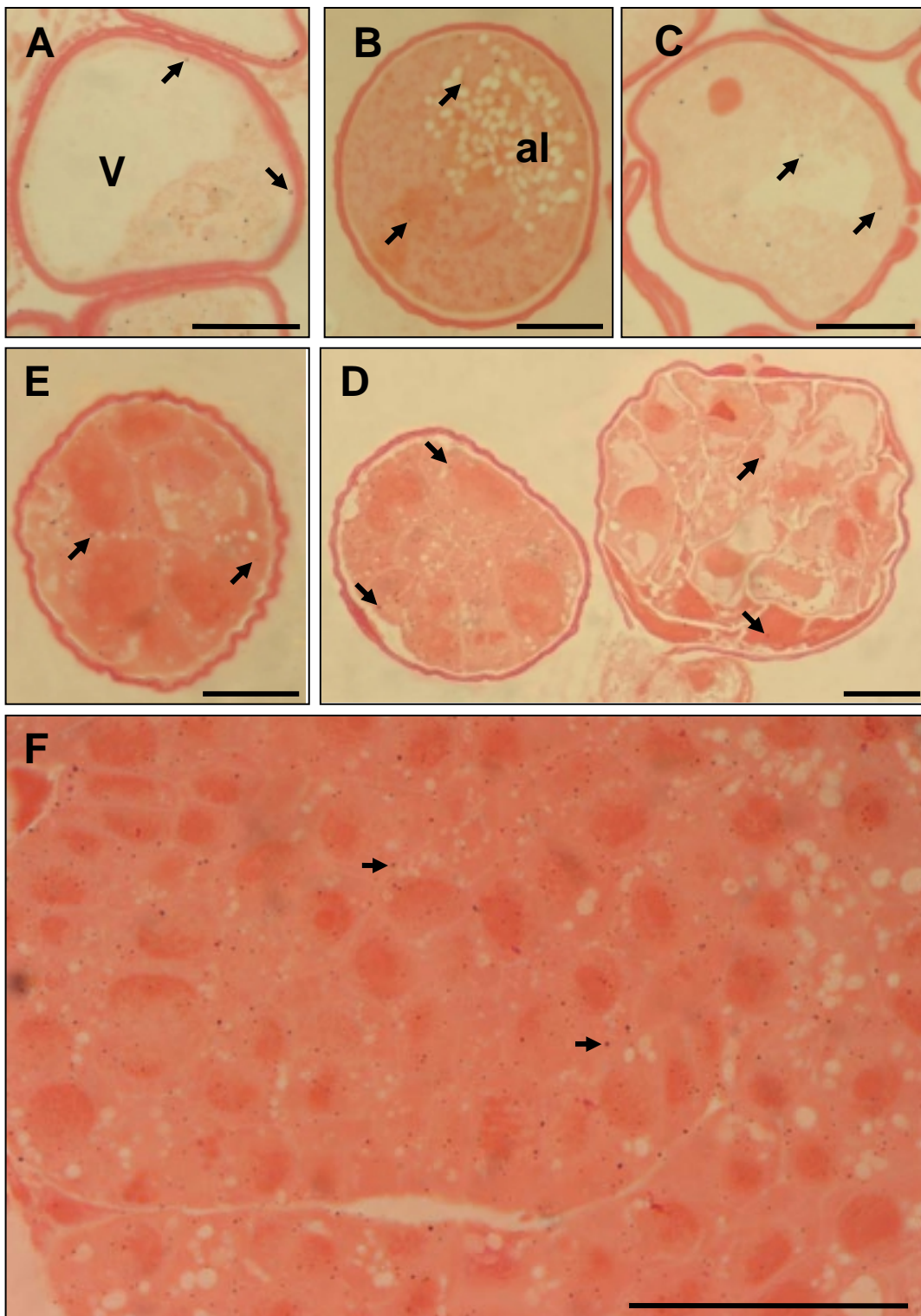


Fig. 46

Los resultados de RT-PCR (fig. 44) mostraron que este gen se expresaba durante el desarrollo gametofítico en microspora vacuolada (A0), polen tricelular (P9) y polen maduro (P12). No había amplificación tras el pretratamiento de inducción con manitol (A3). Sin embargo este gen sí se expresaba tras 3 y 13 días de cultivo (C3 y C13). En el desarrollo zigótico el gen se expresaba tanto en el embrión diseccionado (E14) como en la semilla en formación 10 DPA (S10). Sin embargo, las bandas correspondientes a A0, C13, P9, P12 y E14 eran muy débiles, lo mismo ocurría en hoja (fig. 40).

Fig. 47. Localización mediante hibridación *in situ* al microscopio óptico de los transcritos de *HvNaglu* (gen de embriogénesis zigótica). Tinción con safranina. Figs. **A-C**: Desarrollo gametofítico. Fig. **A**: Microspora vacuolada, presenta muy poco marcado. El tapetum (T) también aparece marcado. Figs. **B** y **C**: Polen bicelular y tricelular respectivamente. El marcado no es muy abundante. No aparecen marcados la vacuola (V) ni el almidón (al). Figs. **D-G**: Desarrollo gametofítico. Fig. **D**: microspora tras el pretratamiento de inducción que no presenta marcado. **E**: Polen multicelular obtenido tras 3 días de cultivo que presenta abundante marcado. **F**: Polen multicelular obtenido tras 6 días de cultivo. **G**: Polen multicelular heterogéneo tras 9 días de cultivo prácticamente liberado de la pared de la microspora. La marca, abundante, aparece en los dos tipos de células presentes en el grano. Fig **H** e **I**: Desarrollo zigótico, 10 DPA. **H**: Endodermo, presenta poca marca. **I**: Embrión, hay muy poca marca que se distribuye uniformemente en todo el embrión escutelar. Las barras representan 20 μm salvo que se indique otro valor.

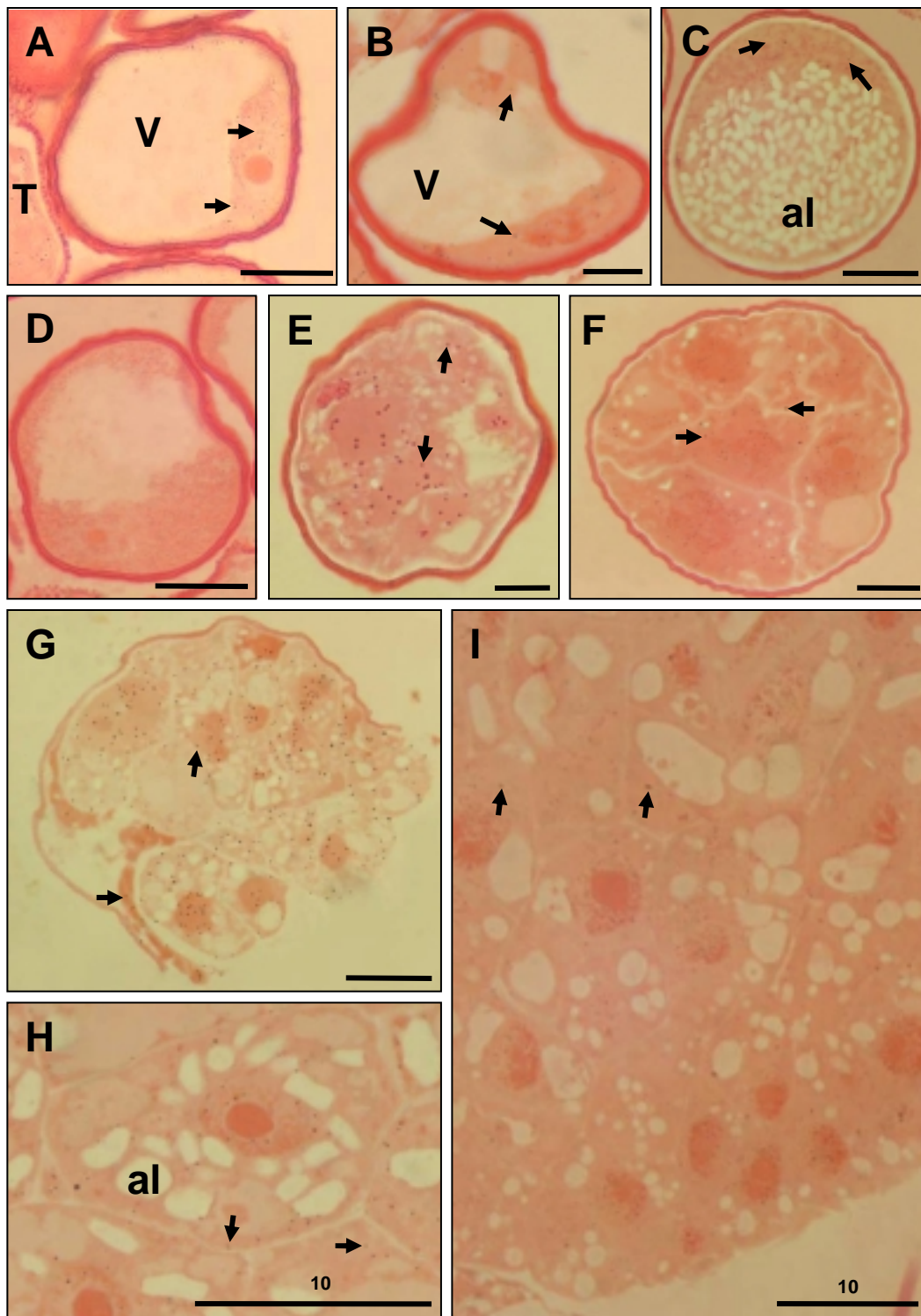


Fig. 47

Mediante hibridación *in situ* (fig. 47) se confirmaron los resultados obtenidos mediante RT-PCR. Por otro lado esta técnica permitió observar la presencia de transcritos de este gen en las células del tapetum además de en las microsporas vacuoladas (A0) (fig. 47A), en el polen bicelular joven (fig. 47B) y el polen tricelular (P9) (fig. 47C). No se encontró marca tras el pretratamiento de inducción con manitol (fig. 47D) pero sí se encontró abundante marca en los granos de polen multicelulares obtenidos tras 3 (C3) (fig. 47E), 6 (C6) (fig.47F), 9 (C9)(fig. 47G) y 13 (C13)días de cultivo. También se observó la presencia de marcado en el tapetum en las anteras cultivadas durante 6 días (C6). Por otro lado, al igual que en el caso del gen *EMB615* tras la observación de un gran número de granos multicelulares heterogéneos no se encontraron diferencias en la presencia de transcritos en los dos tipos celulares (fig. 48G). En el embrión zigótico 10 DPA (Fig. 47I) el escaso marcado se distribuía homogéneamente en todo el embrión que se encontraba en el estadio escutelar temprano. Los transcritos tampoco eran muy abundantes en el endospermo 10 DPA (fig. 47H).

Fig. 48. Localización mediante hibridación *in situ* al microscopio óptico de los transcritos de *End1* (gen de endospermo).Tinción con safranina. Fig. **A:** Microspora vacuolada antes de la inducción androgénica, no presenta marcado. Figs. **B-D:** Desarrollo androgénico. **B:** Polen multicelular obtenido tras 3 días de cultivo, presenta marcado en todas las células. **C:** Polen multicelular heterogéneo obtenido tras 6 días de cultivo, los dos tipos celulares presentan marcado. **D:** Polen multicelular obtenido tras 13 días de cultivo. Figs. **E y F:** Desarrollo zigótico. **E:** endospermo 10 DPA. **F:** embrión zigótico 10 DPA en estadio escutelar, el marcado se distribuye en todo el embrión.

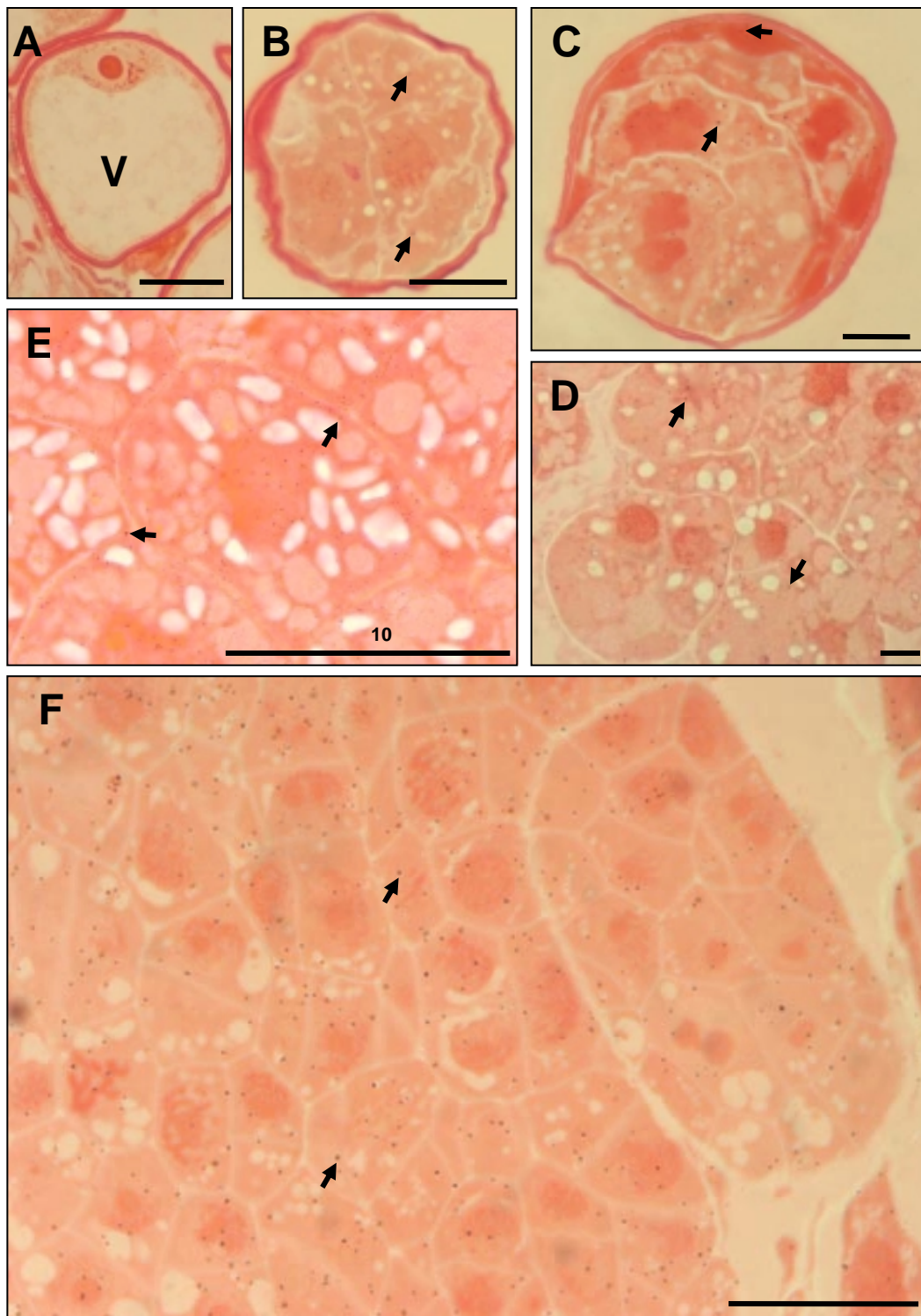


Fig. 48

6.4. Gen expresado en el endospermo: *END1*.

Se amplificó un fragmento de 422 bp del gen *END1* de cebada (Z69631) utilizando la pareja de oligos End5 y End3 (tabla 4). Mediante RT-PCR (fig. 49) se observó que este gen no se expresa en microsporas ni antes (A0) ni después del pretratamiento de estrés (A3), sin embargo sí se expresa tras 3 y 13 días de cultivo (C3 y C13). En cuanto al desarrollo zigótico, este gen se expresaba fuertemente en las semillas en formación 10 DPA (S10) y también en los embriones zigóticos diseccionados 14 DPA (E14). Estos resultados también mostraron que el gen *END1* no se expresa durante el desarrollo gametofítico (A0, P9 y P12).

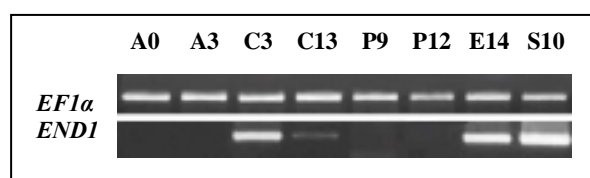


Fig. 49. Expresión del gen *END1* obtenida mediante RT-PCR. *EF1α*: gen del factor de elongación 1 α de cebada. A0: microspora vacuolada. A3: microsporas tras el pretratamiento de inducción. C3: microsporas cultivadas durante 3 días. C13: microsporas cultivadas durante 13 días. P9: polen tricelular 9 días después de microspora vacuolada. E14: embriones diseccionados 14 DPA. S10: semillas en formación 10 DPA.

Los resultados de hibridación *in situ* utilizando una sonda antisense de este gen (fig. 48) mostraron que no se expresaba en las microsporas antes (A0)(fig. 48A) ni después del pretratamiento de inducción. Sí se expresaba en el polen multicelular y en los proembriones androgénicos obtenidos tras 3 (C3)(fig. 48B), 6 (C6), 9 (C9)(Fig. 48C) y 13 (C13) (fig. 48D) días de cultivo. Al igual que con los otros genes estudiados, en la preparación en general no se observaron grandes diferencias en la expresión de este gen en los dos tipos celulares

presentes en los granos de polen multicelulares heterogéneos (fig. 48D). En cuanto al desarrollo zigótico, se confirmó la presencia de transcritos de *END1* en el endospermo (fig. 48E) y en el embrión zigótico de cebada 10 DPA (fig. 48F). Tampoco se encontraron diferencias en la localización de estos transcritos en el embrión zigótico en estadio escutelar.



Discusión

1. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LA INDUCCIÓN Y PRIMERAS ETAPAS DE LA ANDROGÉNESIS.

Una característica general de la androgénesis obtenida mediante cultivo de anteras es que la respuesta al pretratamiento de inducción androgénica no es homogénea ni está sincronizada (Raghavan, 1997). En cultivo de anteras de cebada, nosotros tampoco hemos conseguido una respuesta homogénea ni utilizando el pretratamiento de frío ni el pretratamiento con manitol.

Cuando se inició la inducción de androgénesis en cultivo de microsporas aisladas uno de los objetivos era conseguir, entre otras cosas, aumentar la producción de embriones. Se intentó buscar un método que seleccionara las microsporas embriogénicas, así se habló de granos P (Heberle-Bors y Reinert, 1979) o de granos S (Horner y Street, 1978; Kyo y Harada, 1986) que responderían bien a la inducción. Sin embargo, no se ha conseguido obtener estructuras multicelulares de todas las microsporas cultivadas ni que todas evolucionen al mismo tiempo. Así, después de unos días de cultivo siempre se encuentran microsporas que no se dividen y microsporas que se han dividido un número distinto de veces, estando unas más adelantadas que otras en el desarrollo androgénico. En nuestro caso en cebada tampoco conseguimos obtener una respuesta homogénea ni sincrónica cuando empleamos el cultivo de microsporas aisladas a pesar de que intentamos partir de una población homogénea. Otros autores utilizando diferentes pretratamientos de inducción y diferentes sistemas de purificación de las microsporas tampoco han conseguido homogeneizar la respuesta (Magnard *et al.*, 2000; Hoekstra *et al.*, 1992). De esto se puede deducir que la respuesta no homogénea a los tratamientos de inducción no se debe a factores externos sino que es algo intrínseco a las propias microsporas. En numerosas especies se ha observado que en una misma

antera se encuentran microsporas o granos de polen con dos tipos de morfologías diferentes (dimorfismo del polen) y que además están predispuestos a desarrollarse de forma distinta tras la inducción androgénica. Normalmente las microsporas más grandes tienen más tendencia a seguir la ruta gametofítica mientras que las más pequeñas tienden a seguir la esporofítica. Nuestras observaciones confirman la existencia de dimorfismo en cebada descrito por otros autores (Dale, 1975; Idzikowska *et al.*, 1982; Roberts-Oehlschlager y Dunwell, 1991). Los granos de polen dimórficos más pequeños y ligeramente menos teñidos han sido descritos en diferentes especies: *Paeonia* (Sunderland y Huang, 1985), otros cereales como *Secale cereale* (Wenzel y Thomas, 1974), *Triticum monococum* (Tan y Halloran, 1982) y también en *Nicotiana tabacum* (Horner y Street, 1978). Estos últimos autores encontraron en tabaco una correlación positiva entre el número de granos de polen dimórficos y el de los embriones androgénicos desarrollados *in vitro*, es decir que los granos dimórficos más pequeños serían los que parecen responder a la inducción androgénica. En cebada, Idzikowska *et al.* (1982) mostraron la existencia de pequeños granos dimórficos presentes siempre en el centro del lóculo de la antera sin contacto con el tapetum. Sin embargo el número de microsporas más pequeñas localizadas en el centro del lóculo de la antera era menor que el de embriones obtenidos (Roberts-Oehlschlager y Dunwell, 1991). Además estos autores observaron que había estructuras multicelulares que se desarrollaban a partir de granos de polen situados en la periferia de la antera. Sin embargo nosotros, estudiando secciones longitudinales de la antera en lugar de las transversales de los autores antes citados, hemos encontrado microsporas más pequeñas dimórficas no sólo en el centro del lóculo sino también en su periferia (Pulido *et al.*, 2001a). La existencia de esas microsporas más pequeñas en la periferia del lóculo, que no había sido descrita previamente, podría explicar la presencia de

los granos multicelulares detectados en esta posición y también el mayor número de estructuras multicelulares encontradas. Se han intentado distintos métodos para enriquecer los cultivos de microsporas aisladas en microsporas más androgénicas pero hasta la fecha no se ha conseguido. Pensamos que la predisposición a la androgénesis es un rasgo genético que hemos postulado que podría ser un rasgo atávico (la capacidad del polen para formar estructuras multicelulares) (Bonet *et al.*, 1998), que no siempre tiene que venir unida a un rasgo morfológico de la microspora o del grano de polen.

1.1. Rutas androgénicas en la androgénesis de cebada.

Independientemente del pretratamiento de estrés utilizado, manitol o frío, y de que se utilizara para la inducción cultivo de anteras o de microsporas aisladas las primeras divisiones androgénica producto de la inducción fueron siempre de dos tipos: simétricas y asimétricas, aunque predominaron las simétricas. Esto coincide con los resultados de otros autores entre ellos los de Kasha *et al.* (2001). A esta primera división androgénica, le sucedieron nuevas divisiones con la puesta en cultivo en medio rico en el que se sustituye el manitol por maltosa. En el caso de las divisiones asimétricas, tras la primera división que dio como resultado dos células de características morfológicas parecidas a las de las células generativa y vegetativa presentes en el polen bicelular, se sucedieron otra serie de divisiones, bien únicamente de la célula vegetativa o bien de las dos células. Estos resultados muestran que el polen androgénico de cebada sigue fundamentalmente las rutas A y B que Raghavan cita en la revisión de (1997) y que también siguen una ruta no descrita como tal por Raghavan que hemos incluido en la figura 51 como ruta F. Indicios de esta ruta F habían sido apuntados en trabajos realizados en *Nicotiana tabacum* (Anand *et al.*, 1980) y en

algunos cereales entre los que está la cebada (Bouharmont, 1977; Sunderland *et al.*, 1979).

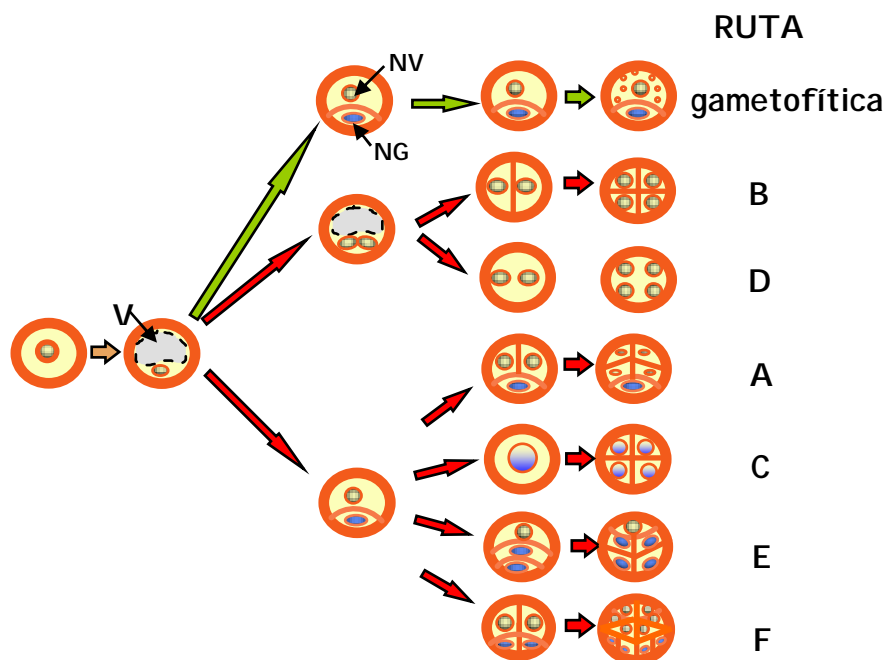


Fig. 51. Esquema de la ruta gametofítica y posibles rutas androgénicas del polen. (Basado en el esquema de Raghavan (1997)). NV: Núcleo vegetativo. NG: Núcleo generativo. V: vacuola.

La tinción con DAPI sobre aplastados nos fue de gran ayuda para determinar la naturaleza de estas primeras divisiones. Además permitió contar el número total de núcleos presentes en estos granos multinucleados, que resultó ser casi siempre un número par, lo que indicaba que el polen sigue principalmente las rutas B y F de la figura 51. Estos resultados están de acuerdo con los de otros autores, que utilizando otros pretratamientos y otros medios de cultivo habían descrito que el polen androgénico de cebada seguía estas tres rutas (Sunderland *et al.*, 1979, Chen *et al.*, 1984a) y también apuntaban que el polen de cebada podía seguir una cuarta ruta, la ruta C, lo que ha sido

mostrado posteriormente por Kasha *et al.*, 2001. En esta ruta, tras la división simétrica o asimétrica de la microspora, se produce la fusión de los núcleos generativo y vegetativo para dar lugar a un único núcleo que posteriormente se sigue dividiendo para dar lugar al embrión, aunque también era posible que las fusiones se produjeran entre los núcleos producto de divisiones posteriores. Nosotros no hemos observado estas fusiones pero sí se ha observado un aumento de ploidía que se discutirá más adelante.

En relación con las rutas androgénicas anteriormente citadas, a los 6 días de cultivo mediante tinción de secciones con azul de toluidina, observamos dos tipos diferentes de granos de polen multicelulares: unos a los que hemos llamado homogéneos que están formados únicamente por un sólo tipo de células, y otros a los que hemos denominado heterogéneos que están formados por dos tipos celulares distintos: unas células de citoplasma muy denso situadas en la periferia del grano y otras células de citoplasma menos denso situadas en el centro del grano de aspecto similar a las de las que forman los granos homogéneos (Pulido *et al.*, 2001a). Los granos multicelulares homogéneos que tienen todas sus células iguales entre sí, parecen proceder de una primera división simétrica de la microspora y seguir la ruta B. El hecho de que los granos multicelulares heterogéneos contengan dos tipos celulares diferentes y la disposición de estos tipos celulares dentro de estos granos hace pensar que proceden de una división asimétrica de la microspora y que siguen la ruta F. Así, las células de citoplasma menos denso procederían de la división de la célula “vegetativa”, mientras que las células de citoplasma más denso, situadas en la periferia del grano, procederían de la célula “generativa”. La presencia de estas células de citoplasma denso dentro de los granos de polen multicelulares de cebada ya había sido descrita anteriormente (Sunderland *et al.*, 1979; Chen *et al.*, 1984b; Huang, 1986) y Sunderland *et al.*, (1979) ya habían sugerido la procedencia de

estas células de la célula generativa.. Estas células de citoplasma denso también están presentes en otros cereales como trigo (Szakács y Barnabás, 1988) y maíz (Magnard *et al.*, 2000). Mediante tinción con DAPI también era posible distinguir los dos tipos celulares debido a las diferentes características que presentaban sus núcleos. Los núcleos de las células procedentes de la célula “generativa” tienen la cromatina más condensada que aquellos que pertenecen a las células que proceden de la célula “vegetativa”.

1.2. Dominios cenocíticos dentro de los granos de polen multicelulares

Como consecuencia del pretratamiento de inducción, los granos de polen sufren una serie de divisiones. Nuestros resultados tanto en cultivo de anteras como de microsporas aisladas muestran que en ocasiones, las primeras divisiones nucleares no estaban acompañadas de la formación de las correspondientes paredes, es decir, no se producía la citoquinesis. Esto ocurría en los granos multicelulares homogéneos y en las células de citoplasma menos denso de los granos multicelulares heterogéneos. Como consecuencia de estas divisiones nucleares sin las correspondientes citoquinesis, se formaban dominios de organización cenocítica similar a los que se forman al comienzo de la formación del endospermo (Olsen *et al.*, 1995 y 1999; Schweizer *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1996;). Estos dominios de organización cenocítica han sido descritos anteriormente en cebada (Wilson *et al.* 1978; Sunderland *et al.*, 1979; Chen *et al.*, 1984a ; Huang, 1986) y en otras especies (Magnard *et al.*, 2000, Testillano *et al.*, 2002). Mediante microscopía óptica y electrónica observamos que en estos dominios las paredes celulares, formadas tras varias divisiones nucleares, crecían zigzagueantes a partir de la intina, dejando el otro extremo libre sin que coincida con otra pared. A este

extremo se le van incorporando nuevos materiales para la formación completa de la pared. Este mecanismo es similar al mecanismo de crecimiento libre propuesto para las paredes celulares en el endospermo (Newcomb, 1978; revs.: Olsen *et al.*, 1995, Heese *et al.*, 1998 y Berger, 1999). También observamos en otros dominios paredes formándose a partir del fragmoplasto y la placa celular, que es el mecanismo normal de formación de las paredes celulares vegetales. Estos dos mecanismos de formación de las paredes celulares ya habían sido descritos anteriormente en embriones de cebada por Idzikowska y Młodzianowski (1979) y Huang (1986).

1.3. Ploidía

Los embriones androgénicos se producen a partir de la división de las microsporas que poseen un número haploide de cromosomas, y por tanto, es de esperar que las células que componen estos embriones sean también haploides. Sin embargo, al contar el número de cromosomas en algunas células en división de los embriones androgénicos de cebada hemos observado que éste parecía ser superior a 7, que es el número de cromosomas que corresponde a una célula haploide de cebada. Aunque hay que decir, que no era fácil contar los cromosomas a partir de las secciones semifina porque algún cromosoma se puede quedar en otro plano con lo que no sería posible contarlos y también es posible que los cromosomas se encuentren plegados con lo que se cuenten de más. Pero además, hemos observado que algunos núcleos de los granos multicelulares poseían más de 2 nucleolos como se había descrito anteriormente (Wilson *et al.*, 1978). El número de organizadores nucleolares (NORs) y de nucleolos es una característica constante de cada especie y en cebada este número es 2 (Norstog, 1972). El hecho de que estas células tengan más de 2 nucleolos muestra que estas células

no son haploides y por tanto en ellas se ha producido un aumento de ploidía. La diploidización es un fenómeno que produce plantas dobles haploides que son de gran interés para la mejora vegetal. Normalmente la diploidización se induce mediante agentes químicos como la colchicina. Sin embargo, también se ha descrito que puede ocurrir espontáneamente en el cultivo de anteras y microsporas aisladas de distintos cereales, entre los que está incluida la cebada (Wilson *et al.*, 1978, Sunderland *et al.*, 1979; Chen *et al.*, 1984a; Chen *et al.*, 1984b; Kasha *et al.*, 2001) de manera que se ha observado que en trigo y cebada los dobles haploides fértiles representan del 75 al 85% de las plantas regeneradas (Höekstra *et al.*, 1992 y 1993; Hu y Kasha, 1999; Kasha *et al.*, 2001). Todos estos autores apuntaron a la fusión nuclear como mecanismo de diploidización y Chen *et al.* (1984b) además apuntó a que también se produce por endomitosis. En este sentido, nuestros resultados muestran que en ocasiones se producen divisiones nucleares que no están acompañadas de la formación simultánea de la pared celular produciéndose como se ha descrito anteriormente dominios de organización cenocítica. En estos dominios, la ausencia de la pared celular entre los núcleos favorecería la fusión nuclear ya que ésta supone un impedimento para esta fusión. Además, la limitación de este fenómeno de fusión nuclear a estos dominios cenocíticos explicaría el hecho de que en un mismo grano multicelular existan células haploides y células con un grado de ploidía mayor lo que es un fenómeno no muy extraño en androgénesis (Raghavan, 1997).

1.4. La evolución del polen multicelular al proembrión androgénico

En los granos de polen inducidos, tras la primera división androgénica, las células siguen dividiéndose continuamente dentro de la pared celular que originalmente rodeaba la microspora vacuolada, esta

pared adquiere como se discutirá más adelante unas características especiales. El grano de polen multicelular, encerrado dentro de esta pared, no puede aumentar demasiado su tamaño a pesar del número creciente de células. Después de 6 días de cultivo observamos por primera vez en algunos granos de polen multicelulares la ruptura de la pared que rodea al grano de polen que liberado de la presión de esta pared, aumenta su tamaño. La ruptura de la pared ocurre a partir de un punto de la pared celular y se extiende posteriormente a lo largo de todo el grano de polen. Nuestros resultados muestran que en los granos de polen heterogéneos casi siempre la ruptura de la pared celular ocurre en la parte de la pared próxima a las células de citoplasma más denso. Estas células de citoplasma más denso en este momento parecen estar muriendo: sus núcleos tienen la cromatina muy condensada, están lobulados y el citoplasma aparece lleno de vesículas. Todas estas características apuntan a que estas células están sufriendo un cierto grado de degeneración o de muerte celular. Conforme el grano de polen se va liberando de la pared, estas células muestran cada vez un aspecto más degradado, comienzan a disgregarse y a verter su contenido al medio. Por lo que sabemos una degeneración de las células de citoplasma denso semejante a la que hemos observado en cebada sólo había sido descrita con anterioridad en trigo (Szakács y Barnabás, 1988). El hecho de que la mayoría de los proembriones parezcan obtenerse a partir de la liberación de la pared de los granos multicelulares heterogéneos podría indicar que estos granos heterogéneos son los que predominantemente van a dar lugar a proembriones androgénicos. Sin embargo, hemos observado también ruptura de la pared en granos de polen homogéneos, aunque en una menor medida, y en la literatura en la que se han contemplado estos diferentes tipos de granos multicelulares en androgénesis de cebada indicaban que no hay un tipo en especial que degenere (Sunderland *et al.*, 1979). Lo que sí parece claro es que las

células de citoplasma denso degeneran antes de la completa liberación de la pared del polen ya que en los proembriones androgénicos no observamos este tipo de células. El hecho de que estos proembriones androgénicos carecieran de estas células densas nos hizo pensar, en un principio, que los granos multicelulares heterogéneos no iban a dar lugar a estos proembriones, sin embargo, ahora nos inclinamos a pensar que los proembriones androgénicos proceden tanto de los granos multicelulares homogéneos como de los heterogéneos que sufren una degeneración de las células procedentes de la célula generativa.

Nuestros resultados muestran que los proembriones androgénicos tienen un aspecto parecido al embrión globular zigótico cuando se liberan de la pared del polen y siguen un desarrollo paralelo al de los embriones zigóticos y somáticos de monocotiledóneas. Primero adquieren la forma de pera o bate y comienza a diferenciarse una capa de células en la superficie de iguales características que la protodermis (Pulido et al., 2001b). La protodermis es la primera etapa reconocible de la histogénesis en la embriogénesis y se caracteriza porque dentro de ella el plano de división de las células es estrictamente anticlinal dejando todas las células hijas en la misma capa superficial. Esto hace de esta capa un linaje celular independiente (Steeves y Sussex, 1989) a partir de la cual se desarrolla la epidermis (Laux y Jürgens, 1997). Como en la androgénesis de cebada, los proembriones androgénicos de otras especies parecen desarrollarse de manera muy similar a los embriones zigóticos correspondientes (Reynolds., 1997; Touraev *et al.*, 1997). Esto parece indicar que tras el pretratamiento de inducción se inician las primeras divisiones androgénicas y comienza un programa de expresión génica que, en gran medida, tiene que inducir la expresión de muchos de los genes que se expresan durante la embriogénesis zigótica. Lo mismo debe ocurrir con la embriogénesis somática ya que estos embriones también siguen un patrón de desarrollo muy parecido al de los

embriones zigóticos (Kohlenbach, 1978). En relación con el proceso de embriogénesis somática, en los embriones androgénicos de cebada hemos observado y descrito por primera vez la presencia de una matriz extracelular similar a la que ha sido descrita en embriogénesis somática. Este tipo de matriz no había sido descrita con anterioridad en androgénesis pero sí en la embriogénesis somática de distintas especies vegetales: en *Coffea* (Sondahl *et al.*, 1979), *Cichorium* (Dubois *et al.*, 1991 y 1992), *Drosera* (Šamaj *et al.*, 1994 y 1995) y *Papaver* (Ovečka *et al.*, 1998) donde se ha denominado “red de superficie de matriz extracelular”. Mediante microscopía electrónica hemos observado que esta matriz tiene una naturaleza fibrilar similar a la observada en cultivos de embriones somáticos de *Zea mays* (Fransz y Schel, 1991 y 1994, Šamaj *et al.*, 1999a) y *Pinus nigra* (Jásik *et al.*, 1995).

Por otro lado, en los granos de polen multicelulares, y posteriormente, en mayor medida en los proembriones androgénicos encontramos unos cuerpos que tienen naturaleza proteica, según hemos comprobado utilizando una tinción específica de proteínas. Hasta la fecha no se conocía la existencia de cuerpos proteicos en embriones androgénicos. Sí se ha descrito sin embargo, la presencia de cuerpos proteicos y lipídicos similares a los vistos en embriones zigóticos en embriones somáticos de *Crambe abyssinica*, que pertenece a la familia de las Brásicas (Jones, 1974). La presencia de cuerpos proteicos en embriones androgénicos y somáticos similares a los que aparecen en embriones zigóticos muestra una vez más la similitud existente entre estos procesos de embriogénesis producidas *in vivo* e *in vitro*.

2. LA PARED CELULAR EN LA INDUCCIÓN Y PRIMERAS ETAPAS DE LA ANDROGÉNESIS

Mientras que la pared del grano de polen durante su ontogenia y desarrollo ha sido ampliamente estudiada en distintas especies (Larson y Lewis, 1962; Rowley, 1962; Heslop-Harrison, 1968; Angold, 1967; Dickinson, 1970; Rodríguez-García *et al.*, 1983; Fernández y Rodríguez-García, 1988 y 1989; Blackmore y Barnes, 1987), no existen estudios tan exhaustivos de la pared en el polen embriogénico. La pared celular determina la forma y tamaño de la célula, además, juega un papel crítico en el crecimiento de la planta y en su desarrollo (Carpita y Gibeaut, 1993; Côte y Hahn, 1994). Nuestros resultados muestran que durante las primeras etapas de la androgénesis la pared de la microspora limita el crecimiento y mantiene la forma globular de las estructuras androgénicas en desarrollo. El hecho de que la pared permanezca intacta durante este tiempo a pesar del gran número de células que poseen los granos de polen embriogénicos tras seis días de cultivo, que es cuando se comienza a romper, parece indicar que debe jugar un papel importante en el comienzo de la androgénesis. Además, una de las manifestaciones morfológicas más patentes de la inducción androgénica es la modificación de la pared de la microspora, en concreto el engrosamiento de la intina. Algunos autores han descrito este engrosamiento como una acumulación de material fibrilar alrededor del citoplasma entre la intina y el plasmalema (rev. Rodríguez García *et al.*, 2000). En cebada hemos comprobado que se trata efectivamente de un engrosamiento de la intina como ya había sido descrito (Chen *et al.*, 1984a; Huang, 1986) que presenta los componentes propios de esta pared como se discutirá más adelante. Esta modificación de la intina ha sido descrita en otras especies como trigo (Huang, 1986; Bonet y Olmedilla, 2000), *Datura*

(Dunwell y Sunderland 1976), *Hyosciamus niger* (Reynolds 1984, 1985) y *Nicotiana tabacum* (Rashid *et al.* 1982).

La modificación estructural de la pared viene acompañada, como muestran nuestros resultados, por un cambio en la composición de la intina que será discutida en los próximos apartados. También hemos incluido en nuestro estudio las paredes que se forman entre las células que constituyen los granos de polen embriogénicos.

2.1. La composición de la pared celular

2.1.1. Calosa

Aunque la calosa no es un componente habitual de las paredes celulares, la mayoría de las plantas superiores la sintetizan en respuesta a ciertas circunstancias especiales que incluyen situaciones de estrés (Schlöpman *et al.*, 1993). Por ello la inducción androgénica que se consigue aplicando un tratamiento de estrés era una situación en la que resultaba interesante comprobar su presencia. Nuestros resultados muestran que la calosa estaba presente en la región más externa de la intina que se engrosaba tras la inducción androgénica (Pulido *et al.*, 2002). Encontramos dos posibles explicaciones de la función de la calosa en esta región de la intina. La primera está relacionada con el hecho de que la calosa puede servir como matriz para que se depositen otros materiales de la pared celular como se ha descrito, por ejemplo, en las placas celulares y en los poros de la placa cribosa (Yim y Bradford, 1998). Además, se ha postulado que en los microsporocitos la pared de calosa es necesaria para la formación posterior del correcto patrón de la exina en las microsporas maduras (Waterkeyn y Beinfait, 1970; Worrall *et al.*, 1992). En este sentido, se puede suponer que la presencia de calosa en la intina de las microsporas tras la inducción podría ser necesaria para que se depositaran otros materiales de la pared responsables, entre otras

cosas, del engrosamiento de la intina como consecuencia de la inducción androgénica. La segunda está en relación con la regulación por la calosa de la permeabilidad de las paredes, que ha sido estudiada en numerosos tejidos y tipos celulares ya que se ha propuesto que la calosa puede actuar como “filtro molecular”. Sin embargo, la permeabilidad/impermeabilidad de las paredes de calosa sigue siendo una cuestión ampliamente debatida. Así por ejemplo, en los microsporocitos, se ha supuesto que la pared de calosa actuaba como una barrera que impedía el paso o intercambio de ciertas moléculas (Heslop-Harrison, 1966; Heslop-Harrison y MacKenzie, 1967), mientras, en contra de la impermeabilidad de la calosa ha habido también numerosos argumentos y evidencias (Rowley y Dunbar, 1970; Dunbar, 1973; Mascarenhas, 1975). En este sentido, más recientemente, Rodríguez-García y Majwska-Sawka (1992) mostraron que la calosa no actuaba como una barrera impermeable al paso de sustancias de alto peso molecular como los iones cerio y los precipitados de perhidróxido de cerio. En semillas de pepino, calabacín, sandía y cebada también se ha descrito que la capa de calosa era responsable de la semipermeabilidad de la cubierta del endospermo evitando en los embriones la pérdida de elementos solubles y permitiendo la incorporación del agua necesaria en la imbibición de la semilla (Yim y Bradford, 1998). Con estos datos y estableciendo un paralelismo entre estos embriones zigóticos y los androgénicos, la calosa depositada en la parte más externa de la intina de las microsporas embriogénicas podría actuar como un filtro molecular que permitiría el control del agua y podría evitar la pérdida de elementos importantes al medio.

Por otro lado, nuestros resultados también muestran una abundante presencia de calosa en los numerosos plasmodesmos presentes en las paredes que se forman entre las células en los granos de polen multicelulares, especialmente al comienzo de la formación del

embrión (Pulido et al., 2002). La presencia de plasmodesmos en estas paredes también ha sido descrita en especies relacionadas como trigo (Bonet y Olmedilla, 2000) y maíz (Alché *et al.*, 2000) o en otras como *N. tabacum* (Garrido *et al.*, 1995). La presencia de la calosa en los plasmodesmos ha sido ampliamente descrita anteriormente (Olesen, 1986; Northcote *et al.*, 1989). Aunque normalmente se considera que los plasmodesmos dejan paso libre a moléculas solubles de menos de 1000 Da (Terry y Robards, 1987), hay muchas evidencias de variaciones en permeabilidad dependiendo del tipo celular y del tejido (Kempers *et al.*, 1993) así como de la regulación del tamaño del poro en respuesta a una gran variedad de estímulos como las diferencias de presión osmótica (Oparka y Prior, 1992) y señales químicas tales como el Ca^{2+} y los fosfatos de inositol (Erwee y Goodwin, 1983; Tucker, 1988, 1990). Se ha sugerido que la disposición de las moléculas de calosa entremezcladas con el material fibroso de la pared podría permitir el control del tamaño del conducto de los plasmodesmos y así modular el crecimiento y desarrollo de las células a través del control del tráfico de moléculas entre ellas (Olesen, 1986; Wolf *et al.*, 1991; Turner *et al.*, 1994). En este sentido, los plasmodesmos, muy abundantes al principio de la formación de las microsporas embriogénicas, podrían ejercer importantes funciones de regulación durante la androgénesis. Nuestros resultados muestran que el anticuerpo anti-calosa es muy adecuado para seguir la evolución de los plasmodesmos a lo largo del desarrollo del embrión androgénico.

2.1.2. Pectinas

El contenido pectínico de las paredes primarias de las gramíneas difiere en gran medida del de las paredes primarias de las dicotiledóneas y el resto de monocotiledóneas (Bacic *et al.*, 1988; Jarvis *et al.*, 1988). En las paredes de las gramíneas la mayoría de las pectinas han sido

sustituidas por glucoarabinosilanos. Sin embargo, se ha postulado que aunque las cantidades de pectinas sean menores deben ser las suficientes para construir una pared completamente funcional (Wiethölter *et al.*, 2003). Esta singularidad en la composición pectínica de las paredes celulares de las gramíneas y la implicación de las pectinas en los procesos de elongación celular (Hayashi *et al.*, 1980; Mc Cann *et al.*, 1993) y comunicación célula-célula (rev. Darvill *et al.*, 1992 Mohnen y Hahn, 1993; Côté y Hahn, 1994) hacen especialmente interesante el estudio de la localización espacial y temporal de las pectinas durante el desarrollo androgénico de cebada. Para este estudio utilizamos los anticuerpos JIM5 y JIM7 que permiten diferenciar homogalacturonanos con bajo y alto grado de esterificación respectivamente (Knox *et al.*, 1990).

En primer lugar, nuestros resultados mostraron que, a diferencia de lo esperado al ser la cebada una gramínea, las pectinas tanto de bajo grado de metilación como de alto grado de metilación son bastante abundantes en las paredes celulares de los tejidos de la antera, de las microsporas vacuoladas y del polen embriogénico. Knox *et al.* (1990) encontraron también una abundante presencia de pectinas en ápices de raíz de avena, por lo que dedujeron que la menor presencia de pectinas en las paredes celulares de gramíneas podría estar restringida a ciertos tejidos y ciertos tipos celulares.

Por otro lado, nuestros resultados muestran que antes del pretratamiento de estrés con manitol ya existen diferencias espaciales en la localización de los dos tipos de pectinas (Pulido *et al.*, 2002). Las paredes de las microsporas vacuoladas (A0) están prácticamente sólo formadas por pectinas con un alto grado de esterificación que se distribuyen a lo largo de toda la pared de la microspora y en el citoplasma próximo a esta pared. En estas microsporas la presencia de pectinas con bajo grado de metilación próximas a los dictiosomas está en

discordancia con la ruta general de síntesis descrita para las pectinas. Se ha propuesto que la ruta general de síntesis de pectinas da lugar a la formación de pectinas altamente esterificadas en el aparato de Golgi. Así, la síntesis de pectinas se inicia en la parte cis del Golgi (Lynch y Staehelin, 1992; Zhang y Staehelin, 1992) y continúa en el Golgi medio (Moore *et al.*, 1991; Zhang y Staehelin, 1992, Staehelin y Moore, 1995). En el Golgi medio y en la parte trans del Golgi se produce entonces la esterificación (Vian y Roland, 1991; Liners y Van Cutsem, 1992; Zhang y Staehelin, 1992; Sherrier y VanderBosch, 1994; Staehelin y Moore, 1995) mientras que el ensamblaje final de las pectinas se produce en las vesículas del Golgi cuando éstas son transportadas a la membrana plasmática e insertadas en la pared como polímeros altamente esterificados (Carpita y Gibeaut, 1993; Liners *et al.*, 1994; Dolan *et al.*, 1997). Sin embargo, a diferencia de lo propuesto en esta ruta y de acuerdo con nuestros resultados, se ha descrito la presencia de pectinas con bajo grado de metilación en las cercanías de los dictiosomas del polen de *Brugmansia suaveolens* (Geitmann *et al.*, 1995), en el cambium de chopo (Guglielmino *et al.*, 1997) y en el polen de *Pinus densiflora* (Mogami N *et al.*, 1999). También en desacuerdo con la ruta general de síntesis de pectinas está el hecho de que algunos tipos celulares como las células de callo de melón secreten en la pared pectinas no esterificadas (Vian y Roland, 1991) y la presencia de este tipo de pectinas en la superficie más interna de la pared celular en contacto con la membrana plasmática (Knox *et al.*, 1990; Casero y Knox, 1995). Roberts (1990) ya sugirió la existencia de una ruta alternativa que podría explicar todos estos hechos y que implica la síntesis de pectinas con un bajo grado de esterificación. Esta ruta vendría apoyada además por numerosos resultados que indican que la síntesis de las pectinas no está directamente unida a la esterificación (Doong *et al.*, 1995; Schaumann *et al.* (1993); Driouich *et al.*, 1993; Staehelin y More, 1995). Además, en

polen de *Pinus densiflora*, Mogami *et al.* (1999) también apuntaron la posibilidad de la presencia de una pectin metil esterasa en las vesículas del Golgi que generara pectinas con un bajo grado de esterificación. Nuestros datos por tanto confirman la existencia de rutas alternativas además de la ruta general de pectinas inicialmente propuesta.

Hasta la fecha, a pesar de que se habían realizado distintos estudios de composición pectínica durante la ontogenia y la germinación del polen (van Aelst y van Went, 1992; Jauh y Lord, 1996; Mogami *et al.*, 1999; Stepka *et al.*, 2000; Noher de Halac *et al.*, 2003), no se había estudiado la distribución de pectinas durante el desarrollo androgénico. Nuestros resultados muestran que tras el pretratamiento de inducción de androgénesis, tanto las pectinas de alto como las de bajo grado de esterificación están presentes en la intina engrosada a consecuencia de la inducción androgénica (Pulido *et al.*, 2002). Al igual que la calosa, las pectinas no esterificadas se concentran en la capa más externa de la intina mientras que las metilesterificadas se distribuyen al azar dentro de la intina. Todo esto nos indica que la intina además de engrosarse está sufriendo una modificación y redistribución de sus componentes de manera que se están formando diferentes capas o estratos con diferente composición y probablemente con diferente función.

Las nuevas paredes que se forman entre las células que constituyen el grano de polen multicelular contienen pectinas con alto grado de metilación. Esto estaría de acuerdo con la ruta principal de síntesis de pectinas en la que las pectinas serían secretadas a la pared como pectinas metilesterificadas y posteriormente se desesterificarían *in muro* por pectin-metilesterasas (PME). En la parte más externa de la intina sí hay una abundante presencia de pectinas con bajo grado de metilación. La desesterificación de las pectinas tiene importantes implicaciones en la pared celular (McCann y Roberts, 1994). Las pectinas esterificadas forman un gel elástico en presencia de Ca^{2+} . Este gel cuando

el grado de esterificación es bajo pierde extensibilidad ya que las pectinas no esterificadas se unen al Ca^{2+} para formar una estructura rígida (Carpita y Gibeaut, 1993). Esta desesterificación en las paredes celulares es importante en la regulación de procesos de crecimiento (McCann y Robert, 1994). En células u órganos en elongación, las paredes jóvenes altamente plásticas están generalmente caracterizadas por un alto grado de metilación en las pectinas mientras que las paredes maduras, más rígidas, por un bajo grado de metilación de las mismas (Goldberg *et al.*, 1986 y 1996; Li *et al.*, 1994; McCann y Roberts, 1996). Con estos datos podemos pensar que la desesterificación de las pectinas en la intina tiene como consecuencia que la pared que rodea el polen multicelular en desarrollo sea más rígida o menos plástica. Una pared más rígida impide el crecimiento del grano de polen multicelular dentro de la pared. Por ello probablemente, los granos multicelulares no aumentan en tamaño hasta la ruptura de la pared del polen y es necesaria esta ruptura para que el proembrión continúe su desarrollo.

2.1.3. Proteínas arabinogalactanos

Existen muchos trabajos que indican que las proteínas arabinogalactanos (AGPs) ejercen un papel importante tanto en la embriogénesis zigótica como en la somática y se han descrito numerosos cambios cuantitativos y cualitativos en estas AGPs durante el inicio y el desarrollo del proceso embriogénico (rev. Majewska-Sawka y Nothnagel, 2000). Sin embargo, hasta ahora no se había estudiado el papel de estas glicoproteínas en el proceso de embriogénesis del polen. Para su estudio durante el proceso androgénico se utilizaron dos anticuerpos JIM4 (Knox *et al.*, 1989) y JIM8 (Pennell *et al.*, 1991) debido a que se había descrito que se unían con diferentes tipos de AGPs implicadas en la embriogénesis somática (Stacey *et al.*, 1990; Toonen *et al.*, 1996; McCabe *et al.*, 1997; Šamaj *et al.*, 1999a y 1999b). El anticuerpo JIM8 se

describió inicialmente como un marcador de un estado de transición muy temprano dentro de las células que rodeaban la masa proembriónica en suspensiones embriónicas de zanahoria (Pennel *et al.*, 1992). Además, se demostró que la mayoría de los embriones somáticos obtenidos en este cultivo se desarrollaban a partir de células que carecían del epítipo JIM8 (Toonen *et al.*, 1996) y que, aunque estas proteínas no estuvieran presentes en las células embriónicas, eran necesarias para la formación del embrión somático (McCabe *et al.*, 1997). Por ello se postuló que la proteína con el epítipo de JIM8 representaba una señal soluble liberada por las células no embriónicas y regulada por la densidad celular en suspensiones de células de zanahoria en cultivo necesaria para que se formaran los embriones somáticos (McCabe *et al.*, 1997). Durante la androgénesis en cebada hemos encontrado este epítipo en microsporas vacuoladas antes de la inducción (A0) lo que no había sido descrito con anterioridad (Pulido *et al.*, 2002). Además se ha encontrado esta AGP en polen multicelular después de 3 y 6 días de cultivo pero no en las microsporas inmediatamente después de la inducción. A la luz de estos resultados es posible pensar que la proteína AGP que reacciona frente a este anticuerpo puede actuar también como una señal en la inducción de androgénesis. Es posible que la estructura proembriónica que no está marcada con JIM8 durante la embriogénesis somática sea equivalente en androgénesis a la microspora inmediatamente después de la inducción (designado por nosotros como A3 ó A4). Pero sólo con este paralelismo con la embriogénesis somática no podemos explicar el hecho de que este epítipo esté presente en el polen multicelular después de 3 y 6 días de cultivo.

Sin embargo el hecho de que en embriones zigóticos tempranos esta proteína reconocida por JIM8 esté presente nos hace pensar en que las estructuras multicelulares encontradas tras la inducción androgénica podrían ser consideradas similares a este embrión temprano de la

embriogénesis zigótica (Pennel *et al.*, 1991; Coimbra y Salema, 1997). En colza y *Amaranthus hypocondriacus* se ha descrito también que estas AGPs están presentes además de en los embriones zigóticos en las células haploides (gametos) y somáticas de las anteras y del saco embrionario. Con estos datos se postuló que la presencia de las AGPs reconocidas por JIM8 parece estar relacionada con el proceso de gametogénesis y de embriogénesis zigótica (Coimbra y Salema, 1997). Por ello no es de extrañar por un lado que estén presentes en las microsporas vacuoladas de cebada y por otro que estén implicadas en la embriogénesis androgénica de esta planta.

Algunos autores consideran que los mecanismos que controlan la embriogénesis somática y zigótica son similares (Zimmerman, 1993; Goldberg *et al.*, 1994) sin embargo parece que las AGPs reconocidas por el anticuerpo JIM8 que actúan como molécula señal en la embriogénesis somática ejercen un papel distinto durante la embriogénesis zigótica y la embriogénesis androgénica.

En conclusión se puede decir que las proteínas a la que se une JIM8 parece estar implicado en la embriogénesis androgénica de cebada al igual que se ha visto anteriormente en las embriogénesis zigótica y somática, aunque probablemente ejerzan un papel distinto al de estas AGPs en embriogénesis somática.

Por otro lado, las proteínas reconocidas por el anticuerpo JIM4 han sido descritas como posibles marcadores tempranos de células con competencia embriogénica en cultivo de callos de maíz (Šamaj *et al.*, 1999a). Estos autores observaron que la matriz extracelular de las células embriogénicas de los callos de maíz poseía el epítipo JIM4 mientras que las células de callo no embriogénicas estaban desprovistas de este epítipo. Nuestros resultados mostraron que el epítipo de JIM4 estaba totalmente ausente en las microsporas antes del pretratamiento

de inducción (A0). Sin embargo, las AGPs reconocidas por este anticuerpo sí estaban presentes en las microsporas tras el pretratamiento de inducción (A3 y A4) y en el polen embriogénico tras 6 días de cultivo (C6); tanto en los granos multicelulares homogéneos compuestos de un sólo tipo celular como en los granos de polen multicelulares formados por dos tipos de células. Por tanto, en androgénesis de cebada estas AGPs estaban presentes en las estructuras embriogénicas, al igual que ocurría en la embriogénesis somática. Sin embargo encontramos de nuevo una diferencia entre la androgénesis y la embriogénesis somática: la ausencia del epítipo JIM4 en la matriz extracelular presente en los proembriones androgénicos obtenidos tras 9 y 13 días de cultivo (C9 y C13). Por otro lado, nuestros resultados muestran una abundante presencia de los epítipos de JIM4 en las paredes celulares del tapetum, aún presentes tras 6 días de cultivo de anteras. La presencia de estas proteínas debe tener sin duda una función durante la androgénesis de cebada quizás relacionada con la ruptura de la pared de la microspora que coincide justamente con el momento de su expresión o quizás relacionada con la muerte celular de este tejido puesto que, como se ha descrito, existen AGPs que parecen estar implicadas en procesos de muerte celular programada (Dolan *et al.*, 1995; Gao *et al.*, 1999).

Con estos datos podemos decir que las AGPs estudiadas están implicadas no sólo en embriogénesis somática sino también en embriogénesis androgénica aunque el papel que juegan en estos dos procesos no es completamente equiparable. En la figura 52 se pueden observar las diferencias encontradas entre ambos procesos.

2.2. Depósitos de Fe en la pared celular durante la androgenesis mediante cultivo de microsporas

En nuestro estudio comparativo entre la inducción de androgénesis mediante cultivo de anteras y de microsporas aisladas, la diferencia más significativa que encontramos fue la aparición, en el caso de la inducción mediante cultivo de microsporas aisladas, de unos precipitados densos a los electrones tanto en la intina como en algunas de las paredes formadas entre las células de los granos de polen multicelulares. El primer análisis que realizamos de estos depósitos nos llevó a concluir que no tenían un carácter predominantemente proteico dado que no se alteraban al tratarlos con proteinasa K. Sin embargo la extracción de estos depósitos al tratarlos con EDTA mostró que contenían cationes que eran quelados por este compuesto.

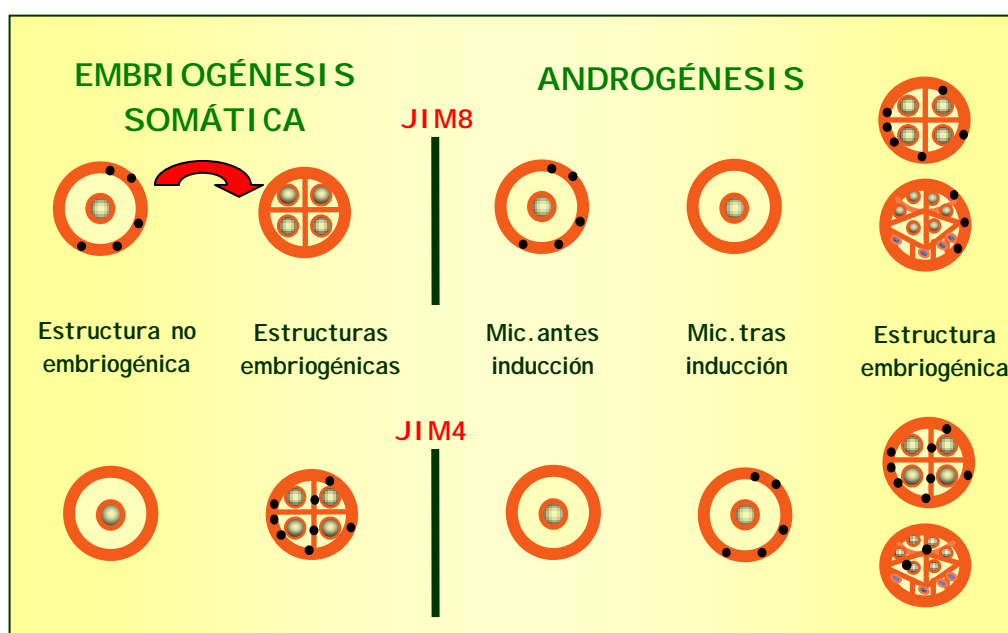


Fig. 52. Esquema de los resultados obtenidos con los anticuerpos JIM4 y JIM8 en embriogénesis somática y en androgénesis.

Para conocer la naturaleza de estos cationes recurrimos al microanálisis de Rayos X. Como consecuencia de este análisis observamos que la composición de estos depósitos se distinguía de la composición de otros puntos de la pared fundamentalmente por la presencia de Fe.

No había datos previos de presencia de Fe en la pared de las microsporas pero se había descrito que elementos similares como el Al se podían acumular en las paredes de otras células como las de la raíz de *Sorghum bicolor* para aliviar la toxicidad provocada por la presencia de este elemento en el medio (Hodson y Sangster, 1993). También se ha detectado la presencia de Al en las paredes celulares de otro cereal, *Triticum aestivum* (Zhang et al., 1994). La presencia de Al en las paredes vegetales viene a menudo asociada a la del silicio o, mejor dicho, a la de sus compuestos en forma de sílice ($\text{SiO}_n(\text{OH})_{4-2n}$) (rev. Perry y Keeling-Tucker, 1998). En este sentido, también se ha descrito la presencia de Al en otros organismos como por ejemplo la coprecipitación del Al y el Si en las placas seniles de cerebros de enfermos de Alzheimer (Candy et al., 1986) o el papel del sílice en la protección frente a la toxicidad provocada por aluminio en el salmón (Birchall et al., 1989).

También se ha descrito que la sílice interacciona con el Fe en diferentes organismos, el carácter de esa interacción determina que el hierro adopte una forma más soluble (Birchall, 1990; Iler, 1979) o que se produzca su minerilización (rev. Perry y Keeling-Tucker, 1998). Nuestros resultados de microanálisis mostraron que efectivamente se detectaba silicio entre los elementos presentes en los depósitos lo que puede indicar la posible presencia conjunta de estos elementos. La cebada es una gramínea que al igual que *Sorghum* tiene tendencia a acumular sílice en las paredes. Es precisamente la acumulación de sílice en las paredes de *Sorghum* lo que, según se ha descrito (Hodson y Sangster, 1993), le permite protegerse frente al envenenamiento con Al, sin embargo otras

especies como el algodón que no acumulan sílice se ven afectadas por este elemento (Li *et al.*, 1989). Todo esto lleva a pensar que los depósitos observados en la pared celular durante el cultivo de microsporas pueden producirse al precipitarse el hierro por interacción con la sílice presente en esta pared celular. Es posible que la sílice, al igual que hace con el Al, precipite el Fe para aliviar la toxicidad producida por un exceso de Fe en el medio.

Por otro lado, en el análisis de la intina engrosada del polen multicelular embriogénico obtenido tanto mediante cultivo de anteras como mediante cultivo de microsporas aisladas, hemos observado que las pectinas desesterificadas están presentes en la parte más externa de la intina, que es la zona donde vemos estos depósitos. Las pectinas desesterificadas pueden unirse a iones de metales como Fe, Zn, Cu, Mn, Ca y Al para transportarlos a través de la pared celular hacia el citoplasma (Franco *et al.*, 2002). Todos estos cationes excepto el Al, que es tóxico aún en mínimas concentraciones, son nutrientes importantes para la célula. La afinidad del Al por los carboxilos de las pectinas desesterificadas tiene importantes implicaciones ya que puede alterar funciones de las pectinas en las paredes celulares, alterando la red responsable de muchas de sus propiedades estructurales tales como la extensibilidad, la porosidad, etc. o producir una reducción de la capacidad de intercambio iónico de dichas paredes (Schmohl y Horst, 2000). Las pectinas desesterificadas tienen aún más afinidad por Fe que por Al (Franco *et al.*, 2002) por lo que cabría la posibilidad de que interaccionaran y precipitaran el Fe. Sin embargo, nuestros resultados muestran que no existe colocalización de las pectinas y los depósitos lo que parece indicar que no existe interacción de Fe y pectinas.

Por otro lado, es también posible que la calosa, que como hemos mostrado también se localiza en la parte más externa de la intina, imposibilite actuando como un filtro molecular el paso del hierro al

citoplasma. En este sentido, se ha descrito en *Triticum aestivum* la síntesis de calosa en respuesta a la toxicidad provocada por aluminio (Zhang *et al.*, 1994).

En cuanto a la presencia de depósitos presentes en algunas de las paredes formadas tras las divisiones androgénicas, es posible que las paredes que contienen depósitos sean sólo aquellas que se forman a partir de la intina. Como ya se ha descrito anteriormente, en el polen androgénico de cebada, algunas paredes no se forman a partir de la placa celular sino que se forman como una prolongación de la intina. Este hecho podría propiciar que los depósitos pasaran también a estas paredes.

De los datos obtenidos a partir de los cultivos que empleaban distintas concentraciones de Fe en el medio, en primer lugar podemos decir que se confirma que el origen de esos depósitos es el FeEDTA suministrado en el medio. El Fe es un elemento esencial para el desarrollo androgénico (Nitsch, 1969) y además se ha descrito que su concentración tiene una gran importancia en uno de los principales problemas de la formación de embriones haploides mediante androgénesis en cereales: el albinismo (Chen, 1986). La producción de plantas albinas en cereales es aún un problema sin resolver. No se conoce exactamente cuál su origen, aunque se han hecho algunas aproximaciones (Huang, 1986; Day y Ellis, 1984 y 1985) y se han realizado algunos avances más o menos empíricos para paliar este problema (Ouyang *et al.*, 1983; Bernard, 1980; Chen, 1986; Sorvari y Shieder, 1987; Feng y Ouyang, 1988). Así, se ha visto que una concentración demasiado baja de Fe puede hacer disminuir la formación de plantas verdes (Chen, 1986).

Cuando utilizamos diferentes concentraciones de FeEDTA desde la concentración de partida del medio de Olsen (1991) (1x equivale a 40 mg/ml), observamos que el número de proembriones obtenidos

disminuye cuando utilizábamos concentraciones superiores a 0.75 veces la inicial. Sin embargo, el número de plantas verdes regeneradas a partir de estos proembriones parece aumentar con la concentración, aunque con concentraciones superiores a la 1x el número de plantas verdes también disminuía. Parece, por tanto, que una concentración de Fe baja favorece la formación de proembriones, sin embargo, la regeneración de plantas verdes a partir de estos proembriones se ve disminuida por esta concentración baja de Fe como se había descrito anteriormente (Chen 1986). Por otro lado, nuestros estudios mediante microscopía electrónica de la pared de los proembriones obtenidos a partir de los cultivos utilizando diferentes concentraciones de Fe nos muestran que los depósitos no están presentes cuando se utiliza una concentración de Fe menor o igual que 0.75 veces la inicial. De todos estos resultados podemos deducir que la concentración óptima para cultivo de microsporas aisladas de cebada estaría entre 0.75x y 1x.

El hecho de que se presenten estos precipitados en los proembriones androgénicos de cebada y no se hayan descrito en otras especies, puede deberse a que esta especie sea especialmente sensible al Fe.

Estos resultados además podrían ser debidos a que cuando se pusieron a punto las técnicas de cultivo de microsporas aisladas se utilizaron medios de cultivo muy semejantes a los empleados para el cultivo de anteras. Nuestros resultados parecen apuntar que se ha aplicado un exceso de Fe en el medio para el cultivo de microsporas aisladas y así surge la cuestión de si los medios optimizados para el cultivo de anteras son apropiados o no para el cultivo de microsporas aisladas. En el cultivo de anteras, los tejidos que la componen pueden ejercer como barrera entre las microsporas embriogénicas en desarrollo y el medio de cultivo. En este sentido se ha descrito que la pared de la antera parece crear un ambiente cerrado hasta que el conjunto interno

de nutrientes para las microsporas se reduce suficientemente (Hoekstra *et al.*, 1992). En el cultivo de microsporas aisladas no existe esta barrera y los depósitos de Fe parecen indicar que la concentración de éste resulta excesiva por lo que las microsporas lo acumulan en la pared para evitar su entrada. Esto lleva a pensar que tal vez se debería revisar las concentraciones de otros elementos de estos medios y ver si se deberían hacer ciertas variaciones que mejoraran los rendimientos de la inducción en cultivo de microsporas aisladas.

En cuanto al posible papel que ejerce la pared de la microspora en la protección frente a un exceso de Fe en el medio, existen muchos antecedentes. Así, se ha descrito ampliamente la acumulación de metales tóxicos en la pared celular de distintas plantas y, además del Al ya citado, se ha mostrado la acumulación de otros metales pesados (rev. Hall, 2002). En este sentido existen plantas hiperacumuladoras (Brooks *et al.*, 1977) que se protegen de metales tóxicos como el Cd, el Zn y el Ni acumulándolos en ciertos compartimentos celulares entre los que destaca la pared celular (Krämer *et al.*, 2000 y Küpper *et al.*, 2000).

3. HORDEÍNAS

El estudio de la expresión durante la embriogénesis androgénica de genes normalmente expresados en la embriogénesis zigótica es una de las fuentes principales de marcadores de androgénesis y en general de embriogénesis (Reynolds, 1997). Las proteínas de almacenamiento en cereales suponen el 50% del contenido proteico total de la semilla (Shewry y Halford, 2002). En cebada las hordeínas son las principales proteínas de almacenamiento de las semillas por lo que el estudio de la expresión de estas proteínas durante la androgénesis nos pareció de interés puesto que hasta la fecha no se había estudiado en este proceso. Las hordeínas han sido consideradas proteínas específicas del

endospermo de la semilla de cebada siendo expresadas exclusivamente en el endospermo amiláceo durante la etapa media y tardía de su desarrollo (Davies *et al.*, 1993; Shewry y Halford, 2002). Sin embargo, dado que se había especulado sobre la existencia en embriones androgénicos de un dominio estructural que podría ser equivalente al endospermo seleccionamos el gen de la hordeína B1 para estudiar su expresión durante la androgénesis. Al detectar la presencia de los ARN mensajeros correspondientes en embriones androgénicos decidimos además estudiar la presencia de hordeínas en los mismos. Este estudio lo realizamos en primer lugar en el desarrollo zigótico con objeto de poner a punto las técnicas que posteriormente utilizaríamos en la androgénesis. Sin embargo este estudio en el desarrollo zigótico aportó además datos novedosos que se discutirán más adelante.

3.1. Prolaminas durante el desarrollo zigótico de cebada y trigo

Durante la formación de la semilla, las células del endospermo de cereales acumulan gran cantidad de proteínas de almacenamiento que suponen fuentes de carbono, nitrógeno y azufre necesarias posteriormente para la germinación. Las proteínas del gluten, sobre todo las gliadinas del trigo y sus equivalentes en el resto de cereales de grano (hordeínas de cebada, secalinas de centeno y aveninas de avena) han sido objeto de intenso estudio debido no sólo a su abundancia en las semillas sino también a su importancia en la fabricación del pan, la pasta y otros alimentos. Se ha descrito ampliamente la presencia y localización de gliadinas y hordeínas en el endospermo de las semillas de trigo y cebada. A ello han contribuido en gran medida los anticuerpos monoclonales y policlonales desarrollados para su reconocimiento (Stenram *et al.*, 1991; Levanony *et al.*, 1992; Rubin *et al.*, 1992; Skerrit *et al.*, 1990; Rechinger, 1993). Entre estos, los anticuerpos R3, R4 y R5,

usados en esta tesis y desarrollados en el laboratorio del Dr. Enrique Méndez (CNB del CSIC), permiten reconocer prolaminas de cereales tales como gliadinas, hordeínas, secalinas y aveninas (Sorell *et al.*, 1998) de gran importancia para los celíacos, es decir, los enfermos alérgicos al gluten (Marsh, 1992). En la unidad de gluten del Centro Nacional de Biotecnología, el anticuerpo R5 se utiliza de forma rutinaria para la detección de prolaminas en alimentos para celíacos mediante las técnicas de ELISA y Western blot y tiras inmunocromatográficas. Dado que el trigo es el cereal predominante en nuestra alimentación las gliadinas son las más frecuentemente detectadas. Por ello, para poner a punto estas técnicas en nuestro material realizamos un estudio en paralelo de las gliadinas y hordeínas durante el desarrollo de las semillas de trigo y cebada respectivamente.

Para la inmunolocalización de estas proteínas utilizamos además del anticuerpo R5 los otros dos disponibles: R3 y R4. Aunque los tres anticuerpos marcaban igualmente los cuerpos proteicos, presentes en el endospermo de las semillas de trigo y cebada en formación, se observaba una diferencia fundamental entre ellos: Cuando se utiliza el anticuerpo R3 además de marcarse los cuerpos proteicos aparecía también marca en la estructura proteica que rodeaba a los granos de almidón. No encontrábamos marcadas estas estructuras ni cuando incubábamos con R4 ni con R5. Se ha descrito que muchos anticuerpos desarrollados contra la fracción proteica del gluten presentan reacción cruzada con las proteínas de los granos de almidón (“starch granule proteins” o SGPs) (Skerritt *et al.* (1990)). Estos autores especificaban que si la marca se presentaba en la periferia del grano de almidón se estaban reconociendo epítomos de SGPs de bajo peso molecular mientras que si la marca estaba presente en el interior de los granos de almidón se trataba de SGPs de alto peso molecular. Teniendo en cuenta estos datos y con nuestros resultados podemos decir que el anticuerpo R3 no es específico de

prolaminas sino que también reconoce SGPs de bajo peso molecular. Debido a que el anticuerpo R3 no reconoce específicamente ni gliadinas de trigo ni hordeínas de cebada, no se utilizó para los restantes estudios de inmunolocalización e inmunodetección.

La inmunolocalización de prolaminas a lo largo del desarrollo de las semillas de trigo y cebada nos permitió además seguir la evolución de los cuerpos proteicos, con lo que confirmamos que estos cuerpos aumentan en tamaño a lo largo del desarrollo en el endospermo de la semilla. Los mecanismos que conducen a este aumento han sido ampliamente descritos (Larkins y Hurkman, 1978; Bechtel *et al.*, 1982a y b). Asimismo, observamos cómo estos cuerpos se fusionaban perdiendo su forma esférica para adquirir formas más irregulares. La última consecuencia de la acumulación progresiva de los cuerpos proteicos y de su fusión fue la formación de la matriz proteica visible en la semilla madura. Esta matriz proteica que aparecía homogéneamente distribuida rodeando a los amiloplastos había sido descrita en trigo (Bechtel *et al.*, 1982b; Stenram *et al.*, 1991), en cebada (Bechtel y Pomeranz, 1979) y en centeno (Bechtel *et al.*, 1982b) aunque no está presente en otros cereales. A esta matriz se le atribuyen las cualidades de estos cereales para hacer pan (Cunningham *et al.*, 1955a y b).

Aunque con las técnicas inmunocitoquímicas ya fuimos capaces de detectar prolaminas (gliadinas y hordeínas) en un estadio muy joven del desarrollo de las semillas de trigo y cebada (8 días después de la antesis (DPA)), mediante el sistema ELISA “sandwich” las detectamos incluso en estadios todavía más jóvenes (2 DPA). No se había descrito anteriormente la presencia de gliadinas u hordeínas en etapas tan tempranas del desarrollo zigótico, lo más pronto que se habían detectado en el desarrollo de cebada era después de 5 DPA (Davies *et al.*, 1993). Estos autores emplearon la variedad Sundance de cebada crecida también en condiciones de cultivo controladas; la técnica que utilizaron

para el análisis de la presencia de hordeínas fue la inmunocitoquímica. Debido a que las cantidades de prolaminas en estas etapas tempranas del desarrollo de la semilla son tan pequeñas sólo es posible detectarlas con técnicas muy sensibles. Nuestro estudio consigue encontrarlas tan pronto gracias a las altas sensibilidades conseguidas con el método ELISA: 0.39 ng/ml para la cebada y 0.78 ng/ml para el trigo (Valdés *et al.*, 2003).

Nuestros resultados del ELISA durante el desarrollo de las semillas de trigo y cebada, muestran también la progresiva acumulación de estas proteínas en las semillas en formación conforme aumenta el número de días de desarrollo. Aunque esta acumulación es progresiva dista mucho de ser lineal ni en cebada ni en trigo. En los primeros días de desarrollo de la semilla las cantidades de estas proteínas son prácticamente inapreciables, sin embargo estas cantidades aumentan considerablemente tras 8 y 10 DPA tanto para la cebada como para el trigo. El hecho de que la cantidad de estas proteínas aumente tanto en etapas posteriores estaría de acuerdo con lo descrito en la bibliografía ya que la acumulación de proteínas de almacenamiento ha sido descrita como un acontecimiento tardío que ocurre durante la etapa la maduración del endospermo (Barceló *et al.*, 1998). Por otro lado, es claramente apreciable que los valores para las hordeínas son siempre superiores a los correspondientes de las gliadinas. Sin embargo a la hora de interpretar estos resultados es necesario tener en cuenta que estos valores dependen de una serie de factores. Uno de ellos podría ser el protocolo utilizado para la extracción de prolaminas, pero en este trabajo fue el mismo en ambos casos. Otro factor que puede influir son las condiciones fisiológicas de la planta durante la formación de las semillas, por ejemplo la disponibilidad de nutrientes como el N y el C y/o las condiciones ambientales antes y durante el periodo del desarrollo del grano (Davies *et al.*, 1993). Es necesario pues destacar que nuestra

cebada creció en cámara, bajo condiciones controladas, mientras que el trigo creció en campo, estando sometido por tanto a una serie de variables difícilmente controlables lo que podría explicar la mayor cantidad de hordeínas.

Nuestros resultados obtenidos con Western blot confirmaron los datos de ELISA aunque no fue posible detectar estas proteínas antes de 4 DPA. La sensibilidad de ambas técnicas las convierte en herramientas muy valiosas para detectar la posible presencia de hordeínas durante las primeras etapas del desarrollo androgénico de cebada.

En el embrión zigótico no hemos detectado presencia de mensajeros del gen de la hordeína B1 ni de hordeínas con ninguna de las técnicas utilizadas. Con trigo también obtuvimos los mismos resultados negativos.

3.2.Hordeínas durante la inducción y primeras etapas del desarrollo androgénico

En primer lugar estudiamos la presencia de transcritos de la hordeína B1 mediante RT-PCR e hibridación *in situ* durante las diferentes etapas de la androgénesis. Estos resultados mostraron clara y sorprendentemente la expresión del gen que codifica para la hordeína B1 en los embriones androgénicos. Con ambas técnicas pudimos observar que estos transcritos aparecían ya en microsporas que habían sufrido la inducción androgénica (A3) aunque la expresión aumenta tras la puesta en cultivo (C3). También se observó expresión en el polen embriogénico obtenido tras y 6 días de cultivo (C6) y en los proembriones obtenidos tras la ruptura de la pared después de 9 (C9) y 13 (C13) días de cultivo. No encontramos diferencias entre los pólenes embriogénicos homogéneos y heterogéneos lo que mostraba que este gen se transcribía en ambas estructuras. Dentro de los granos heterogéneos los transcritos también

estaban presentes en ambos tipos de células lo que mostraba que estos transcritos no sirven como marcadores de uno u otro dominio.

Hasta la fecha no se había descrito la presencia ni de mensajeros ni de proteínas de almacenamiento en los embriones androgénicos de cebada ni de ninguna otra monocotiledónea. En dicotiledóneas, Boutilier *et al.* (1994) mostraron la presencia de mensajeros que codificaban para un tipo de proteínas de almacenamiento de embriones zigóticos (las napinas) durante el desarrollo androgénico de *Brassica napus*. Anteriormente, Crouch (1982) había detectado otro tipo de proteínas de almacenamiento (una glicoproteína 12S) que estaba presente en embriones zigóticos, androgénicos y somáticos de esta misma planta. También ha sido descrita la presencia de otras proteínas de almacenamiento de embriones zigóticos en embriones somáticos de distintas especies (Shoemaker *et al.*, 1987, Crouch, 1982; Joy *et al.*, 1991; Misra *et al.*, 1993; Koltunow *et al.*, 1996; Chatthai y Misra, 1998; Šunderlíková y Wilhelm, 2002).

Las proteínas de almacenamiento anteriormente citadas que aparecían en embriones androgénicos y somáticos habían sido detectadas previamente en los correspondientes embriones zigóticos. En cebada, aunque encontramos estas prolaminas en el embrión androgénico no las podemos detectar en el embrión zigótico, son propias del endospermo. Durante el desarrollo de la semilla en monocotiledóneas el endospermo actúa como un tejido de almacenamiento pero en los embriones androgénicos al no existir este tejido podría pensarse que es el propio embrión el que se ve obligado a sintetizar todas las sustancias de almacenamiento necesarias para que se forme la futura plántula. Recientemente hemos encontrado en la literatura otro caso de genes de endospermo que se expresan en los embriones en los embriones androgénicos de maíz pero no en los correspondientes zigóticos aunque no codifican para proteínas de almacenamiento (Magnard *et al.*, 2000).

Por otro lado, Blumenthal *et al.* (1990) revelaron la presencia de varios elementos de choque térmico corriente arriba de la caja TATA de la secuencia de 2 genes de gliadinas. Estos elementos eran secuencias conservadas asociadas con la activación de todos los genes de choque térmico conocidos. En este sentido ha sido ampliamente descrita la expresión de proteínas de choque térmico durante la inducción y las primeras etapas de la androgénesis inducida tanto mediante choque térmico (Pechan *et al.*, 1991) como mediante otros tipos de estrés incluido el ayuno (Zarsky *et al.*, 1995). Es posible por tanto, que la expresión de las hordeínas se active en las microsporas cultivadas como consecuencia del estrés a las que éstas han sido sometidas.

Volviendo a la expresión de genes de endospermo en los embriones androgénicos, Magnard *et al.* (2000) apuntaron además la posibilidad de la existencia de dominios con características de endospermo dentro de los granos de polen androgénicos. En principio, con nuestros resultados de inmunolocalización e hibridación *in situ* no podemos diferenciar dominios dentro de ninguno de los dos tipos de granos multicelulares encontrados (ni homogéneos ni heterogéneos). En estados más avanzados del desarrollo androgénico donde empieza a verse ya una cierta diferenciación celular los resultados de la inmunolocalización de hordeínas muestran que estas proteínas parecen acumularse con cierta preferencia en las células de la periferia que tienen un aspecto más meristemático que las células centrales más vacuoladas de los proembriones. Estas células meristemáticas presentan un serie de cuerpos de naturaleza proteica, que mientras que se teñían con azul de toluidina de forma semejante no reaccionaban de igual forma con el anticuerpo anti-hordeína. Este hecho nos hizo pensar que estos cuerpos podrían no estar exclusivamente formados por hordeínas habiendo zonas donde éstas sí están presentes y otras donde o no están o están en una forma que hace que los epitopos de las hordeínas no estén accesibles al

anticuerpo. A diferencia de lo observado en estos proembriones androgénicos, los cuerpos proteicos del endospermo de cebada tras la inmunocitoquímica aparecen uniformemente marcados en su superficie lo que parece indicar que los cuerpos presentes en el endospermo están homogéneamente formados por hordeínas. Rechinger *et al.* (1993) estudió la composición de los cuerpos proteicos de cebada en endospermo y vió que efectivamente éstos estaban compuestos homogéneamente por hordeínas: polipéptidos de hordeínas B y C que se ensamblan en el centro del cuerpo y están rodeados por una capa más externa de hordeínas $\gamma 1$ y $\gamma 2$. Sin embargo, en otros cereales como avena y trigo los cuerpos proteicos del endospermo pueden estar formados por diferentes proteínas de almacenamiento. Así, en avena las globulinas y las prolaminas colocalizaban en los mismos cuerpos proteicos de las células del endospermo amiláceo pero estaban presentes en distintas zonas del cuerpo proteico, en concreto las prolaminas se localizaban en las inclusiones menos contrastadas (Lending *et al.*, 1989). Los cuerpos proteicos del endospermo de semillas de trigo en desarrollo también pueden, en ocasiones, contener además de las gliadinas inclusiones de una globulina: la triticina (Bechtel *et al.*, 1991). Es posible por tanto que al igual que ocurre en los cuerpos proteicos de trigo y avena, los cuerpos proteicos que aparecen durante las primeras etapas del desarrollo androgénico en cebada estén compuestos de diferentes proteínas de almacenamiento. Si este fuera el caso probablemente las otras proteínas presentes en los proembriones androgénicos serían globulinas 7S que son las proteínas que se expresan en embriones zigóticos de cereales (Shewry y Haldford, 2002). Estas proteínas han sido caracterizadas en maíz (Kriz, 1989 y 1999; Kriz y Schwartz, 1986; Kriz y Wallace, 1991; Wallace y Kriz, 1991) y se han encontrado proteínas homólogas en embriones de cebada, trigo y avena (Burgess y Shewry, 1986; Heck *et al.*, 1993).

La técnica ELISA sandwich nos ha permitido además de detectar, cuantificar las hordeínas durante el desarrollo zigótico y el desarrollo androgénico. A lo largo del desarrollo zigótico se observa un aumento progresivo de la concentración de hordeínas, imputable sólo al desarrollo del endospermo porque, como hemos dicho, en el embrión zigótico no hemos detectado estas proteínas. Sin embargo en el desarrollo androgénico observamos fluctuaciones en la concentración de estas proteínas. Así, el pretratamiento de inducción con manitol no parece influir en la síntesis de hordeínas (en A0 detectamos prácticamente la misma cantidad que en A3) pero tras 3 días de cultivo (C3) sí se advierte un claro incremento de estas proteínas. A lo largo del desarrollo del embrión androgénico las hordeínas no se acumulan de forma continua como en el desarrollo del endospermo. Todo esto nos hace pensar que mientras que en la semilla se están acumulando estas proteínas para su posterior uso en la germinación, en androgénesis se sintetizan y consumen a medida que progresa el embrión androgénico que no posee endospermo.

La mayoría de las prolaminas y las glutelinas de los cereales pertenecen a una única clase de proteínas de semillas relacionadas que tienen raíces evolutivas comunes (Shewry y Tatham, 1990) con excepción de las glutelinas de arroz que pertenecen a las leguminas y la α -zeína, que es una prolamina de relación desconocida con la superfamilia de prolaminas de cereales (Müntz, 1998). En este sentido, nuestros resultados del estudio de la expresión de hordeínas durante el desarrollo androgénico abren perspectivas de posible expresión de otras prolaminas como las gliadinas y las secalinas durante el desarrollo androgénico en otros cereales relacionados como el trigo y el centeno.

Por otro lado, el empleo de técnicas tan sensibles como la RT-PCR para detectar transcritos y del sistema ELISA sandwich y el Western blot con el anticuerpo R5 nos han permitido detectar la presencia de

hordeínas y de los transcritos correspondientes a la hordeína B1 durante el desarrollo gameofítico de cebada. Hasta ahora se había creído que los genes de las prolaminas en cereales se expresaban exclusivamente en el endospermo amiláceo durante las etapas media y tardía de su desarrollo (Shewry y Halford, 2002). Sin embargo nuestros resultados muestran que los genes que codifican para las hordeínas se expresan no sólo en proembriones androgénicos sino también durante el desarrollo gametofítico del polen de cebada. Sin duda, la sensibilidad de estas técnicas ha sido clave a la hora de detectar las bajísimas cantidades de ARNs y proteínas que se sintetizan durante el desarrollo gametofítico. Además la detección de estas macromoléculas propició el estudio de localización de los transcritos de la hordeína B1 y de las hordeínas mediante las técnicas de citología molecular: inmunocitoquímica e hibridación *in situ*. La expresión de los genes que codifican para estas proteínas es realmente baja durante el desarrollo gametofítico pero la coincidencia de resultados obtenidos por técnicas muy distintas refuerza el valor de estos datos.

Aunque se ha descrito que las proteínas de almacenamiento sintetizadas durante la maduración del polen proporcionan los materiales necesarios para el crecimiento rápido durante la germinación del tubo polínico (rev. Mascarenhas, 1989; Herman y Larkins, 1999) no existe mucha bibliografía sobre proteínas de almacenamiento en polen y hasta la fecha no se había descrito la presencia de prolaminas en el desarrollo gametofítico. Por otro lado, Boutelier *et al.* (1994) estudiando la expresión de genes que codifican para proteínas de almacenamiento de embrión zigótico (napinas en *Brassica napus*) encontraron la presencia de estos mensajeros tanto en desarrollo gametofítico como en el desarrollo androgénico, lo que tiene cierto paralelismo con nuestros resultados para hordeínas.

Las hordeínas junto con el resto de prolaminas de otros cereales (gliadinas, secalinas y aveninas) tienen un alto potencial alergénico siendo la causa de la alergia al gluten y también del asma del panadero causada por las gliadinas, globulinas y albúminas inhaladas en las harinas. Aunque no se conoce el mecanismo, se ha descrito que la introducción temprana de cereales en la dieta de los niños podría tener una cierta relación con el incremento en ellos del riesgo de sufrir asma causado por polen de gramíneas (Armentia *et al.*, 2001). La presencia de hordeínas en polen hace pensar que entre los posibles desencadenantes de la respuesta alérgica al polen de gramíneas podrían estar las prolaminas, aunque su presencia en el polen es realmente baja.

Por último decir, que el empleo de todo este conjunto de técnicas ha permitido obtener una imagen bastante detallada sobre la presencia de las hordeínas durante la inducción y primeras etapas de la androgénesis y ha propiciado el hallazgo de la expresión de estas proteínas durante el desarrollo gametofítico. El amplio abanico de técnicas empleadas en este estudio refuerza sin duda el valor de los resultados obtenidos.

4. EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE LA INDUCCIÓN Y LAS PRIMERAS ETAPAS DE LA ANDROGÉNESIS.

4.1. *Hvpg1*

Los genes que se expresan durante el desarrollo del polen han sido clasificados atendiendo a su patrón de expresión temporal en genes de expresión temprana (“early pollen genes”) y genes de expresión tardía (“late pollen genes”) (Mascarenhas, 1990). Los transcritos de genes de expresión temprana se detectan por primera vez inmediatamente después de la meiosis y su expresión se reduce o cesa completamente en polen

maduro. Por el contrario, los transcritos de genes de expresión tardía se detectan por primera vez coincidiendo con la mitosis de las microsporas y continúan acumulándose mientras el polen madura. En general, se asume que los genes de expresión temprana codifican para proteínas del citoesqueleto, para proteínas necesarias en la síntesis de la pared o en la formación de depósitos de almidón mientras que los de expresión tardía codifican para proteínas requeridas en la maduración del polen, la germinación o el crecimiento del tubo polínico (McCormick, 1993).

En esta tesis hemos estudiado la expresión de un gen de expresión tardía en polen que codifica para una poligalacturonasa específica de polen. Las poligalacturonasas actúan, según se ha descrito en la literatura, modificando la estructura de las pectinas y su actividad ha sido asociada a la maduración de los frutos (rev. Haldfield y Bennet, 1998), la abscisión de órganos (Taylor *et al.*, 1990; Bonghi *et al.*, 1992), la dehiscencia de la vaina y la antera (Meakin y Roberts, 1991) y la maduración del grano de polen y el crecimiento del tubo polínico (Pressey y Reger, 1989; Pressey, 1991). En el polen de maíz y en el de otras monocotiledóneas, entre ellas trigo, avena y centeno, se han detectado bioquímicamente poligalacturonasas (Pressey y Reger, 1989) y se han descrito secuencias de poligalacturonasas de polen de *Oenothera organogensis* (Brown y Crouch, 1990), maíz (Allen y Lonsdale, 1992; Niogret *et al.*, 1991) y tabaco (Tebutt *et al.*, 1994). En todos los casos se trataba de familias multigénicas que se expresaban sólo después de la mitosis del polen (Allen y Lonsdale, 1993; Brown y Crouch, 1990; Tebutt *et al.*, 1994). Por tanto, los genes de las poligalacturonasas de polen están incluidos, como ya se ha dicho, dentro de los genes de expresión tardía del polen. Se piensa que la función de las poligalacturonasas en el polen es la de degradar la pared, facilitar la dehiscencia de la antera, la penetración del tubo polínico en el estigma y el crecimiento del tubo polínico (Allen y Lonsdale, 1993). Probablemente, las pectinas

hidrolizadas en el tubo polínico por la poligalacturonasa y por otras enzimas proporcionan los precursores para el crecimiento de la pared celular (Pressey y Reger, 1989).

Nuestros resultados del estudio de la expresión del gen de la poligalacturonasa *Hvpg1* obtenidos mediante RT-PCR e hibridación *in situ* durante el desarrollo gametofítico de cebada muestran que este gen sigue un patrón de expresión similar al de los genes de poligalacturonasas en pólenes como los de la *Oenothera organogensis* (Brown y Crouch, 1990), el maíz (Allen y Lonsdale, 1992; Niogret *al.*, 1991) y el tabaco (Tebutt *et al.*, 1994). Al igual que el resto de los genes de poligalacturonasas implicadas en el desarrollo de polen, no se expresa en microspora vacuolada y comienza a expresarse tras la mitosis de la microspora en el polen bicelular joven manteniéndose su expresión hasta la maduración del mismo.

Además, en el proceso de androgénesis hemos comprobado que este gen también se expresa tras el pretratamiento de inducción con manitol (A3). Se ha descrito que la primera mitosis es un punto crítico durante el desarrollo del polen, en este momento las microsporas puede ser más vulnerables a estímulos externos (Reynolds, 1997), pudiendo seguir la gametogénesis o ser inducidas hacia androgénesis (Bedinger y Ederton, 1990). Nuestros resultados muestran que los transcritos del gen de la poligalacturonasa, gen que se expresa en el desarrollo normal del polen tras la mitosis de las microsporas, están presentes también en microsporas vacuoladas sometidas al tratamiento de inducción de androgénesis. Este hecho parece indicar que durante el tratamiento de estrés con manitol las microsporas vacuoladas mantienen, al menos en parte, el patrón de expresión génica que conduce de la formación de los gametos.

Se ha postulado que para que se produjera la desviación del polen desde la ruta gametofítica a la esporofítica requerida para la

androgénesis era necesaria: la inhibición del desarrollo del polen, la entrada de las microsporas en la ruta embriogénica, que se produce como una respuesta a las señales de estrés, y, finalmente, el desarrollo irreversible de la ruta embriogénica independientemente ya de las señales de estrés (Pechan *et al.*, 1991). Touraev *et al.* (2000) añadieron que el tratamiento de estrés no sólo detiene el desarrollo del polen sino que realmente lo reprograma hacia el desarrollo esporofítico. Para estos autores los cambios en la expresión génica deben producirse durante el tratamiento de estrés que es el responsable del paso al nuevo modelo de desarrollo. Nuestros resultados muestran, sin embargo, que tras el tratamiento de estrés no se ha detenido la expresión de este gen gametofítico: las microsporas inducidas por el estrés con manitol han sintetizado transcritos de un gen involucrado en el desarrollo gametofítico, es decir, presentan transcritos que no estaban en el estadio de microspora vacuolada, cuando se inició la inducción androgénica, pero que sí estaban en el estadio inmediatamente posterior al de microspora vacuolada del desarrollo gametofítico: el polen bicelular joven.

Por otro lado, Garrido *et al.* (1993), trabajando con tabaco en donde el estadio óptimo de partida para la inducción androgénica es el polen bicelular joven en lugar de la microspora vacuolada como en cebada, compararon los patrones proteicos mediante electroforesis bidimensional de polen bicelular antes y tras el pretratamiento de inducción y no encontraron ninguna diferencia entre ellos. Sin embargo, estos mismos autores mostraron mediante traducción *in vitro* de los mensajeros correspondientes, que a diferencia de lo que ocurría con los patrones proteicos, sí existían diferencias con respecto a los patrones de ARNm de polen embriogénico y no embriogénico, de lo que dedujeron la existencia de genes nuevos que se transcribían como consecuencia de la inducción pero no se traducían. Es decir, sugirieron una regulación a

nivel postranscripcional de los nuevos transcritos consecuencia de la inducción, que no se traducen hasta después de la transferencia del polen a un medio rico. Esto nos hace pensar en la posibilidad de que ocurra lo mismo con algunos transcritos de genes implicados en la ruta gametofítica, es decir, que estén también regulados postranscripcionalmente y aunque se sinteticen los transcritos, no se traduzcan en ese momento. Sin embargo es posible que el cambio en la expresión génica al pasar de la ruta gametofítica a la esporofítica tenga lugar más tarde, cuando se pasan las microsporas del medio con manitol al medio rico ya que nuestros resultados muestran que tras 3 días de cultivo el gen de la poligalacturonasa no se expresa en el polen embriogénico.

Por otro lado, estos mismos autores posteriormente (Zarsky *et al.*, 1995) describieron la expresión durante la inducción y las primeras etapas de la androgénesis en *Nicotiana tabacum* de un gen de una proteína de choque térmico (*Nthsp 18P*) cuya expresión se activaba justo antes de la anthesis durante el desarrollo del polen. Esto coincide en gran parte con nuestros resultados ya que se trata de un gen que se activa al final del desarrollo gametofítico y que se expresa durante la inducción androgénica obtenida sometiendo a un pretratamiento de ayuno al polen bicelular. En este caso se postuló que la proteína de choque térmico que se activaba durante el desarrollo gametofítico ejerciera también alguna función durante la inducción androgénica ya que la expresión de este tipo de proteínas ha sido ampliamente descrita durante este proceso (Pechan *et al.*, 1991, Cordewener *et al.*, 1995). En el caso de la poligalacturonasa se podría especular que estas proteínas ejercieran también alguna función durante la inducción androgénica, por ejemplo, que estuvieran implicadas en el engrosamiento que sufre la intina tras la inducción androgénica.

4.2. *ECA1*

Ha sido postulado que la inducción de embriogénesis del polen requiere entre otras cosas el inicio de un nuevo programa de expresión génica (Cordewener *et al.*, 1994). En este sentido hasta la fecha sólo se han descrito unos pocos genes que se expresen específicamente durante las etapas tempranas de la androgénesis (revs. Touraev, 1997; Reynolds, 1997). Entre estos genes está el gen *ECA1* “early culture abundant 1” que se expresa de forma diferencial en las primeras etapas del cultivo de microsporas tras la inducción androgénica en cebada (Vrinten *et al.*, 1999). Nuestros resultados de RT-PCR e hibridación *in situ* muestran que este gen no se expresa durante el desarrollo gametofítico, ni en microsporas vacuoladas ni en estadios posteriores, sin embargo sí se expresa en las microsporas justo después del pretratamiento de inducción con manitol (A3), esto parece indicar que su expresión es una consecuencia de la inducción de la androgénesis. Sin embargo Vrinten *et al.* (1999) no encontraron expresión tras la inducción con manitol cuando utilizaron para el análisis la técnica del Northern blot. Esta diferencia puede ser atribuida a la menor sensibilidad de esta técnica comparada con la de RT-PCR e hibridación *in situ* que nosotros hemos utilizado. Sin embargo, Vrinten *et al.* (1999) sí detectaron los correspondientes mensajeros posteriormente, en los primeros días de cultivo al igual que nosotros hasta que la expresión desaparecía en los proembriones androgénicos tras 13 días de cultivo. En los experimentos de hibridación *in situ* en los que analizamos más estadios del desarrollo de la androgénesis (C3, C6, C9 y C13) que en los estudios mediante RT-PCR (C3 y C13) observamos que en C9 todavía hay expresión de este gen. Los mensajeros desaparecen a partir de C13 donde la pared de la microspora prácticamente ha desaparecido por completo y el patrón de desarrollo del embrión ya está establecido. El hecho de que el gen *ECA1*

se exprese únicamente tras el pretratamiento de inducción y los primeros días de cultivo en el medio con maltosa indica que este gen puede ejercer una función en la inducción androgénica. Además nuestros resultados y los resultados de Vrinten *et al.* (1999) muestran que este gen parece ser específico de androgénesis ya que no se expresa en hojas, raíz o tejidos meristemáticos y tampoco durante la embriogénesis zigótica, aunque no se ha estudiado su expresión en embriones somáticos. Todo esto parece indicar que este gen podría ser clave en la inducción y en la primera etapa de la androgénesis. Aunque la secuencia de *ECA1* no tiene homología significativa con ningún gen conocido, Vrinten *et al.* (1999) propusieron que probablemente codificara para una proteína extracelular secretada al medio durante el cultivo, cuya su secuencia de aminoácidos recordaba a una AGP atípica deficiente en hidroxiprolina que era secretada por cultivos de células de zanahoria en suspensión (Baldwin *et al.*, 1993). Las proteínas AGPs que se han estudiado en esta tesis están implicadas en la embriogénesis somática: las AGPs reconocidas por el anticuerpo JIM4 están presentes únicamente en las células embriogénicas (Šamaj *et al.*, 1999a) mientras que las que se unen al anticuerpo JIM8 representan una señal soluble necesaria para la inducción de embriogénesis somática (McCabe *et al.*, 1997). En este sentido la proteína ECA1 contiene un potencial péptido señal que indica que es una proteína secretada y su expresión parece estar regulada por la densidad celular de las microsporas en cultivo (Vrinten *et al.*, 1999) al igual que ocurre con las AGPs que reaccionan con JIM8 (McCabe *et al.*, 1997). Esto nos hace pensar, por homología con la embriogénesis somática, que *ECA1* podría ser un gen que se expresase como consecuencia del pretratamiento de inducción con manitol y codificara una proteína que se va a secretar al medio pudiendo representar una molécula señal necesaria para las primeras divisiones androgénicas. En este sentido, Garrido *et al.* (1993) apuntaron que uno de los posibles

mecanismos para la inducción de androgénesis era que el tratamiento de ayuno indujera una señal que activara la expresión de genes específicos tras la transferencia al medio rico. Sin embargo estos autores propusieron que la señal fuera intracelular. Twell *et al.* (1998) también apuntaron una señal celular o la disrupción de señales como responsables del paso de la ruta gametofítica a la ruta esporofítica.

Según nuestros resultados que muestran que *ECA1* se expresa justo tras la inducción de androgénesis (A3), *ECA1* podría utilizarse como marcador de la inducción androgénica en cebada.

En relación con nuestros resultados para el gen de poligalacturonasa de polen se puede deducir que durante el tratamiento de estrés con manitol se expresan simultáneamente genes del desarrollo gametofítico y genes relacionados con la inducción de androgénesis. Los resultados para estos dos genes también apuntarían que antes de que se detenga el desarrollo gametofítico ya se expresan genes relacionados con la inducción y por tanto que las dos primeras etapas en las que Pechan *et al.* (1991) dividen la inducción androgénica, la inhibición del desarrollo del polen y la entrada de las microsporas en la ruta embriogénica como respuesta a las señales de estrés, podrían coincidir en el tiempo.

4.3. *HvNAGLU* y *HvEMB615*

Aunque los diferentes tipos de embriogénesis (zigótica, somática y androgénica) se activen mediante diferentes señales y se produzcan a partir de diferentes tejidos de partida, es razonable asumir que los tres procesos converjan en una etapa muy temprana en una misma ruta que de lugar a un embrión completo. En este sentido los embriones somáticos y los embriones androgénicos muestran la misma morfología general que los embriones zigóticos y expresan algunos genes y acumulan ciertas proteínas que se expresan normalmente en embriones

zigóticos (Crouch, 1982; Shoemaker *et al.*, 1987; Joy *et al.*, 1991; Misra *et al.*, 1993; Boutelier 1994; Koltunow *et al.*, 1996; Chatthai y Misra, 1998; Šunderlíková y Wilhelm, 2002; Maraschin *et al.*, 2003). Por ello una de las aproximaciones utilizadas para el estudio de la androgénesis es el análisis, durante el desarrollo androgénico, de genes que se expresan durante la embriogénesis zigótica. En este sentido, nosotros hemos estudiado la expresión de *EMB615* y *Naglu*, dos genes identificados a partir de una colección de mutantes de las primeras etapas de la embriogénesis zigótica de *Arabidopsis*. Nuestros resultados de RT-PCR e hibridación *in situ* muestran que estos genes se expresan durante la embriogénesis zigótica y también durante la androgénesis pero además encontramos que estos genes se expresan durante el desarrollo gametofítico e incluso en hoja.

El número de genes *EMB*, cuyo nombre viene de “embryo-letal” o “embryo-defective” (Meinke y Sussex, 1979), es superior a 500 y codifican funciones únicas que no pueden ser complementadas por otros mecanismos (Depres *et al.*, 2001). Muchos de estos genes es probable que lleven a cabo funciones esenciales implicadas más o menos directamente en la morfogénesis y por ello se expresan en diferentes tejidos además del embrión. Las expresiones de los genes *Naglu* y *EMB615* en diferentes tejidos refleja que estos genes están realizando una función celular general en todos ellos, tanto durante las embriogénesis zigótica y androgénica como durante el desarrollo gametofítico y en hoja. En este sentido, por ejemplo, el gen identificado por Boutelier *et al.* (2002) *BABY BOOM* que está implicado en la iniciación del patrón embrionario y se expresa en la androgénesis y primeras etapas de la embriogénesis zigótica de *Brassica napus* resultó tener mucha semejanza con la familia AP2/ERF de factores de transcripción. En cuanto al gen *EMB615*, no parece tener homología con ningún gen hasta ahora descrito pero parece estar implicado en el establecimiento del

patrón radial en el embrión y en la formación del tejido vascular. Al igual que Naglu parece codificar una proteína presente en distintos tejidos y tipos celulares, además de en el embrión zigótico. Su expresión en la androgénesis y embriogénesis zigótica es un ejemplo más de expresión paralela de genes en ambos procesos embriogénicos.

El gen *Naglu* de *Arabidopsis* tiene homología con enzimas N-acetilglucosaminidasa. Estas enzimas están implicadas en la N-glicosilación de proteínas. En plantas, como en el resto de los eucariotas, la mayoría de las proteínas solubles y unidas a membrana son glicoproteínas, incluyendo las que se van a exportar al aparato de Golgi, lisosomas, la membrana plasmática y la matriz extracelular. Los glicanos juegan un papel fundamental para el plegamiento y ensamblaje correcto de las proteínas, para su estabilidad y también parecen estar implicados directamente en el reconocimiento de proteínas (Lerouge *et al.*, 1998). La N-glicosilación es la modificación postraduccional más compleja que ocurre en las células eucariotas y tiene lugar principalmente en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi (Maia y Leite, 2001). La N-acetilglucosaminidasa es una enzima que hidroliza grupos N-acetilglucosamina de muchas glicoproteínas cuando estas ya están en la vacuola camino a su destino final y por tanto, esta enzima es esencial para su correcto procesamiento. En los embriones zigóticos, somáticos y androgénicos, como en todas las células, hay numerosas glicoproteínas que desempeñan importantes y diferentes funciones: son componentes de la pared celular, proteínas de almacenamiento, moléculas señal... Las AGPs son una de las pocas moléculas de la pared celular que pueden contener N-acetilglucosamina y glucosamina (van Hengel *et al.*, 2001) Aunque las AGPs son glicoproteínas principalmente O-glicosiladas, van Holst *et al.* (1981) mostraron que también poseen una pequeña cantidad de N-acetilglucosamina. Las AGPs, como ya se ha descrito en esta tesis, juegan un papel importante en los procesos de embriogénesis. En este

sentido, ha sido descrito que proteínas arabinogalactanos que contienen N-acetilglucosamina y glucosamina controlan la embriogénesis somática (van Hengel *et al.*, 2001). En el procesamiento de estas moléculas están probablemente implicadas la N-acetilglucoaminidasas por lo que estas enzimas son imprescindibles para el correcto procesamiento de estas moléculas. Probablemente, al igual que ocurre en la embriogénesis somática, en la androgénesis y en la embriogénesis zigótica estén implicadas AGPs con restos de N-acetilglucosamina. Asimismo, la N-acetilglucoaminidasa por su papel en el procesamiento de AGPs puede afectar a los procesos en los que las AGPs que poseen N-acetilglucosamina estén implicadas, alterando por tanto sus funciones celulares.

4.5. *END1*

Recientemente se ha descrito la presencia de ARNm de genes específicos de endospermo que codificaban para proteínas que no eran de reserva en embriones androgénicos tempranos de maíz (Magnard *et al.*, 2000). Además, se ha descrito la presencia en estos embriones androgénicos de regiones con una organización cenocítica similar a la que aparece en el inicio de la formación del endospermo en cereales, es decir, de regiones donde se producen una serie de divisiones nucleares sin que tenga lugar paralelamente la citoquinesis (Magnard *et al.*, 2000, Testillano *et al.*, 2002). Nuestros resultados también muestran la existencia de este tipo de dominios con organización cenocítica en el polen multicelular androgénico de cebada. En base a estos datos, en esta tesis se planteó el estudio durante las primeras etapas de la androgénesis de la expresión del gen *END1* que ha sido descrito como un marcador del endospermo cenocítico de cebada y cuyos transcritos también se habían encontrado posteriormente en el desarrollo del

endospermo en algunas zonas del endospermo amiláceo (Doan *et al.*, 1996). Nuestros resultados de RT-PCR e hibridación *in situ* muestran que este gen se expresaba ya en polen multicelular tras 3 días de cultivo, y se seguía expresando tras 6, 9 y 13 días de cultivo. No encontramos ninguna preferencia de los transcritos por un dominio o región determinada en el polen multicelular homogéneo o heterogéneo ni en los proembriones androgénicos. Estos resultados coinciden con los de Magnard *et al.*, (2000) que tampoco encontraron una localización preferencial de los transcritos de genes de endospermo en los proembriones androgénicos de maíz. Su expresión en estadios tempranos de la androgénesis (3 días después del comienzo del cultivo) hace de *END1* una herramienta valiosa como marcador de androgénesis temprana.

Por otro lado, estos resultados también muestran que el gen *END1* además de expresarse en el endospermo, se expresa en el propio embrión zigótico de cebada lo cuál no había sido descrito con anterioridad en el trabajo dónde se había estudiado su expresión (Doan *et al.*, 1996). Este patrón de expresión coincide con el de otros genes que muestran una expresión similar en el endospermo y el embrión de cereales (Olsen *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1996). Por otra parte, esta expresión está de acuerdo con la probable homología en la evolución del embrión y el endospermo (Friedman, 1992, 1994, 1998). La presencia del producto de este gen en el embrión no permite la utilización del mismo como marcador de endospermo por lo que no se pueden extraer conclusiones en este sentido. Sin embargo sí se puede concluir que dado que es un gen expresado tanto en el embrión zigótico con el embriones androgénico podría tratarse de un gen necesario en procesos de embriogénesis producida tanto *in vivo* como *in vitro*. Para reforzar esta idea quizás sería conveniente ver su posible expresión en embriones somáticos aunque en cebada no es fácil la obtención de este tipo de embriones *in vitro*.

De nuestros resultados de expresión génica se pueden extraer distintas conclusiones. Por un lado estos análisis han contribuido a un mayor conocimiento de cómo se producen en el tiempo los distintos procesos implicados en la inducción androgénica. En este sentido, nuestros resultados han mostrado que durante el tratamiento de estrés se expresan genes implicados en el desarrollo gametofítico y también genes relacionados con la propia inducción androgénica. Se podría deducir con estos datos que no es necesaria la completa inhibición del desarrollo del polen para que comiencen a expresarse los genes implicados en la inducción. Por otro lado, se han identificado dos genes: *ECA1*, que puede ser utilizado como marcador de la inducción y primeras divisiones androgénicas y *END1*, que muestra una vez más el paralelismo existente entre los procesos de embriogénesis zigótica y androgénica. Por otro lado, considerando los resultados de hibridación *in situ* del gen de la hordeína B1, del gen *END1* y de los ortólogos en cebada a los genes *Naglu* y *EMB615* de *Arabidopsis* no hemos encontrado diferencias de expresión entre los dos tipos celulares encontrados en los granos multicelulares heterogéneos. Según nuestros resultados parecen seguir un mismo patrón de expresión génica. Aunque estos resultados tanto citológicos como moleculares han contribuido al mejor conocimiento del proceso de androgénesis en cebada, este proceso es todavía un gran puzzle en el que faltan muchas piezas y para su total comprensión aún queda un largo camino plagado de preguntas sin resolver.



Conclusiones

1. El estudio morfológico de los embriones obtenidos mediante cultivo de anteras y microsporas aisladas de cebada ha mostrado que no existen diferencias significativas entre ellos y que, además, siguen un patrón de desarrollo similar en ambos casos. Se ha comprobado que una vez alcanzado el estadio globular se desarrollan también de manera muy semejante al embrión zigótico de esta especie.

2. Se han descrito dos posibles rutas de formación de embriones androgénicos en cebada. Estas rutas se distinguen fundamentalmente porque mientras que la primera se inicia por una división simétrica de las microsporas, la segunda lo hace a través de una división asimétrica, con la particularidad de que, en este último caso, ambos tipos de células se siguen dividiendo hasta que, una vez rota la exina, uno de ellos degenera.

3. Los estudios inmunocitoquímicos realizados en las paredes de los granos multicelulares androgénicos han permitido determinar la existencia de cambios en la composición de la pared de la intina como consecuencia de la inducción androgénica. Comprobándose que, antes de la inducción, las pectinas presentes en la intina están altamente esterificadas mientras que, tras la inducción, se produce una estratificación de la intina: en la capa más externa se acumulan pectinas con bajo grado de esterificación y calosa que antes no estaba presente. Las pectinas altamente esterificadas se distribuyen en todas las capas de la intina.

De esta forma se ha establecido que la calosa puede servir como un marcador de plasmodesmos, facilitando el seguimiento de la evolución de los mismos durante la androgénesis. Asimismo, se ha puesto de manifiesto que se producen cambios en las AGPs como consecuencia de la inducción androgénica aunque su papel no parece ser completamente equiparable al asignado para ellas en embriogénesis somática.

4. En la intina de los granos de polen multicelulares obtenidos mediante cultivo de microsporas aisladas se han detectado depósitos densos a los electrones que contienen hierro. Estos depósitos no están presentes en la intina de los granos embriogénicos obtenidos mediante cultivo de anteras. Esta diferencia apunta a un posible exceso de este elemento en el medio que debe corregirse en el caso del cultivo de microsporas aisladas.

5. Se ha puesto de manifiesto la presencia de hordeínas y gliadinas en etapas muy tempranas del desarrollo zigótico de cebada y trigo. Por otro lado, se ha detectado la presencia de hordeínas y la expresión de sus genes durante la androgénesis y el desarrollo gametofítico de cebada.

6. Se ha mostrado la expresión del gen de una poligalacturonasa de polen durante el desarrollo gametofítico y tras la inducción androgénica de cebada. Esto indica que tras la inducción no se inactiva la expresión de todos los genes específicos de la ruta gametofítica.

7. Se ha demostrado el gen *ECA1*, que en principio se describió como específico de las primeras etapas de la androgénesis, no sólo se expresa tras estas etapas sino también justo después de la inducción androgénica por lo que se ha propuesto su utilización como marcador de la inducción androgénica en cebada.

8. Se ha determinado que los genes ortólogos en cebada de los genes *EMB615* y *Naglu* implicados en la embriogénesis zigótica de *Arabidopsis thaliana* se expresan también en la embriogénesis androgénica y zigótica de cebada.

9. Se ha mostrado que el gen *END1*, en principio descrito como específico de endospermo de cebada, se expresa también en el embrión zigótico de esta planta. Además, se ha puesto de manifiesto que se expresa en las primeras etapas de la androgénesis lo que demuestra la existencia de genes que tienen una expresión paralela en embriogénesis zigótica y androgénica.



Bibliografía

- Alché J.D., Castro A.J., Solymoss M., Timar I., Barnabás B. y Rodríguez-García M.I. (2000). Cellular approach to the study of androgenesis in maize anthers: immunocytochemical evidence of the involvement of the ubiquitin degradative pathway in androgenesis induction. *J. Plant Physiol.*, 156: 146-155.
- Allen R.L. y Lonsdale D.M. (1992). Sequence analysis of three members of the maize polygalacturonase gene family expressed during pollen development. *Plant Mol. Biol.*, 20: 343-345.
- Anand V.V., Arekal G.D. y Swamy B.G.L. (1980). Chimera embryooids of pollen origin in tobacco. *Curr. Sci.*, 49: 603-604.
- Angold R.E. (1967). The ontogeny and fine structure of pollen grain of *Endymion non-scriptus*. *Rew. Of Paleobotany and Palynology*, 3: 205-212.
- Armentia A., Bañuelos C., Arranz M.L., del Villar V., Martín-Santos J.M., Gil F.J., Vega J.M., Callejo A. y Paredes C. (2001). Early introduction of cereal into children's diet as a risk-factor of grass pollen asthma. *Clin. Exp. Allergy*, 31: 1250-1255.
- Arenas Mena C., Raynal M., Borrell A., Varoquaux F., Cutanda M.C., Stacy R.A.P., Pagès M., Delseny M. y Culiáñez-Macià F.A. (1992). Expression and cellular localization of *Atrab 28* during *Arabidopsis* embryogenesis. *Plant Mol. Biol.*, 40: 355-363.
- Armstrong T.A., Metz S.G., Mascia P.N. (1987). Two regeneration system for the production of haploid plants from wheat anther culture. *Plant Sci.*, 51: 231-237.
- Bacic A., Harris P.J. y Stone B.A. (1988). Structure and function of plant cell walls. *The biochemistry of plants. A comprehensive treatise*. Vol. 14: Carbohydrates. Preiss J. (Ed.). Academic Press, New York, London: 297-371.

- Baldwin T.C., McCann M.C. y Roberts K. (1993). A novel hydroxyproline-deficient arabinogalactan protein secreted by suspension-cultured cells of *Daucus carota*. *Plant Physiol.*, 103: 115-123.
- Barceló J., Nicolás G., Sabater B. (1998). Maduración y germinación de las semillas. *Fisiología Vegetal. Ciencia y Técnica*. Sánchez R.(Ed.). Pirámide.
- Barnabas B., Franz P.F., Schel J.H.N. (1987). Ultrastructural studies on pollen embryogenesis in maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Rep.*, 6: 212-215.
- Bechtel D.B., Gaines R.L. y Pomeranz Y. (1982a). Early stages in wheat endosperm formation and protein body initiation. *Ann. Bot.*, 50: 507-518.
- Bechtel D.B., Gaines R.L. y Pomeranz Y. (1982b). Protein secretion in wheat endosperm-formation of the matrix protein. *Cereal Chem.*, 59. 5: 336-343.
- Bechtel D.B. y Pomeranz Y. (1979). Endosperm ultrastructure of barley isogenic lines. *Cereal Chem.*, 56: 446-452.
- Bechtel D.B., Wilson J.D., Shewry P.R. (1991). Immunocytochemical localization of the wheat storage protein triticin in developing endosperm tissue. *Cereal Chemistry*, 68: 573-577.
- Bedinger P.A. y Ederton M.D. (1990). Developmental staging of maize microspores reveals a transition in developing microspore proteins. *Plant Physiol.*, 92: 474-479.
- Bernard S. (1980). *In vitro* androgenesis in hexaploid triticale-determination of physical conditions increasing embryoid and green plant production. *Z. Pflanzenphysiol.*, 85: 308.
- Berger F. (1999). Endosperm development. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2: 28-32.
- Birchall J.D. (1990). The role of silicon in biology. *Chem. Br.*, 26: 141-144.

- Birchall J.D., Exley C., Chappell J.S., Phillips M.J.(1989). The interrelationship between silicon and aluminum in the biological effects of aluminium. *Nature*, 338: 146-148.
- Blackmore S. y Barnes S.H. (1987). Pollen wall morphogenesis in *Tragopogon porrifolius* (*Compositae: Lactuaceae*) and its taxonomic significance. *Review of Paleobotany and Palinology*, 52: 233-246.
- Blumenthal C.S., Batey I.L., Bekes F., Wrigley C.W. y Barlow E.W.R. (1990). Gliadin genes contain heat-shock elements: possible relevance to heat-induced changes in grain quality. *Journal of Cereal Science*: 11: 185-187.
- Bonet F.J., Azbaid L. y Olmedilla A. (1998). Pollen embryogenesis: atavism or totipotency? *Protoplasma*, 202: 115-121.
- Bonet F.J. y Olmedilla A. (2000). Structural changes during early embryogenesis in wheat pollen. *Protoplasma*, 211: 94-102.
- Bonghi C., Rascio N., Ramina A. y Casadoro G. (1992). Cellulase and polygalacturonase involvement in the abscission of leaf and fruit explants of peach. *Plant Mol. Biol.*, 20: 839-848.
- Bouharmont J. (1977). Cytology of micropore and calli after anther culture in *Hordeum vulgare*. *Caryologia*, 30: 351-360.
- Bourgin J.P. y Nitsch J.P. (1967). Obtention of *Nicotiana* haploids a partir d'étamines cultivées *in vitro*. *Ann. Physiol. Veg.*, 9: 377-382.
- Boutilier K.A., Giné M.J., DeMoot J.M., Baszczyński C.L., Iyer V.N. y Miki B.L. (1994). Expression of the BnmNAP subfamily of napin genes coincides with the induction of *Brassica* microspore embryogenesis. *Plant Mol. Biol.*, 26: 1711-1723.
- Boutilier K., Offringa R., Sharma V.K., Kieft H., Ouellet T., Zhang L., Hattori J., Liu C.-M., van Lammeren A.A.M., Miki B.L.A., Custers J.B.M. y van Lookeren Campagne M.M. (2002). Ectopic expression

- of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *The Plant Cell*, 14: 1737-1749.
- Brooks R.R., y Lee J., Reeves R.D. y Jaffre T. (1977). Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium species of indicator plants. *J. Geochem. Explor.*, 7: 49-57.
- Brown R.C., Lemmon B., Doan D., Linnestad C. y Olsen O.-A. (1996). The reprogrammed embryo: the endosperm as a quick route to understanding embryogenesis. *Embryogenesis, the generation of a plant*. Wang T.L. y Cuming A. (Eds.). BIOS Scientific Publishers, Oxford: 159-172.
- Brown S.M., Crouch M.L. (1990). Characterization of a gene family abundantly expressed in *Oenothera organensis* pollen that shows sequence similarity to polygalacturonase. *Plant Cell*, 2: 263-274.
- Burgess S.R., Shewry P.R. (1986). Identification of homologous globulins from embryos of wheat, barley, rye and oats. *Journal of Experimental Botany*, 37: 1863-1871.
- Candy J.M., Klinowski J., Oakley A.E., Carpenter T.A., Perry R.H., Atack J.R., Perry E.K., Blessed G., Fairbairn A. y Edwasson J.A. (1986). Aluminosilicates and senile plaques formation in Alzheimer's disease. *The lancet*, 1: 354-357.
- Carpita N.C. y Gibeaut D.M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.*, 3: 1-30.
- Casero P.J. y Knox J.P. (1995). The monoclonal antibody JIM5 indicates patterns of pectin deposition in relation to pit fields at the plasma-membrane-face of tomato pericarp cell walls. *Protoplasma*, 188: 133-137.
- Castillo A.M., Cistué L., Vallés M.P., Sanz J.M., Romagosa I., Molinacano J.L. (2001). Efficient production of androgenic doubled-

- haploid mutants in barley by the application of sodium azide to anther and microspore cultures. *Plant Cell Reports*, 20: 105-111.
- Castillo A.M., Vallés M.P. y Cistué L. (2000a). Comparison of anthers and isolated microspore cultures in barley. Effects of culture density and regeneration medium. *Euphytica* 113: 1-8.
- Castillo A.M., Vallés M.P. y Cistué L. (2000b). Improvements in barley androgenesis for plant breeding. Biotechnological approaches for utilization of gametic cells. COST 824. Bohanec B. (Ed.). European Communities, Belgium: 15-21.
- Cistué L., Ramos A., Castillo A.M. y Romagosa I. (1994). Production of large number of doubled haploid plants from barley anthers pretreated with high concentrations of mannitol. *Plant Cell Reports*, 13: 709-712.
- Cistué L., Ramos A. Y Castillo A.M. (1999). Influence of anther pretreatment and culture medium composition on the production of barley doubled haploids from model and low responding cultivars. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 55:159-166.
- Cistué L., Ziauddin A., Simion E. y Kasha K.J. (1995). Effects of culture conditions on isolated microspore response of barley cultivar Igri. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 42: 163-169.
- Clapham D. (1971) *In vitro* development of callus from de pollen of *Lolium* and *Hordeum*. *Z.Pflanzenzücht*, 69: 142-155.
- Clark J. (1996). Maize embryogenesis mutants. Embryogenesis the generation of a plant. Wang y Cuming (Eds.). BIOS Scientific Publishers, 89-109.
- Clark J.K. y Sheridan W.F. (1991). Isolation and characterisation of 51 embryo-specific mutations of maize. *Plant Cell*, 3: 935-951.
- Clarke A.E., Anderson R.L. y Stone B.A. (1979). Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. *Phytochemistry*, 18: 521-540.

- Coimbra S. y Salema S. (1997). Immunolocalization of arabinogalactan proteins in *Amaranthus hypochondriacus* L. ovules. *Protoplasma*, 199: 75-82.
- Cordewener J.H.G., Busik R., Traas J.A., Custer J.B.M., Dons H.J.M. y van Lookeren Campagne M.M. (1994). Induction of microspore embryogenesis in *Brassica napus* is accompanied by specific changes in protein synthesis. *Planta*, 195: 50-56.
- Cordewener J.H.G., Hause G., Görden E., Busink R., Hause B., Dons H.J.M., van Lammeren A.A.M., van Lookeren Campagne M.M. y Pechan P. (1995). Changes in synthesis and localisation of members of the 70-kDa class of heat shock proteins accompany the induction of embryogenesis in *Brassica napus* L. *Planta*, 196: 747-755.
- Côté F. y Hahn M.G. (1994). Oligosaccharins : structure and signal transduction. *Plant Mol. Biol.*, 12: 1379-1411.
- Cowen N.M., Johnson C.D., Armstrong K., Miller M., Woosley A., Pescitelli S., Skout M., Belmar S. y Petolino J.F. (1992). Mapping genes conditioning androgenesis in maize using RFLP analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 84: 720-724.
- Crouch M.L. (1982). Non-zygotic embryos of *Brassica napus* L. contain embryo-specific storage proteins. *Planta*, 156: 520-524.
- Cunningham D.K., Geddes W.F. y Anderson J.A. (1955a). Preparation and chemical characteristics of the cohesive proteins of wheat, baley, rye and oats. *Cereal Chem.*, 32: 91-106.
- Cunningham D.K., Geddes W.F. y Anderson J.A. (1955b). Precipitation by various salts of the proteins extracted by formic acid from wheat, barley, rye and oat flours. *Cereal Chem.*, 32: 192-199.
- Custers J.B.M., Cordewener J.H.G., Nollen Y., Dons H.J.M., van Lookeren Campagne M.M. (1994). Temperature controls both

- gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus*. Plant Cell Rep., 13: 267-271.
- Chatthai M. y Misra S. (1998). Sequence and expression of embryogenesis-specific cDNAs encoding 2S seed storage proteins in *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.)Franco. Planta, 206: 138-145.
- Chen C.C., Howarth M.J., Peterson R.L., Peterson R.L., Kasha K.J. (1984a). Ultrastructure of androgenic microspores of barley during the early stages of anther culture. Can. J. Genet. Cytol., 26: 484-491.
- Chen C.C., Kasha K.J. y Marsolais (1984b). Segmentation patterns of genome multiplication in cultured microspores of barley. Can. J. Genet. Cytol., 26: 475-483.
- Chen Y. (1986). Anther and pollen culture of rice. Haploids of higher plants *in vitro*. Hu H. y Yang H. (Eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: 3-25.
- Chen Z.Z. y Chen Z.H. (1983). Induction of rape embryoids from float culture of anthers. Cell and tissue techniques for cereal crop improvement. Proceedings of a workshop cosponsored by Institute of Genetics. Academic Sinica y IRRI (Eds). Science Press, Beijing, 436.
- Cheung A.Y. y Wu H.M. (1999). Arabinogalactan proteins in plant reproduction. Protoplasma 208, 87-98.
- Cho M.S. y Zapata F.J. (1988) Callus formation and plant regeneration in isolated pollen culture of rice (*Oryza sativa* L., cv Taipei309). Plant Sci., 58: 239-244.
- Dale P.J. (1975). Pollen dimorphism and anther culture in barley. Planta, 127: 213-220.
- Darvill A., Augur C., Bergmann C., Carlson R.W., Cheog J-J., Eberhard S., Hahn M.G., Ló V-M., Margá V., Meyer B., Mohnen D., O'Neill M.A., Spiro M.D:, Van Halbeek H., York W.S. y Albersheim P.

- (1992). Oligosaccharins-oligosaccharides that regulate growth, development and defence responses in plants. *Glycobiology*, 2: 181-198.
- Davies J.T., Shewry P.R. y Harris N. (1993). Spatial and temporal patterns of B hordein synthesis in developing barley (*Hordeum vulgare L.*) caryopses. *Cell Biology International*, 17.2: 195-202.
- Day A. y Ellis T.H.N. (1984). Chloroplast DNA deletions associated with wheat plants regenerated from pollen: possible basis for maternal inheritance of chloroplasts. *Cell*, 39: 359-368.
- Day A. y Ellis T.H.N. (1985). Deleted forms of plastid DNA in albino plants from cereal anther culture. *Current Genetics*, 9: 671-678.
- De Jong A.J., Schmidt E.D.L. y De Vries S.C. (1993). Early events in higher plant embryogenesis. *Plant Mol. Biol.*, 22: 367-377.
- Despres B., Delseny M. y Devic M. (2001). Partial complementation of *embryo defective* mutations: a general strategy to elucidate gene function. *The Plant Journal*, 27.2: 149-159.
- Dickinson H.G. (1970). Ultrastructural aspects of primexine formation in the microspore tetrad of *Lilium longiflorum*. *Cytobiol.*, 1: 437-449.
- Doan D.N.P., Linnestad C. y Olsen O.-A. (1996). Isolation of molecular markers from the barley endosperm coenocyte and the surrounding nucellus cell layers. *Plant Molecular Biology*, 31: 877-886.
- Dolan L., Linstead P. y Roberts K. (1995). An AGP epitope distinguishes a central metaxylem initial from other vascular initials in the *Arabidopsis* root. *Protoplasma*, 189: 149-155.
- Dolan L., Linstead P. y Roberts K. (1997). Developmental regulation of pectic polysaccharides in the root meristem of *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.*, 48: 713-720.

- Doong R.L., Liljebjelke K., Fralish G., Kumar A., y Mohnen D. (1995). Cell free synthesis of pectin: Identification and partial characterization of polygalacturonate 4- α -galacturonosyltransferase and its products from membrane preparations of tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv samsun) cell suspension cultures. *Plant Physiol.*, 109: 141-152.
- Driouich A., Faye L., y Staehelin L.A. (1993). The plant Golgi apparatus: a factory for complex polysaccharides and glycoproteins. *Trends Biochem. Sci.*, 18: 210-214.
- Du H., Clarke A.E. y Bacic A. (1996). Arabinogalactan-proteins: a class of extracellular matrix proteoglycans involved in plant growth and development. *Trends in Cell Biology*, 6: 411-414.
- Dubois T., Guedira M., Dubois J. y Vasseur J. (1991). Direct somatic embryogenesis in leaves of *Cichorium*: a histological and SEM study of early stages. *Protoplasma*, 162: 120-127.
- Dubois T., Dubois J., Guedira M., Diop A. y Vasseur J. (1992). SEM characterization of an extracellular matrix around somatic proembryos in roots of *Cichorium*. *Ann. Bot.*, 70: 119-124.
- Dunbar A. (1973). Pollen development in the *Eleochari palustris* group (*Cyperaceae*). I. Ultrastructure and ontogeny. *Botaniska Notiser*, 126: 197-254.
- Dunwell J.D. y Sunderland N. (1974). Pollen ultrastructure in anther culture of *Nicotiana tabacum* II. Changes associated with embryogenesis. *J. Exp. Bot.*, 25: 363-373.
- Dunwell J.D. y Sunderland N. (1976). Pollen ultrastructure in anther cultures of *Datura innoxia*. I. Division of the presumptive vegetative cell. *J. Cell Sci.*, 22: 469-480.

- Dunwell J.M. (1981). Stimulation of pollen embryo induction in tobacco by pre-treatment of excised anthers in a water-saturated atmosphere. *Plant Sci. Lett.*, 21: 9-13.
- Erwee M. y Goodwin P.B. (1983). Characterisation of the *Egeria densa* Planch, leaf symplast: inhibition of the intercellular movement of fluorescent probes by group II ions. *Planta*, 158: 320-328.
- Eschrich W. (1975). Sealing system in phloem. *Encyclopedia of Plant Physiology*, vol.1: Transport in plants. I. Phloem Transport. Zimmermann J.A. y Milburn J.A. (Eds). Springer-Verlag, Berlin: 39-56.
- Feng G.H. y Ouyang J. (1988). The effects of KNO₃ concentration in callus induction medium for wheat anther culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 12: 3-12.
- Fernández M.C. y Rodríguez-García M.I. (1988). Pollen wall development in *Olea europaea*. *New Phytol.*, 108: 91-99.
- Fernández M.C. y Rodríguez-García M.I. (1989). Developmental changes in the aperture during pollen grain ontogeny in *Olea europaea* L. *New Phytologist*, 108: 91-99.
- Field J.M., Shewry P.R. y Mifflin B.J. (1982). The purification and characterization of homologous high molecular weight storage proteins from grain of wheat, rye and barley. *Theor. Appl. Genet.*, 62: 329-336.
- Fincher G.B., Stone B.A. y Clarke A.E. (1983). Arabinogalactan-proteins: Structure, biosynthesis and function. *Rev. Plant Physiol.*, 34: 47-70.
- Finnie S.J., Powell W. y Dyer A.F. (1989). The effects of carbohydrate composition and concentration on anther culture response in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Breed.*, 103: 110-118.
- Finnie S.J., Dyer A., Chalmers K.J., Forster B.P. y Powell W. (1991). Genetic stability of microspore-derived families of barley: A

- cytological, biochemical and molecular study. *Genome*, 34: 923-928.
- Foroughi-Wehr B., Friedt W., Wenzel G. (1982). On the genetic improvement of androgenetic haploid formation in *Hordeum vulgare* L. *Theor. Appl. Genet.*, 62: 233-239.
- Forster B.P. y Powell W. (1996). Haploidy in barley. *In vitro* haploid production in higher plants. Jain S.M., Sopory S.K. y Veilleux R.E. (Eds.) Kluwer Acad. Publishers, 4: 99-115.
- Franco C.R., Chagas A.P. y Jorge R.A. (2002). Ion-exchange equilibria with aluminum pectinates. *Colloids and Surfaces. A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 204: 183-192.
- Franz P.F. y Schel J.H.N. (1991). Cytodifferentiation during the development of friable embryogenic callus of maize (*Zea mays*). *Can. J. Bot.*, 69: 26-33.
- Franz P.F. y Schel J.H.N. (1994). Ultrastructural studies on callus development and somatic embryogenesis in *Zea mays* L. *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol. 25. Bajaj Y.P.S. (Ed.). Springer, Berlin, Heidelberg, New York: 50-65.
- Friedman W.E. (1992). Evidence of a pre-angiosperm origin of endosperm: implications for the evolution of flowering plants. *Science*, 255: 336-339.
- Friedman W.E. (1994). The evolution of embryogeny in seed plants and the developmental origin and early history of endosperm. *Am. J. Bot.*, 81: 1468-1486.
- Friedman W.E. (1998). The evolution of double fertilization and endosperm: a "historical" perspective. *Sex. Plant Reprod.*, 11: 6-16.
- Fry S.C. (1985). Primary cell wall metabolism. *Oxf. Surv. Plant Mol. Cell Biol.*, 2: 1-42.

- Fujino T. e Itoh T. (1998). Changes in pectin structure during epidermal cell elongation in pea (*Pisum sativum*) and its implications for cell wall architecture. *Plant Cell Physiology*, 39: 1315-1323.
- Gao M. y Showalter A.M. (1999). Yariv reagent treatment induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement. *Plant J.*, 19.3: 321-331.
- Garrido D., Eller N., Heberle-Bors E. y Vicente O. (1993). *De novo* transcription of specific mRNAs during the induction of tobacco pollen embryogenesis. *Sex. Plant Reprod.*, 6: 40-45.
- Garrido D., Vicente O., Heberle-Bors E. y Rodríguez-García M.I. (1995). Cellular changes during the acquisition of embryogenic potential in isolated pollen grains of *Nicotiana tabacum*. *Protoplasma*, 186: 220-230.
- Geitmann A., Hudák J., Venningerholz F., Walles B. (1995). Immunogold localization of pectin and callose in pollen grains and pollen tubes of *Brugmansia suaveolens*: implications for the self incompatibility reaction. *J. Plant Physiol.*, 147: 225-235.
- Genovesi A.D. y Magill C.W. (1979). Improved rate of callus and green plant production from rice anther cultures following cold shock. *Crop Sci.*, 19: 267-268.
- Ghaemi M. y Sarrafi A. (1994). The effect of the "D" genome from synthetic wheat lines in anther culture responses. *Plant Breed.*, 112: 76-79.
- Giorgi B. (1991). Induction of haploid plants in wheat and triticale. *Cereals Res. Comm.*, 19: 267-268.
- Goldberg R.B., de Paiva G.R. y Yadegari R. (1994). Plant embryogenesis: Zygote to seed. *Science*, 266: 605-614.
- Goldberg R., Jauneau A., Jarvis M.C. (1996). Methylesterification, de-esterification and gelation of pectins in the primary cell wall.

-
- Visser J., Voragen A.G.J. (Eds.) Pectins and pectinases. Elsevier, Amsterdam: 151-172.
- Goldberg R., Morvan C. y Roland J.C. (1986). Composition, properties and localization of pectins in young and mature cells of the mung bean hypocotyl. *Plant Cell Physiol.* 27: 419-427.
- González-Melendi P., Testillano P.S., Ahmadian P., Fadón B., Vicente O. y Risueño M.C. (1995). In situ characterisation of the late vacuolated microspore as a convenient stage to induce embryogenesis in *Capsicum*. *Protoplasma*, 187: 60-71.
- González-Melendi P., Testillano P.S., Ahmadian P., Fadón B., Risueño M.C. (1996). New *in situ* approaches to study induction of pollen embryogenesis in *Capsicum annuum* L. *Eur.J.Cell Biol.*, 69: 373-386.
- Guglielmino N., Liberman M., Jauneau A., Vian B., Catesson A.M. y Goldberg R. (1997). Pectin immunolocalization and calcium visualization in differentiating derivatives from poplar cambium. *Protoplasma*, 199: 151-160.
- Guha S. y Maheshwari S.C. (1964). *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, 204: 497.
- Guha S. y Maheshwari S.C. (1966). Cell división and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. *Nature*, 212: 97-98.
- Hadfield K.A. y Bennett A.B. (1998). Polygalacturonases: Many genes in search of a function. *Plant Physiology*, 117: 337-343.
- Hagberg A. y Hagberg G. (1980). High frequency of spontaneous haploids in the progeny of an induced mutation in barley. *Hereditas*, 93: 341-343.
- Hagberg A. y Hagberg G. (1987). Production of spontaneously doubled haploids in barley systems with marker genes and the "hap"-gene. *Biologisches Zentralblatt*, 106: 84-97.

- Hall J.L. (2002). Cellular mechanism for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Botany*, 53. 366: 1-11.
- Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 167: 557-580.
- Hansenn A.L., Plever C. , Perderson C.H, Keimer B. y Andersen S.B. (1994). Efficient *in vitro* chromosome doubling during *Beta vulgaris* ovule culture. *Plant Breed.*, 112: 85-89.
- Hause B., Hause G., Pechan P., van Lammeren A.A.M. (1993). Cytoskeletal changes and induction of embryogenesis in microspore and pollen cultures of *Brassica napus* L. *Cell Biol. Int.*, 17: 153-168.
- Hause G. y Hahn H. (1998). Cytological characterization of multicellular structures in embryogenic microspore cultures of *Brassica napus* L. *Bot. Acta*, 111: 204-211.
- Hayashi R., Morikawa H., Nakajima N., Ichikawa Y. y Senda M. (1980). Oriented structure of pectic polysaccharides in pea epidermal cell walls. *Plant Cell Physiol.*, 21: 999-1005.
- Heberle-Bors y Reinert J. (1979). Androgenesis in isolated pollen cultures of *Nicotiana tabacum*: dependence upon pollen development. *Protoplasma*, 99: 237-245.
- Heck G.R., Chamberlain A.K., Ho D.T-H. (1993). Barley embryo globulin 1 gene, *Beg1*: characterization of cDNA chromosome mapping and regulation of expression. *Molecular and General Genetics*, 239: 209- 218.
- Heckel T., Werner K., Sheridan W.F., Dumas C. y Rogowsky P.M. (1999). Novel phenotypes and developmental arrest in early embryo specific mutants of maize. *Planta*, 210: 1-8.
- Heese M., Ulrike M. y Jürgens G. (1998). Cytokinesis in flowering plants: Cellular process and development integration. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1: 486-491.

- Henry Y., y de Buyser J. (1989). Floata culture of wheat anthers. *Theor. Appl. Genet.*, 60: 77-79.
- Herman E.M. y Larkins B.A. (1999). Protein storage bodies and vacuoles. *The Plant Cell*, 11: 601-613.
- Heslop-Harrison J. (1964). Cell walls, cell membranes and protoplasmic connections during meiosis and pollen development. *Pollen Physiology and Fertilization*. Linkers H.F. (Ed). NorthHolland, Amsterdam: 29-47.
- Heslop-Harrison J. (1966). Cytoplasmic connections between angiosperm meiocytes. *Annals of Botany*, 30: 221-230.
- Heslop-Harrison J. (1968). The pollen grain wall. *Science*, 161: 230-237.
- Heslop-Harrison J. y MacKenzie A. (1967). Autoradiography of 2-[14C]thymidine derivative during meiosis and microsporogenesis in *Lilium* anthers. *Journal of Cell Science*, 2: 397-400.
- Hodson M.J. y Sangster A.G. (1993). The interaction between silicon and aluminium in *Sorghum bicolor* (L.) Moench: growth and X-ray microanalysis. *Annals of Botany*, 72: 389-400.
- Hoekstra S., van Zijderveld M.H., Louwerse J.D., Heidekamp F. y van der Mark F. (1992). Anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. cv. Igri. *Plant Science*, 86: 89-96.
- Hoekstra S., van Zijderveld M.H., Heidekamp F. y van der Mark F. (1993). Microspore culture of *Hordeum vulgare* L.: the influence of density and osmolarity. *Plant Cell Reports*, 12: 661-665.
- Horner M. y Street H.E. (1978). Pollen dimorphism- origin and a significance in pollen plant formation by anther culture. *Ann. Bot.*, 42: 763-777.
- Hu T. y Kasha K.J. (1999). A cytological study of pretreatment effects on isolated microspore culture of wheat *Triticum aestivum* cv. Chris. *Genome*, 42: 432-441.

- Huang B. y Sunderland N. (1982). Temperature-stress pretreatment in barley anther culture. *Ann. Bot.*, 49: 77-88.
- Huang B. (1986). Ultrastructural aspects of pollen embryogenesis in *Hordeum*, *Triticum* and *Paeonia*. Haploids of higher Plants *in vitro*. Hu H. y Yang H. (Eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: 91-117.
- Hunter C.P. (1988). Plant regeneration from microspores of barley, *Hordeum vulgare* L. Ph. Thesis, Wye College, University of London.
- Idzikowska K., Ponitka A. & Młodzianowski F. (1982). Pollen dimorphism and androgenesis in *Hordeum vulgare*. *Acta Soc. Bot. Pol.* 51: 153-156.
- Idzikowska F. y Młodzianowski F. (1979). Cell wall formation in multinucleate pollen grains of *Hordeum vulgare* anthers culture *in vitro*. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 48: 377-388.
- Iler R.K. (1979) The chemistry of silica: solubility, polymerization, colloid and surface properties, and biochemistry. Wiley J and sons (Eds.). Plenum Press, New York.
- Imamura J. y Harada H. (1980). Effects of abscisic acid and water stress on the embryo and plant formation in anther cultures of *Nicotiana tabacum* cv. Samsun. *Z. Pflanzenphysiol*, 100: 285-289.
- Imamura J. y Harada H. (1981). Stimulation of tobacco pollen embryogenesis by anaerobic treatments. *Z. Pflanzenphysiol*, 103: 259-263.
- Iyer R.D. y Raina S.K. (1972). The early ontogeny of embryoids and callus from pollen and subsequent organogenesis in anther cultures of *Datura metel* and rice. *Planta*, 104: 146-156.
- Jaradat A.A. (1991). Grain protein variability among populations of wild barley (*Hordeum spontaneum* C.Koch) from Jordan. *Theor. Appl. Genet.*, 83: 164-168.

- Jarvis M.C., Forsyth W., Duncan H.J. (1988). A survey of the pectic content of nonlignified monocot cell walls. *Plant Physiol.*, 88: 309-314.
- Jásik J., Salajová T. y Salaj J. (1995). Developmental anatomy and ultrastructure of early somatic embryos in European black pine (*Pinus nigra* Arn.). *Protoplasma*, 185: 205-211.
- Jauh G.J. y Lord E.M. (1996). Localization of pectins and arabinogalactan-proteins in lily (*Lilium longiflorum* L.) pollen tube and style, and their possible roles in pollination. *Planta*, 199: 251-261.
- Johri B.M., Ambeogakar K.B. y Srivastana P.S. (1992). Comparative embryology of angiosperms. Springer-Verlag, New York.
- Jones L.H. (1974). Plant cell culture and biochemistry: Studies for improved vegetable oil production. Industrial aspects of biochemistry. Spencer B. Fed. Eur. Biochem. Soc.:813-833.
- Joy I.V.R.W., Yeung E.C., Kong L. y Thorpe T.A. (1991). Development of white spruce somatic embryos: I. Storage product deposition. *In Vitro Cell Dev. Biol.Plant*, 27: 32-41.
- Kao K.N. (1981). Plant formation from barley anther cultures with Ficoll media. *Z Pflanzenphysiol*, 103: 437-443.
- Kao K.N., Saleem M., Abrams S., Pedras M., Horn D. y Mallard C. (1991). Culture conditions for induction of green plants from barley microspores by anther culture methods. *Plant Cell Reports*, 9: 595-601.
- Karnovsky M.J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 27: 137A-137B.
- Kartha K.K., Chibbar R.N., Georges F., Leung N., Caswell K., Kendal E. y Qureshi J. (1989). Transient expression of chloramphenicol

- acetyltransferase (CAT) gene in barley cell cultures and immature embryos through microprojectile bombardment. *Plant Cell Rep.*, 8: 429-432.
- Kasha K.J., Ziauddin A. y Cho U.H. (1990). Haploids in cereal improvement: Anther and microspore culture. *Gene Manipulation in Plant Improvement II*. Gustafson J.P. (Ed.): Plenum Press, New York: 213-235.
- Kasha K.J., Hu T.C., Oro R., Simion E. y Shim Y.S. (2001). Nuclear fusion leads to chromosome doubling during mannitol pretreatment of barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores. *Journal of Experimental Botany*, 52. 359: 1227-1238.
- Kempers R., Prior D.A.M., Van Bell A.J.E. y Oparka K.J. (1993). Plasmodesmata between sieve element and companion cell of extrafascicular stem phloem of *Cucurbita maxima* permit passage of 3 kDa fluorescent probes. *Plant J.*, 4: 567-575.
- Knox J.P. (1990). Patterns of expression of the JIM4 arabinogalactan-protein epitope in the cell cultures and during somatic embryogenesis in *Daucus carota* L. *Planta*, 180: 285-292.
- Knox J.P. (1996). Arabinogalactan-proteins: developmentally regulated proteoglycans of the plant cell surface. Smallwood M., Knox J.P., Bowles D.J. (Eds). *Membranes: specialised functions in plants*. Bios Scientific Publishers, Oxford: 93-102.
- Knox J.P., Day S. y Roberts K. (1989). A set of cell surface glycoproteins forms an early marker of cell position, but not cell fate, in the root apical meristem of *Daucus carota* L. *Development*, 106: 47-56.
- Knox J.P., Linstead P.J., King J., Cooper C. & Roberts K.(1990). Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices. *Planta*, 150:72-74.

- Køie B., Ingversen J., Andersen A.J., Doll H. y Eggum B.O. (1976). Composition and nutritional quality of barley protein. Evaluation of seed protein alterations by mutation breeding. IAEA, Viena: 55-61.
- Kohlenbach H.W. (1978). Comparative somatic embryogenesis. *Frontiers of plant tissue culture*. Thorpe T.A. (Ed.). Univ. of Calgary Press, Calgary, Canada: 59-66.
- Kölher F. y Wenzel G. (1985). Regeneration of isolated barley microspores in conditioned media and trials to characterize the responsible factor. *J. Plant Physiol.*, 121: 181-191.
- Koltunow A.M., Hidake T. y Robinson S.P. (1996). Polyembryony in *Citrus*. Accumulation of seed storage proteins in seeds and in embryos cultured *in vitro*. *Plant Physiol.* 110: 599-609.
- Koul A.K. y Karihaloo J.L. (1977). *In vivo* embryoids from anthers of *Narcissus biflorus* Curt. *Euphytica*, 26: 97-102.
- Krämer U., Pickering I.J., George M.J., Smith R.D., George G.N. y Salt D.E. (2000). Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species. *Plant Physiology*, 122: 1343-1354.
- Kranz E. y Kumlehn J. (1999). Angiosperm fertilization, embryo and endosperm developed *in vitro*. *Plant Science*, 142: 183-197.
- Kranz E., von Wiegen P., Quader H. y Lörz H. (1998). Endosperm development after fusion of isolated single maize sperm and central cells *in vitro*. *Plant Cell*, 10: 511-524.
- Kreis M. y Shewry P.R. (1989). Unusual features of cereal seed protein structure and evolution. *BioEssays*, 10: 201-207.
- Kriz A.L. (1989). Characterization of embryo globulins encoded by the maize Glb genes. *Biochemical Genetics*, 27: 239-251.
- Kriz A.L. (1999). 7S globulins of cereal. Seed proteins. Shewry P.R., Casey R. (Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 477-498.

- Kriz A.L. y Schwartz D. (1986). Synthesis of globulins in maize embryos. *Plant Physiology*, 82: 1069-1075.
- Kriz A.L. y Wallace N.H. (1991). Characterization of the maize Globulin-2 gene and analysis of two null alleles. *Biochemical Genetics*, 29: 241-254.
- Kumlehn J., Lörz H. y Kranz E. (1998). Differentiation of isolated wheat zygotes into embryos and normal plants. *Planta*, 205: 327-333.
- Kupper H., Lombi E., Zhao F.J., McGrath S.P. (2000). Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta*, 212: 75-84.
- Kyo M. y Harada H. (1986). Control of the developmental pathway of tobacco pollen in vitro. *Planta*, 168: 427-432.
- Kyo M. y Harada H. (1990a). Specific phosphoproteins in the initial period of tobacco pollen embryogenesis. *Planta*, 182: 58-63.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Larkin P.J., y Scowcroft W.R. (1983). Somaclonal variation and crop improvement. En: *Genetic Engineering of Plants: An Agricultural Perspective*: 289-314. T. Kosuge, C.P. Meredith & A. Hollaender (Eds). Plenum Press, New York.
- Larkins B.A. y Hurkman W.J. (1978). Synthesis and deposition of zein in protein bodies of maize endosperm. *Plant Physiol.*, 62: 256-263.
- Larsen E.T., Tuveesson I.K.D. y Andersen S.B. (1991). Nuclear genes affecting percentage of green plants in barley *Hordeum vulgare* L. anther culture. *Theor. Appl. Genet.*, 199:417-420.
- Larson A. y Lewis C.W. (1962). Pollen development *Parkinsonia aculata*. *Grana Palynol.*, 3: 21-27.
- Laux T. y Jürgens G. (1997). Embryogenesis a new start in life. *The Plant Cell*, 9: 989-1000.

-
- Lending C.R. y Larkins B.A. (1989). Changes in the zein composition of protein bodies during maize endosperm development. *Plant Cell*, 1: 1011-1023.
- Lerouge P., Cabanes-Macheteau M., Rayon C., Fischette-Lainé, Gomord V. y Faye L. (1998). N-glycoprotein biosynthesis in plants : recent developments and future trends. *Plant Mol. Biol.*, 38: 31-48.
- Levanony H., Rubin R., Altschuler Y. y Galili G. (1992). Evidence for a novel route of wheat storage proteins to vacuoles. *J. Cell Biol.*, 119: 1117-1128.
- Li M. (1982). Pollen dimorphism and androgenesis of *Paeonia in vivo*. *Acta Bot. Sinica*, 24: 17-20.
- Li Y., Alva A.K. y Sumner A.K. (1989). Response of cotton to aluminium in solutions with varying silicon concentrations. *Journal of Plant Nutrition*, 12: 881-892.
- Li Y.Q., Chen F., Linskens H.F. y Cresti M. (1994). Distribution of unesterified and esterified pectins in cell walls of pollen tubes of flowering plants. *Sex. Plant Reprod.*, 7: 145-152.
- Liners F., Van Cutsem P. (1992). Distribution of pectic polysaccharides throughout walls of suspension-cultured carrot cells. *Protoplasma*, 170: 10-21.
- Liners F., Gaspar T., Van Cutsem P. (1994). Acetyl- and methyl-esterification of pectins of friable and compact sugar-beet-calli: consequences for intercellular adhesion. *Planta*, 192: 545-556.
- Lopes M.A. y Larkins B.A. (1993). Endosperm origin, development, and function. *Plant Cell*, 5: 1383-1399.
- Lord E.M. y Sanders L.C. (1992). Roles for the extracellular matrix in plant development and pollination: a special case of cell movements in plants. *Dev. Biol.*, 153: 16-28.

- Lynch M.A. y Staehelin L.A. (1992). Domain-specific and cell type-specific localization of two types of cell wall matrix polysaccharides in the clover root tip. *J. Cell. Biol.*, 118: 467-479.
- Magnard J.L., Le Deunff E., Domenech J., Rogowsky P.M., Testillano P.S., Rougier M., Risueño M.C., Vergne P. y Dumas C. (2000). Genes normally expressed in the endosperm are expressed at early stages of microspore embryogenesis in maize. *Plant Mol. Biol.*, 44: 559-574.
- Maheshwari S.C., Rashid A. y Tyagi A.K. (1982). Haploids from pollen grains-retrospect and prospect. *Am. J. Bot.* 69: 865-879.
- Maia I.G. y Adilson L. (2001). N-glycosylation in sugarcane. *Genetics and Molecular Biology*, 24, 231-234.
- Majewska-Sawka A. (1998). Arabinogalactan-proteins play a role in embryogenesis? Gametic embryogenesis. Hansen M. (Ed.). European Comision, EUR 18423 EN Belgium.
- Majewska-Sawka A. y Nothnagel A. (2000). The multiples roles of Arabinogalactan proteins in Plant Development. *Plant Physiology*, 122: 3-9.
- Maltby D., Carpita N.C., Motezinos D., Kulow C. y Delmer D.P. (1979). B-1,3-Glucan in developing cotton fibers. Structure, localization and relationship of synthesis to that of secondary wall cellulose. *Plant Physiol.*, 63: 1158-1164.
- Maniatis T., Fritsch E.F. y Sambrook J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory. Cold Spring Harbour, New York.
- Maraschin S.F., Lamers G.E.M., de Pater B.S., Spaink H.P. y Wang M. (2003). 14-3-3 isomofoms and pattern formation during barley microspore embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 54.384: 1033-1043.

- Marsh M.N. (1992). Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology*, 102: 330-354.
- Martoja R. y Martoja-Pierson M. (1970). *Técnicas de Histología Animal*. Toray-Masson S.A. (Ed.) Barcelona.
- Mascarenhas J.P. (1975). The biochemistry of angiosperm pollen development. *Botanical Review*, 41: 259-314.
- Mascarenhas J.P. (1989). The male gametophyte of flowering plants. *The Plant Cell*, 1: 657-664.
- Mascarenhas J.P. (1990). Gene activity during pollen development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 41: 317-338.
- Mascarenhas J.P. (1993). Molecular mechanism of pollen tube growth and differentiation. *Plant Cell*, 5: 1303-1314.
- McCabe P.F., Valentine T.A., Forsberg L.S., Pennell R.I. (1997). Soluble signals from cells identified at the cell wall establish a developmental pathway in carrot. *Plant Cell*, 9: 2225-2241.
- McCann M.C., Stacey N.J., Wilson R. y Roberts K. (1993). Orientation of macromolecules in the walls of elongating carrot cells. *J. Cell. Sci.*, 106: 1347-1356.
- McCann M.C. y Roberts K. (1991). Architecture of the primary cell wall. *The cytoskeleton basis of plant growth and formation*. Lloyd C.W. (Ed.). Academic Press. London: 109-129.
- McCann M.C. y Roberts K. (1994). Changes in cell architecture during cell elongation. *Journal of Experimental Botany*, 45: 1683-1691.
- McCann M.C. y Roberts K. (1996). Plant cell wall architecture : the role of pectins and pectinases. *Pectins and pectinases*. Visser J., Voragen A.G.J. (Eds.). Elsevier, Amsterdam: 91-107.

- McCormick S. (1993). Male gametophyte development. *The plant cell*, 5: 1265-1275.
- Meakin P.J. y Roberts J.A. (1991). Anatomical and biochemical changes associated with the induction of oilseed rape (*Brassica napus*) pod dehiscence by *Dasineura brassicae* (Winn.). *Ann. Bot.*, 67: 193-197.
- Meinke D.W. (1994). Seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis*. Meyerowitz E.M. y Somerville C.R. (Eds.). Cold Spring Harbor, USA: Cold spring Harbor Laboratory Press: 253-295.
- Meinke D.W. (1996). Embryo-defective mutants of *Arabidopsis*: cellular functions of disrupted genes and developmental significance of mutant phenotypes. *Embryogenesis the generation of a plant*. Wang y Cuming (Eds). BIOS Scientific Publishers, 35-48.
- Meinke D.W. y Sussex I.M. (1979). Embryo-lethal mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Devel. Biol.*, 72: 50-61.
- Mifflin B.J. y Shewry P.R. (1977). Techniques for the separation of barley and maize seed proteins. EEC, Luxemburg.
- Misra S., Attree S.M., Leal I. y Fowke L.C. (1993). Effect of abscisic acid, osmoticum and desiccation on synthesis of storage protein during the development of white spruce somatic embryos. *Ann. Bot.*, 71: 11-22.
- Mogami N., Nakamura S. y Nakamura N. (1999). Immunolocalization of the cell wall components in *Pinus densiflora* pollen. *Protoplasma*, 206: 1-10.
- Mohnen D. y Hahn M.G. (1993). Cell wall carbohydrates as signals in plants. *Sem. Cell Biol.*, 4: 93-102.
- Moore P.J., Swords K.M.M., Lynch M.A., Staehelin L.A. (1991). Spatial organization of the assembly pathways of glycoproteins and

- complex polysaccharides in the Golgi apparatus of plants. *J. Cell. Biol.* 112, 589-602.
- Mordhorst A.P., y Lörz H. (1993). Embryogenesis and development of isolated barley (*Hordeum vulgare*, L.) microspores are influenced by the amount and composition of nitrogen sources in culture media. *J. Plant Physiol.*, 142: 485-492.
- Müntz K. (1998). Deposition of storage proteins. *Plant Molecular Biology*, 38: 77-99.
- Murashige T. y Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Murigneux A., Bentolila S., Hardy T., Baud S., Guitton C., Jullien H., Ben Tahar S., Freyssinet G., y Beckert M. (1994). Genotypic variation of quantitative trait loci controlling in vitro androgenesis in maize. *Genome*, 37: 970-976.
- Newcomb W. (1978). The development of cells in the coenocytic endosperm of the African blood lily *Haemanthus katherinae*. *Can. J. Bot.*, 56: 483-501.
- Niogret M.-F., Dubald M., Mandaron P. y Mache R. (1991). Characterisation of pollen polygalacturonase encoded by several cDNA clones in maize. *Plant Mol. Biol.*, 17: 1155-1164.
- Nitsch J.P. (1969). Experimental androgenesis in *Nicotiana*. *Phytomorphology*, 19: 389-404.
- Nitsch J.P. (1972). Haploids plants from pollen. *Z Pflanzenzuchtg*, 67 : 3-18.
- Nitsch C. (1974). La culture de pollen isolé sur milieu synthétique. *C. R. Acad. Sci. Paris* 278D: 1031-1034.
- Nitsch C. y Norreel B. (1973): Effet d'un choc thermique sur le pouvoir embryogène du pollen de *Datura innoxia* cultivé dans l'anthère ou isolé de l'anthère. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 276D: 303-306.

- Noher de Halac I., Cismondi I.A., Rodríguez-García M.I. y Famá G. (2003). Distribution of pectins in the pollen apertures of *Oenothera hookeri velans ster/+ster*. *Biocell*, 27.1:11-18.
- Norstog K. (1972). Nucellus during early embryogeny in barley: fine structure. *Bot. Gaz.* 135. 2: 97-103.
- Northcote D.H., Davey R. y Lay J. (1989). Use of antisera to localize callose, xylan and arabinogalactan in the cell-plate, primary and secondary walls of plant cells. *Planta*, 178: 353-366.
- Olsen P. (1986). Interactions between cell wall and plasmodesmata: model of a possible sphincter mechanism. *Cell Walls* 86. Vian B. Reis D. y Goldberg R.(Eds). Université Pierre et Marie Curie, Paris: 292-295.
- Olsen F.L. (1987). Induction of microspore embryogenesis in cultured anthers of *Hordeum vulgare*: the effects of ammonium nitrate, glutamine and asparagine as nitrogen sources. *Carlsberg Res. Commun.*, 52: 393-404.
- Olsen F.L. (1991). Isolation and cultivation of embryogenic microspores from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Hereditas*, 115: 255-266.
- Olsen O.-A., Brown R.C. y Lemmon B.E. (1995). Pattern and process of wall formation in developing endosperm. *BioEssays*, 17: 803-812.
- Olsen O.-A., Linnestad C. y Nichols S.E. (1999). Developmental biology of the cereal endosperm. *Trends Plant Sci.*, 4:253-257.
- O'Neill M., Albersheim P. y Darvill A. (1990). The pectic polysaccharides of primary cell walls of plants. *Methods in plant biochemistry*. Dey P.M. y Harbone J.B. (Eds). Academic Press, New York: 415-441.
- Oparka K.J. y Prior D.A.M. (1992). Direct evidence for pressure generated closure of plasmodesmata. *Plant J.*, 2: 741-750.
- Osborne T.B. (1924). *The Vegetable Proteins*. Monographs in Biochemistry., Longmans, Green y Co.(Eds.), London.

- Ouyang J.W., Zhou S.M. y Jia S.E. (1983). The response of anther culture to culture temperature in *Triticum aestivum*. Theor. Appl. Genet. 66: 101-109.
- Ovečka M., Bobák M., Blehová A. y Křištín J. (1998). *Papaver somniferum* regeneration by somatic embryogenesis and shoot organogenesis. Biol. Plant., 40: 321-328.
- Pan J.L., Gao G.H. y Ban H. (1983). Initial patterns of androgenesis in wheat anther culture. Acta Bot. Sinica, 25: 34-39.
- Pechan P.M., Keller W.A. (1988). Identification of potentially embryogenic microspores of *Brassica napus* L. Physiol. Plant, 74: 377-384.
- Pechan P.M., Keller W.A. (1989). Induction of microspore embryogenesis in *Brassica napus* by gamma irradiation and ethanol stress. In Vitro, 25: 1073-1074.
- Pechan P.M., Bartels D., Brown D.C.W. y Schell J. (1991). Messenger-RNA and protein changes associated with induction of *Brassica* microspore embryogenesis. Planta, 184: 161-165.
- Pennell R.I., Janniche L., Kjellbom P., Scofield G.N., Peart J.M. y Roberts K. (1991). Developmental regulation of a plasma membrane arabinogalactan protein epitope in oilseed rape flowers. Plant Cell, 3: 1317-1326.
- Pennell R.I., Janniche L., Scofield G.N., Booij H., De Vries S.C. y Roberts K. (1992). Identification of a transitional cell state in the developmental pathway to carrot somatic embryogenesis. Journal of Cell Biology, 119: 1371-1380.
- Perry C.C. y Keeling-Tucker T. (1998). Aspects of the bioinorganic chemistry of silicon in conjunction with the biometals calcium, iron and aluminium. Journal of Inorganic Biochemistry, 69: 181-191.
- Powell W., Hayter A.M., Wood W., Dunwell J.M. y Huang B. (1984). Variation in the agronomic characters of microspore-derived plants of *Hordeum vulgare* cv. Sabarlis. Heredity, 52: 13-23.

- Powell W., Borrino E.M., Allison M.J., Griffiths D. ., Asher M.J.C. y Dunwell J.M. (1986). Genetical analysis of microspore-derived plants of barley (*Hordeum vulgare* L.) Theor.Appl. Genet., 72: 619-626.
- Powell W. (1990). Environmental and genetical aspects of pollen embryogenes. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Haploids in Crop Improvement I, Bajaj YPS (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, 12: 45-65
- Powell W., Forster P.B., Thomas W.T.B., Waugh R., Chalmers K.J., Barea U. , Hakim L., Young G.R., Macaulay M., Hackett C.A. y McNicol J. (1991). Doubled haploids:their role in the location and analysis of polygenically controlled traits in barley. Scottish Crop Research Institute Annual Report 1991, 36-40.
- Pressey R. (1991). Polygalacturonase in tree pollens. Phytochemistry, 30: 1753-1755.
- Pressey R., Reger B.J. (1989). Polygalacturonase in pollen from corn and other grasses. Plant Sci., 59: 57-62.
- Pretova A., de Ruijter N.C.A., van Lammeren A.A.M. y Schel J.H.N. (1993). Structural observations during androgenic microspore culture of the 4c1 genotype of *Zea Mays* L. Euphytica, 65: 61-69.
- Pulido A., Castillo A., Vallés M.P. y Olmedilla A. (2001a). Early stages of pollen embryogenesis in barley anther cultures induced by pre-treatment with mannitol. Int.J.Dev. Biol., 45:55-56.
- Pulido A., Castillo A., Vallés M.P. y Olmedilla A. (2001b). The origin and structure of barley-pollen embryos induced by anther culture: polarisation and cell differentiation.
- Pulido A., Castillo A., Vallés M.P. y Olmedilla A. (2002). In search of molecular markers for androgenesis. Biologia, 57.1: 29-36
- Rahavan V. (1977). Patterns of DNA synthesis during pollen embryogenesis in henbane. J. Cell. Biol., 73: 521-526.

- Raghavan V. (1986). Embryogenesis in Angiosperms: A developmental and Experimental Study. Cambridge University Press. Nueva York.
- Raghavan V. (1997). Molecular embryology of flowering plants. Cambridge Univ. Press Cambridge U.K.
- Ramanna M.S. (1974). The origin and in vivo development of embryoids in the anthers of *Solanum* hybrids. Euphytica, 23: 623-632.
- Ramanna M.S. y Hermsen J.G.TH. (1974). Embryoid formation in the anthers of some interspecific hybrids in *Solanum*. Euphytica, 23: 423-427.
- Raquin C. (1983). Utilization of different sugar as carbon source for *in vitro* anther culture in petunia. Z Pflanzenphysiol, 11: 453-457.
- Rashid A., Siddiqui A.W. y Reinert J. (1982). Subcellular aspects of origin and structure of pollen embryos of *Nicotiana*. Protoplasma, 113: 202-208.
- Rasmusson, D.C.(1992). Barley breeding at present and in the future. En: L. Munck (ED.) Barley Genetics VI, Vol. II. Munksgaard International, Copenhagen: 865-878.
- Rechinger K.B., Simpson D.J., Svedsen I., Cameron-Mills V. (1993). A role for γ 3-hordein in the transport and targetin of prolamin to the vacuole of developing barley endosperm. Plant J., 4: 841-853.
- Reinert J. y Bajaj Y.P.S. (1977). Anther culture: Haploid production and its significance. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Reinert J. y Bajaj Y.P.S. (Eds.). Springer-Verlag, Berlin: 251-267.
- Reynolds T.L. (1984). An ultrastructural and stereological analysis of pollen grains of *Hyoscyamus niger* during normal ontogeny and induced embryogenic development. Am. J. Bot., 71: 490-504.
- Reynolds T.L. (1985). Ultrastructure of anomalous pollen development in embryogenic anther cultures of *Hioscyamus niger*. Am. J. Bot., 72: 44-51.

- Reynolds T.L. (1990). Ultrastructure of pollen embryogenesis. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. vol. 12. Haploids in Crop Improvement I. Bajaj YPS (Ed.). Springer-Verlag, Berlin: 66-82.
- Reynolds T.L. y Kitto S.L. (1992). Identification of embryoid-abundant genes that are temporally expressed during pollen embryogenesis in wheat anther cultures. *Plant Physiol.*, 100: 1744-1750.
- Reynolds T.L. y Crawford R.L. (1996). Changes in abundance of an abscisic acid-responsive, early cysteine-labeled metallothionein transcript during pollen embryogenesis in bread wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Mol. Biol.*, 32: 823-829.
- Reynolds T.L. (1997). Pollen embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, 33: 1-10.
- Ridley B.L., O'Neill M.A. y Mohnen D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57: 929-967.
- Roberts K. (1990). Structures at the plant cell surface. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2: 920-928.
- Roberts-Oehlschlager S.L. y Dunwell J.M. (1990). Barley anther culture: pretreatment on mannitol stimulates production of microspore-derived embryos. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 20: 235-240.
- Roberts-Oehlschlager S.L. y Dunwell J.M. (1991). Barley anther culture: The effect of position on pollen development *in vivo* and *in vitro*. *Plant Cell Rep.*, 9: 631-634.
- Rocher A., Calero M., Soriano F. y Méndez E. (1996). Identification of major rye secalins as coeliac immunoreactive proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1295, 1: 13-22.
- Rodríguez-García M.I., Risueño M.C. y Sánchez-Pina A. (1983). Estructura y formación de la exina en el grano de polen de Liliaceas. *Acta IV Simposium Palinologia (APLE)*: 141-148.

- Rodríguez-García M.I. y Majewska-Sawka A. (1992). Is the special callose wall of microsporocytes an impermeable barrier?. *Journal of Experimental Botany*, 45. 257 : 1659-1663.
- Rodríguez-García M.I., Olmedilla A. y Alché J.D. (2000). The contributions and limitations of microscopy in studying the mechanisms of pollen embryogenesis. *Biotechnological approaches for utilization of gametic cells. COST 824. Bohanec B. (Ed.). European Communities, Belgium.*
- Rowley J.R. (1962). Stranded arrangement of sporopollenin in the exine microspores of *Poa annua*. *Science*, 137: 526-528.
- Rowley J.R. y Dunbar A. (1970). Transfer of colloidal iron from sporophyte to gametophyte. *Pollen et Spores*, 20: 468-484.
- Roy S., Jauneau A. y Vian B. (1994). Analytical detection of calcium ions and immunocytochemical study visualization of homogalacturonic sequences in the ripe cherry tomato. *Plant Physiol. Biochem.*, 32: 633-640.
- Rubin R., Levanony H. y Galili G. (1992). Characterization of two types of protein bodies in developing wheat endosperm. *Plant Physiol.*, 99: 718-724.
- Šamaj J., Bobák M., Ovečka M., Krištín J. y Blehová A. (1994). Extracellular matrix in early stages of plant regeneration *in vitro*. *Cell Biol. Inter.*, 18: 545.
- Šamaj J., Bobák M., Blehová A., Krištín J. y Auxtová-Šamajova O. (1995). Developmental SEM observations of an extracellular matrix in embryogenic calli of *Drosera rotundifolia* and *Zea Mays*. *Protoplasma*, 186: 45-49.
- Šamaj J., Baluška F., Bobák M. y Volkmann D. (1999a). Extracellular matrix surface network of embryogenic units of friable maize callus contains arabinogalactan-proteins recognized by monoclonal antibody JIM4. *Plant Cell Reports*, 18: 369-374.

- Šamaj J., Ensikat H.J., Baluška F., Knox J.P., Barthlott W. y Volkmann D. (1999b). Immunogold localization of plant surface arabinogalactan-proteins using glycerol liquid substitution and scanning electron microscopy. *J. of Microscopy*, 193.2: 150-157.
- Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual Ed.2.* Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbour. New York.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1997). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74: 5463-5467.
- Sangwan R.S. y Sangwan-Norreel B.S. (1996). Cytological and biochemical aspects of *in vitro* androgenesis in higher plants. In *in vitro* production of higher plants. Jain S.M., Sopory S.K. y Veilleux R.E. (Eds.) Kluwer Acad. Press, 1: 95-109.
- Scanlon M.J., Stinard P.S., James M.G., Myers A.M. y Robertson D.S. (1994). Genetics analysis of 63 mutations affecting maize kernel development isolated from Mutator stocks. *Genetics*, 136: 281-294.
- Schaumann A., Bruyant-Vannier M.-P., Goubet F. y Morvan C. (1993). Petic metabolism in suspension-cultured cells of flax, *Linum usitatissimum*. *Plant Cell Physiol.*, 34: 891-897.
- Schlüpmann H., Bacic A. y Read S.M. (1993). A novel callose synthase from pollen tubes of *Nicotiana*. *Planta*, 191: 470-481.
- Schmohl N. y Horst W.J. (2000). Cell wall pectin content modulates aluminium sensitivity of *Zea mays* (L.) cells grown in suspension culture. *Plant, Cell and Environment*, 23: 735-742.
- Schweizer L., Yerk-Davis G.L., Phillips R.L., Srien F. y Jones R.J. (1995). Dynamics of maize endosperm development and DNA endoreduplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7070-7074.

- Shannon P.R.M., Nicholson A.E., Dunwell J.M. y Davies D.R. (1985). Effect of orientation on microspore-callus production in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 4: 271-280.
- Sherrier D.J. y VanderBosch K.A. (1994). Secretion of cell wall polysaccharides in *Vicia* root hairs. *Plant J.*, 5: 185-195.
- Shewry P.R. y Halford N. (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*, 370. 53: 947-958.
- Shewry P.R. y Tatham A.S. (1990). The prolamin storage proteins: structure and evolution. *Biochem J.*, 267: 1-12.
- Shoemaker R.C., Christofferson S.E. y Galbraith D.W. (1987). Storage protein accumulation patterns in somatic embryos of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Reports*, 6: 12-15.
- Skerritt J.H., Frend A.J., Robson L.G. y Greenwell P. (1990). Immunological homologies between wheat gluten and starch granule proteins. *Journal of Cereal Science*, 12: 123-136.
- Sondahl M.R., Salisbury J.L., Sharp W.R. (1979). SEM characterization of embryogenic tissue and globular embryos during high-frequency somatic embryogenesis in coffee callus cells. *Z. Pflanzenphysiol.*, 94: 185-188.
- Sopory S.K. y Munshi M. (1996). Anther culture. *In vitro* haploid production in higher plants. Jain S.M., Sopory S.K. y Veilleux R.E. (Eds.) Kluwer Acad. Press, 1: 145-175.
- Sorell L., López J.A., Valdés I., Alfonso P., Camafeita E., Acevedo B., Chirido F., Gavilondo J. y Méndez E. (1998). An innovative sandwich ELISA system based on an antibody cocktail for gluten analysis. *FEBS Letters*, 439: 46-50.
- Sorvari S. y Schieder O. (1987). Influence of sucrose and melibiose on barley anther cultures in starch media. *Plant Breeding*, 99: 164.

- Souter M. y Lindsey K. (2000). Polarity and signalling in plant embryogenesis. *Journal of experimental botany*, 51.347: 971-983.
- Stacey N.J., Roberts K. y Knox J.P. (1990). Patterns of expressions of the JIM4 arabinogalactan-protein epitope in cell cultures and during somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta*, 180: 285-292.
- Staehelin L.A. y Moore I. (1995). The plant Golgi apparatus: structure, functional organization and trafficking mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46: 261-288.
- Steeves T.A. y Sussex I.M. (1989). *Patterns in Plant Development*. Cambridge Univ. Press, New York.
- Stenram U., Heneen W.J. y Skerritt J.H. (1991). Immunocytochemical localization of wheat storage proteins in endosperm cells 30 days after anthesis. *J. Exp. Bot.*, 42: 1347-1355.
- Stephenson M.B. y Hawes M.C. (1994). Correlation of pectin methylesterase activity in root caps of pea with root border cell separation. *Plant Physiology*, 106: 739-745.
- Stepka M., Ciampolini F., Charzynska M. y Cresti M. (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. 4: 630-635.
- Sterk P., Booij H., Schellekens G.A., van Kammen A. y de Vries S.C. (1991). Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell*, 3: 907-921.
- Stierhof Y-D., Humbel B.M., Hermann R., Otten M.T., y Schwarz H. (1992). *Scanning Microscopy* 6: 1009-1022.
- Stierhof Y-D, Hermann R., Humbel B.M., and Schwarz H. (1995). *Immunogold-Silver Staining. Principles, Methods, and Applications*. Ed. M. A. Hayat, CRC Press, Boca Raton: 97-118.

- Stone B.A. y Clarke A.E. (1992). Chemistry and Biology of (1→3) β-Glucans. La Trobe University Press, Victoria, Australia: 355-429.
- Sunderland N. (1974). Anther culture as a mean of haploid induction. Haploids in higher plants: advances and potential. Kasha K.J. (Ed.). The University of Guelph. Guelph: 91-122.
- Sunderland N. (1982). Induction of growth in the culture of pollen. Differentiation *in vitro*. Yeoman M.M.y Truman D.E.S. (Eds.). Cambridge University: 1-24
- Sunderland N. y Evans L.J. (1980). Multicellular pollen formation in cultured barley anthers.II. The A, B and C pathways. J. Exp. Bot., 31: 501-514.
- Sunderland N. y Huang B. (1985). Barley anther culture. The switch of program and albinism. Hereditas Suppl., 3: 27-40.
- Sunderland N. y Roberts M. (1977). New approach to pollen culture. Nature, 270: 236-238.
- Sunderland N., Roberts M., Evans L.J. y Wildon D.C. (1979). Multicellular pollen formation in cultured barley anthers. I. Independent division of the generative and the vegetative cells. J. Exp. Bot., 30: 1133-1144.
- Sunderland N. y Wicks F. (1971). Embryoid formation in pollen grains of *Nicotiana tabacum*. J. Exp. Bot., 22: 213-226.
- Sunderland N. y Xu Z.H. (1982). Shed pollen culture in *Hordeum vulgare*. J. Exp. Botany, 33: 1086-1095.
- Šunderlíková S. y Wilhelm E. (2002). High accumulation of legumin and *Lea*-like mRNAs during maturation is associated with increased conversion frequency of somatic embryos from pedunculate oak (*Quercus robur* L.)
- Szakács É. y Barnabás B. (1988). Cytological aspects of *in vitro* androgenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). Sex. Plant Reprod., 1:217-222.

- Tan B.H. y Halloran G.M. (1982). Pollen dimorphism and the frequency of inductive anthers in anther culture of *Triticum monococcum*. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 177: 197-202.
- Taylor J.E., Tucker G.A., Lasslett Y., Smith C.J.S., Arnold C.M., Watson C.F., Schuch W., Grierson D. y Roberts J.A. (1990). Polygalacturonase expression during leaf abscission of normal and transgenic plants. *Planta*, 183: 133-138.
- Tebbutt S.J., Rogers H.J. y Lonsdale D.M. (1994). Characterization of a tobacco gene encoding a pollen-specific polygalacturonase. *Plant Mol. Biol.*, 25: 283-297.
- Telmer C.A., Newcomb W. y Simmonds D.H. (1995). Cellular changes during heat shock induction and embryo development of cultured microspores of *Brassica napus* cv. Topas. *Protoplasma*, 185: 106-112.
- Terry B.R. y Robards A.W. (1987). Hydrodynamic radius alone governs the mobility of molecules through plasmodesmata. *Planta*, 171: 145-157.
- Testillano P.S., González-Melendi P., Ahmadian P., Fadón B., Risueño M.C. (1995). Immunolocalization of nuclear antigens during the pollen developmental program and the induction of pollen embryogenesis. *Exp. Cell Res.*, 221: 41-54.
- Testillano P.S., Ramírez C., Domenech J., Coronado M.J., Vergne P., Matthys-Rochon E. y Risueño M.C. (2002). Young microspore-derived maize embryos show two domains with defined features also present in zygotic embryogenesis. *Int. J. Dev. Biol.*, 46: 1035-1047.
- Thompson C.J., Novva N.R., Tizard R., Cramer R., Davies J.E., Lauwereys M. y Botterman J. (1987). Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *Bio/Technology*, 6: 2519-2523.

- Toonen M.A.J., Schmidt E.D.L., Hendriks T., Verhoeven H.A., Van Kammen A. y De Vries S.C. (1996). Expression of the JIM8 cell wall epitope in carrot somatic embryogenesis. *Planta*, 200: 167-173.
- Touraev A., Pfosser M., Vicente O. y Heberle-Bors E. (1996a). Stress as the major signal controlling the developmental fate of tobacco microspores: towards a unified model of induction of pollen embryogenesis. *Planta*, 200: 144-152.
- Touraev A., Indrianto A., Wratschko I., Vicente O. y Heberle-Bors (1996b). Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperatures. *Sex. Plant Reprod.*, 9: 209-215.
- Touraev A., Vicente O. y Heberle-Bors E. (1997). Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends in Plant Science*, 2,8: 297-302.
- Touraev A., Tashpulatov A., Indrianto A., Barinova I., Katholnigg H., Akimcheva S., Ribarits A., voronin V., Zhexsembekova M. y Heberle-Bors E. (2000). Biotechnological approaches for utilization of gametic cells. COST 824. Bohanec B. (Ed.). European Communities, Belgium:205-214.
- Tucker E.B.(1988). Inositol biphosphate and inositol triphosphate inhibit cell-cell passage of carboxyfluorescein in staminal hairs of *Setcreasea purpurea*. *Planta*, 174: 358-363.
- Tucker E.B.(1990). Analytical studies of dye-coupling between plant cells. Parallels in cell to cell junctions in plants and animals. Robards A.W., Lucas W.J., Pitts J.D., Jongsma H.J. y Spray D.C. (Eds.). Springer-Verlag, Berlin: 239-248.
- Turner A., Wells B y Roberts K. (1994). Plasmodesmata of maize root tips: structure and composition. *Journal of Cell Science*, 107: 3351-3361.

- Tweel D., Park S.K., Lalanne E. (1998). Asymmetric division and cell-fate determination in developing pollen. *Trends in Plant Science*, 3: 305-310.
- Tyagi A.K., Rashid A. y Maheswari S.C. (1979). High frequency production of embryos in *Datura innoxia* from isolated pollen grains by combined cold treatment and serial culture of anthers in liquid medium. *Protoplasma*, 99:11-17.
- Uhrig H. y Salamini F. (1987). Dihaploid plant production from 4X-genotypes of potato by the use of efficient anther plants producing tetraploid strains (4X EAPP-clones): proposal of a breeding methodology. *Z. Pflanzenzücht*, 98:228-235.
- Valdés I., García E., Llorente M. y Méndez E. (2003). Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich ELISA protocol. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 15: 465-474.
- van Aelst A.C. y van Went J.L. (1992). Ultrastructural immunolocalization of pectins and glycoproteins in *Arabidopsis thaliana* pollen grains. *Protoplasma*, 168: 14-19.
- van Hengel A.J., Tadesse Z., Immerzeel P., Schols H., van Kammen A. y de Vries S.C. (2001). N-acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiology*, 125: 1880-1890.
- van Holst G-J., Klis F.M., de Wildt P.J.M., Hazenberg C.A.M., Buijs J. y Stegwee D. (1981). Arabinogalactan protein from a crude cell organelle fraction of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology*, 68: 910-913.
- Vasil I.K. (1980). Androgenic haploids. *Int. Rev. Cyt. Supp. IIA*: 195-223.
- Vergne, P., Delvallee, I. y Dumas C. (1987). Rapid assessments of microspore and pollen development stage in wheat and maize using DAPI and membrane permeabilization. *Stain Tech*, 62: 299-304.

- Verhulst J. (1996). Atavism in *Homo sapiens*: a bolian heterodoxy revisited. *Sex. Plant Reprod.*, 9: 209-215
- Vian B.y Roland J.C. (1991). Affinodetection of the sites of formation and of the further distribution of polygalacturonanos and native cellulose in growing plant cells. *Biol. Cell*, 71: 43-55.
- Vijayaraghavan M.R. y Prabhakar K. (1984). The endosperm. Embryology of Angiosperms. Johri B.M. (Ed). Springer-Verlag, Berlin: 319-376.
- Vrinten P.L., Nakamura T. y Kasha K.J. (1999). Characterization of cDNAs expressed in the early stages of microspore embryogenesis in barley (*Hordeum vulgare*)L. *Plant Molecular Biology*, 41: 455-463.
- Wallace N.H. y Kriz A.L.(1991). Nucleotide sequence of a cDNA clone corresponding to the maize Globulin-2 gene. *Plant Physiology*, 95: 973-975.
- Waterkeyn L. y Beinfait A. (1970). On a possible funcion of the callosic special wall in *Ipomoea purpurea* (L.). *Roth. Grana*, 10: 13-20.
- Wei Z.M., Kyo M. y Harada H. (1986). Callus formation and plant regeneration through direct culture of isolated pollen of *Hordeum vulgare* cv. Sabarlis. *Theor. Appl. Genet.*, 72: 252-255.
- Wenzel G. (1985). Strategies in unconventional breeding for disease resistance. *Ann. Rev. Phytopath.*, 23: 149-172.
- Wenzel G. y Thomas E. (1974). Observation on the growth in culture of anthers of *Secale cereale*. *Z. Pflanzenzüchtg*, 72: 84-94.
- Wernicke W. y Kohlenbach H.W. (1976). Investigations on liquid culture medium as a mean of anther culture in *Nicotiana*. *Z. Pflanzenphysiol.* 79: 189-198.
- West M.A.L. y Harada J.J. (1993). Embryogenesis in higher plants: an overview. *Plant Cell*, 5: 1361-1369.
- Wietholter N., Graessner B., Mierau M., Mort A.J., Moerschbacher B.M. (2003). Differences in the methyl ester distribution of

- homogalacturonans from near-isogenic wheat lines resistant and susceptible to the wheat stem rust fungus. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 16. 10: 945-952.
- Wilson H.M., Mix G. y Foroughi-Wehr B. (1978). Early microspore divisions and subsequent formation of microspore calluses at high frequency in anthers of *Hordeum vulgare* L. *J. Exp. Bot.*, 29: 227-238.
- Wolf S., Deom C.M., Beachy R y Lucas W.J. (1991). Plasmodesmatal function is probed using transgenic tobacco plants that express a virus movement protein. *Plant Cell*, 3: 593-604.
- Worrall D., Hird D., Hodge R., Paul W., Draper J. y Scott R. (1992). Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. *The Plant Cell*, 4: 759-771.
- Xu Z.H., Huang B. y Sunderland N. (1981). Culture of barley anthers in conditioned media. *J. Exp. Bot.*, 32: 767-778.
- Yim K-O y Bradford K.J. (1998). Callose deposition is responsible for apoplastic semipermeability of the endosperm envelope of muskmelon seeds. *Plant Physiology*, 118: 83-90.
- Zaki M.A.M. y Dickinson H.G. (1990). Structural changes during the first divisions of embryos resulting from anther and free microspore culture in *Brassica napus*. *Protoplasma*, 156: 149-162.
- Zaki M.A.M. y Dickinson H.G. (1991). Microspore-derived embryos in Brassica: The significance of division symmetry in pollen mitosis I to embryogenic development. *Sex. Plant Reprod.*, 4: 48-55.
- Zarsky V., Garrido D., Eller N., Tupy J., Vicente O, Schoffl y Heberle-Bors E. (1995). The expresión of a small heat shock gene is activated during induction of tobacco pollen embryogenesis by starvation. *Plant Cell Environ.*, 18: 139-147.
- Zhang G.F. y Staehelin L.A. (1987). Functional compartmentation of the Golgi apparatus of plant cells: immunocytochemical analysis of

- high-pressure frozen- and freeze-substituted sycamore maple suspension culture cells. *Plant Physiology*, 99:1070-1083.
- Zhang G.F., Staehelin L.A. (1992). Functional compartmentation of the Golgi apparatus of plant cells: immunocytochemical analysis of high-pressure frozen- and freeze-substituted sycamore maple suspension culture cells. *Plant Physiol.*, 99: 1070-1083.
- Zhang G., Hoddinott J. y Taylor G.J. (1994). Characterization of 1,3-beta-D-glucan (callose) synthesis in roots of *Triticum aestivum* in response to aluminium toxicity. *J. Plant Physiol.*, 144: 229-234.
- Zhu Z.-Q., Sun J.S. y Wang J.-J. (1978). Cytological investigation on androgenesis of *Triticum aestivum*. *Acta Bot. Sinica*, 20: 6-12.
- Zimmerman J.L. (1993). Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell*, 5:1411-1423.

