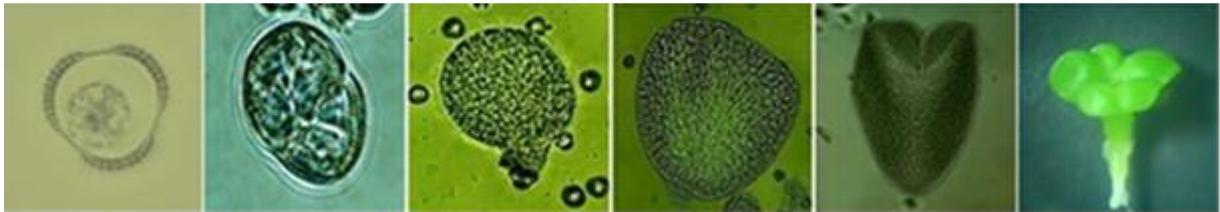


**Cultivo *in vitro* de anteras y granos de polen
de plantas de *Hemerocallis* spp.**

**The *in vitro* culture of anthers and pollen
grains of *Hemerocallis* spp. plants.**



Trabajo de Fin de Grado.

Pilar Pineda Balbuena.

Tutora: María Josefina Rodríguez Enríquez.

Grado en Biología. Julio 2019.

ÍNDICE

Resumen	2
Palabras claves	2
Abstract	2
Key words	3
1 Introducción	3
2 Objetivos	4
3 Metodología	5
4 Resultados	5
4.1 El proceso de androgénesis. Concepto y generalidades.....	5
4.2 Factores que influyen en la respuesta androgénica.....	8
4.2.1 El genotipo de la planta donante.....	8
4.2.2 El estado fisiológico y las condiciones de crecimiento de la planta donante.....	9
4.2.3 El pretratamiento de estrés empleado.....	9
4.2.4 El estadio de desarrollo de la microspora.....	10
4.2.5 La composición del medio de cultivo.....	10
4.3 Destino de las microsporas tras la inducción de la androgénesis.....	11
4.4 Desarrollo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> del polen en algunas especies de los géneros <i>Hemerocallis</i> y <i>Lilium</i>	13
4.4.1 Desarrollo <i>in vivo</i> del polen en algunas especies de <i>Hemerocallis</i>	15
4.4.2 Desarrollo <i>in vitro</i> y androgénesis en algunas especies de los géneros <i>Hemerocallis</i> y <i>Lilium</i>	17
5 Discusión.....	20
6 Conclusiones/Conclusions	24
7 Bibliografía	27

Resumen

La androgénesis es el proceso de formación de individuos haploides (H) y dobles haploides (DH), exclusivamente a partir de un núcleo masculino. Este fenómeno permite la obtención de individuos homocigóticos en una sola generación, lo que supone una alternativa mejorada a los programas tradicionales de hibridación empleados en la obtención de líneas puras. A pesar del enorme impacto que podría tener la aplicación práctica de este proceso a especies o variedades del género *Hemerocallis* por su gran valor ornamental, alimenticio y medicinal, hasta la fecha, los experimentos en los que se ha llevado a cabo la inducción de este fenómeno han sido escasos.

Hemos realizado una revisión bibliográfica sobre el proceso de la androgénesis en general y, en particular en especies del género *Hemerocallis* y del género *Lilium*, ambos incluidos en la familia *Liliaceae* hasta hace relativamente poco tiempo. Para ello nos hemos servido de buscadores bibliográficos y bases de datos eficientes. Hemos prestado una atención especial tanto a los factores que influyen en la inducción del fenómeno de la androgénesis como a los descubrimientos que han permitido mejorar de forma notable el rendimiento de este proceso. Todo ello nos ha servido para concebir algunas ideas que nos ayudaran a la hora de planificar nuevos experimentos.

Palabras claves

Hemerocallis, *Lilium*, cultivo *in vitro*, anteras, microsporas, polen, embriogénesis, androgénesis, haploides (H) y dobles haploides (DH).

Abstract

Androgenesis is a process in which haploid and doubled haploid lines are generated using the nucleus of a male gamete cell. Homozygous plants can be obtained in a single generation using androgenesis, which is therefore a good alternative to the traditional breeding programs used to make homozygous lines. Plant varieties of the genus *Hemerocallis* have great ornamental, nutritional and medicinal value, and the practical application of androgenesis in these plants could have an enormous positive impact. However, there are only a few reports of experiments that have induced androgenesis in *Hemerocallis*.

Using some search tools and useful databases, we conducted a bibliographic search for publications about the process of androgenesis in general, and we searched in particular for

publications about androgenesis in species of the genus *Hemerocallis* and the genus *Lilium*, which were both grouped in the family *Liliaceae* until recently. We paid special attention to information about factors that influence the induction of androgenesis and we also focused on discoveries about how to improve the success of this process. From these efforts we have formulated some new ideas, which will help when planning future experiments

Key words

Hemerocallis, *Lilium*, *in vitro* culture, anthers, microspores, pollen, embryogenesis, androgenesis, haploids (H) and doubled haploids (DH).

1 Introducción

El proceso de formación de haploides (H) o dobles haploides (DH) a partir del núcleo masculino exclusivamente, se conoce como androgénesis (Seguí-Simarro y Nuez, 2008). Este fenómeno, que es extremadamente raro en la naturaleza (Pichot, Borrut y Maâtaoui, 1998), ha podido conseguirse en diversas especies gracias al cultivo *in vitro* de anteras, microsporas aisladas o protoplastos obtenidos a partir de microsporas. La técnica conlleva la aplicación de un tratamiento de estrés, que induce a las microsporas o al polen, a reprogramar su vía natural de desarrollo gametofítico, que generalmente conduce al desarrollo y maduración del grano de polen hacia una vía esporofítica, que da lugar a la formación de embriones y de plantas haploides, ya sea directamente ya sea a través de un estadio de callo (Murovec y Bohanec, 2012). La técnica ha sido aplicada con éxito a día de hoy a más de 250 especies de angiospermas (Maluszynski et al., 2003; Testillano, 2019).

La androgénesis es un proceso de gran importancia para la industria agronómica por su gran potencial para producir líneas puras de haploides (H) y dobles haploides (DH), ya que solo se requiere una sola generación, en lugar de los 7 o más ciclos de autofecundación que suelen ser necesarios. Esta circunstancia reduce considerablemente el tiempo y los costes económicos que suponen los programas tradicionales de mejora destinados a la obtención de líneas puras. Además, y es esta otra de sus ventajas, posibilita la selección de genes de interés, facilita la fijación de alelos recesivos interesantes y permite la eliminación automática de alelos recesivos letales o deletéreos. Sin embargo, no todas las especies responden por igual a la inducción androgénica, y de hecho, muchos de los cultivos más importantes del mundo siguen siendo recalcitrantes (Seguí-Simarro, 2015; Testillano, 2019).

La inducción eficiente de la androgénesis depende de múltiples factores como son el genotipo, las condiciones de cultivo de la planta donante, el tipo de estrés inductivo aplicado, el estadio de desarrollo de la microspora y la composición del medio de cultivo empleado (Testillano, 2019). Existe un número de especies que son consideradas como sistemas modelos por su excelente respuesta androgénica, tales como la colza (*Brassica napus*), el tabaco (*Nicotiana tabacum*), el arroz (*Hordeum vulgare*) y el trigo (*Triticum aestivum*) (Maraschin et al., 2005). El proceso de androgénesis a pesar de haber sido descrito en la especie modelo por excelencia *Arabidopsis thaliana* hace más de 40 años (Scholl y Amos, 1980), a día de hoy, no ha podido ser por desgracia reproducido (Li et al., 2014).

La inducción del fenómeno de la androgénesis en especies y variedades del género *Hemerocallis*, podría tener gran importancia económica debido al gran valor ornamental que tienen muchas de las variedades de este género. Los *Hemerocallis*, también llamados “lirios de día” porque sus flores tan solo permanecen abiertas durante un día, son plantas ornamentales muy populares en la actualidad por su grandes y llamativas flores, con una larga temporada de floración, por lo que son muy utilizadas en parques y jardines. Existen en el mercado una amplia gama de cultivares disponibles, con más de 81.000 cultivares registrados en la base de datos de la Daylily American Society (Mosonyi et al., 2019). Más relevante es su enorme valor medicinal, lo que explica el creciente interés de la industria farmacéutica, siempre a la búsqueda de nuevos principios activos que puedan servir para el tratamiento de las patologías del siglo XXI (González, 2016; Davó, 2018). El conocimiento de las propiedades medicinales de las especies de este género se remonta hasta hace miles de años, cuando las raíces, flores y hojas eran usados como fuente de remedios por la medicina tradicional en Asia oriental (Jiangxi Medical College, 1986). Sin embargo, y a pesar de todo ello, hasta la fecha los experimentos en los que se ha intentado llevar a cabo la inducción de la androgénesis en especies de este género, han sido muy escasos.

2 *Objetivos*

El objetivo principal de este trabajo ha sido realizar una revisión bibliográfica sobre el fenómeno de la androgénesis en general y del género *Hemerocallis* y *Lilium* en particular, con la idea de extraer información que nos permitiese concebir nuevas ideas en base a las cuales poder formular una hipótesis de trabajo sólida en torno a la que diseñar nuevos experimentos.

3 Metodología

Con el fin de recopilar la mayor información disponible relacionada con el tema del trabajo, artículos de investigación, revisiones, tesis o capítulos de libros, de manera sencilla y gratuita, hemos recurrido a los buscadores y bases de datos siguientes:

Google Scholar, que es un buscador especializado en la localización de documentos de carácter científico-académico.

Research Gate, que es una red social en Internet y herramienta de colaboración dirigida a personas que se dedican a la ciencia en cualquier disciplina.

Mendeley, que es una aplicación web y de escritorio que permite encontrar, gestionar y compartir referencias bibliográficas y documentos de investigación.

Las palabras claves elegidas nos han permitido obtener un amplio listado de publicaciones. De él, aplicando un criterio de inclusión y exclusión basado en el análisis superficial del título y el resumen, descartamos aquellos artículos cuyo contenido mostraba poca o ninguna relación con el tema objeto de estudio y seleccionamos un total de 68 para elaborar el trabajo presentado. Aunque la búsqueda se detuvo en el mes de marzo de 2019, hemos estado pendientes hasta hoy de la aparición de nuevas publicaciones sobre el tema.

4 Resultados

Agrupamos la información seleccionada en cuatro puntos: concepto y generalidades sobre el proceso de la androgénesis, estudio de los factores que determinan la inducción androgénica, destino que pueden seguir las microsporas una vez inducidas, y por último, desarrollo *in vivo* e *in vitro* del polen y de las microsporas de algunas especies pertenecientes al género *Hemerocallis* y al género *Lilium*, ambos incluidos en el pasado en la misma familia *Liliaceae* (Cronquist, 1981).

4.1 El proceso de androgénesis. Concepto y generalidades.

Originalmente se consideró la androgénesis como el desarrollo espontáneo *in vivo* de un embrión haploide (H) o doble haploide (DH) a partir de una célula huevo fecundada, en la que el material genético femenino era inactivado o eliminado (Seguí-Simarro, 2010).

El primer individuo haploide generado de forma espontánea, y confirmado mediante un análisis citológico, fue encontrado de forma fortuita por Dorothy Bergner en *Datura Stramonium* (Blakeslee, 1922). Este ejemplar haploide se encontraba entre una serie de plantas de apariencia anormal, producidas como consecuencia de un intento de inducir mutaciones cromosómicas con aplicación de frío. Sin embargo es muy poco frecuente que la androgénesis ocurra en la naturaleza de forma espontánea (Pichot, Borrut y Maâtaoui, 1998).

Fue mucho más tarde, en 1964, cuando Guha y Maheshwari, cultivando anteras de *Datura innoxia* observaron que el fenómeno de androgénesis podía inducirse *in vitro* (Guha y Maheshwari, 1964). Desde este logro extraordinario, se realizaron numerosas experiencias con la intención de obtener plantas haploides a partir de anteras, de protoplastos obtenidos a partir de microsporas, de microsporas aisladas o de granos de polen cultivados *in vitro*.

La técnica de la androgénesis fue evolucionando a lo largo del tiempo. Los esposos Nitsch consiguieron realizar cultivos de microsporas “liberadas” de anteras de *Nicotiana sylvestris* y *N. tabacum* (Nitsch y Nitsch, 1969); Reinert, Bajaj y Heberle obtuvieron embriones cultivando protoplastos aislados a partir de granos de polen de *N. tabacum* “Badischer Burley” (Reinert et al., 1975); Lichter obtuvo por primera vez plantas haploides a partir de microsporas aisladas de *Brassica napus* (Lichter, 1982), que llegaría a ser la especie modelo por excelencia. Tras estos experimentos pioneros, la androgénesis *in vitro* se ha ido consiguiendo en otras muchas especies (Murovec y Bohanec, 2012).

La vía natural de desarrollo gametofítico de las microsporas (Fig. 1, fondo azul), comienza con un proceso conocido como microsporogénesis, en el cual las células madre de las microsporas (2n) sufren una primera división meiótica que da lugar a las díadas y generándose después de una segunda división meiótica, grupos de microsporas rodeadas y unidas por una pared de calosa, las tétradas. Con la disociación de la calosa se produce la liberación de las microsporas y comienza la etapa de microgametogénesis, durante la cual las microsporas se desarrollan hasta formar el grano de polen maduro.

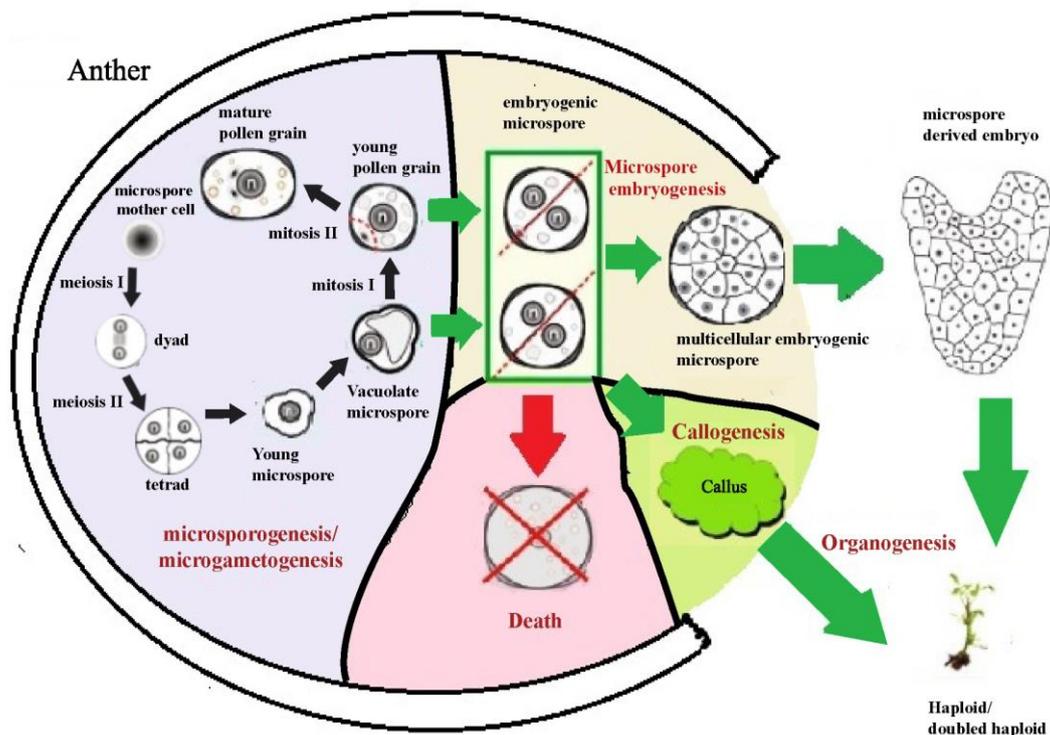


Figura 1. Diferentes vías que siguen las microsporas tras la inducción androgénica. Fuente: esquema simplificado de Seguí-Simarro y Nuez, 2008.

Inicialmente el núcleo de la microspora se encuentra situado en el centro de la célula, rodeado por vacuolas conformando un estadio de desarrollo que se denomina “uninucleado temprano”. Cuando las vacuolas se fusionan formando una vacuola de mayor tamaño, que desplaza al núcleo hacia la periferia, el estadio de desarrollo pasa a denominarse “uninucleado tardío”. El núcleo sufre entonces una primera división mitótica que da lugar a una célula vegetativa y una célula generativa, las cuales conforman lo que se conoce como estadio de desarrollo “binucleado temprano”. La célula generativa sufre una segunda división mitótica, formándose dos células espermáticas, estadio que se denomina “binucleado tardío”. La célula vegetativa y las dos células espermáticas constituirán el grano de polen maduro (Pintos, Martín y Gómez, 2014).

Normalmente la embriogénesis es directa (Fig. 1 fondo amarillo) y ocurre a partir de microsporas uninucleadas tardías o granos de polen binucleados tempranos, los cuales sufren cambios en el tamaño y forma de la célula, posición del núcleo, fragmentación de la vacuola y formación de un plano de división, que conducen hacia la formación de un embrión. Sin embargo las microsporas pueden, bien detener su desarrollo y sufrir la muerte celular (Fig. 1

fondo rosa), o bien dar lugar a la formación de un callo a partir de cuyas células pueden regenerarse haploides (H) o dobles haploides (DH) por organogénesis (Fig. 1 fondo verde) (Seguí-Simarro y Nuez, 2008).

La inducción de la androgénesis puede ocurrir en anteras aisladas cultivadas *in vitro*. Este método, que técnicamente es relativamente sencillo, requiere esterilizar superficialmente los brotes florales que han sido previamente tratados, aplicando factores físico-químicos con el fin de someter a las microsporas a un estrés capaz de detener su vía de desarrollo gametofítico. Posteriormente las anteras se escinden ya en condiciones asépticas y se inoculan en medios de cultivo que pueden ser sólidos, semisólidos, líquidos o en sistemas de dos fases. Si bien el cultivo de anteras fue la primera técnica utilizada para la inducción androgénica, y todavía hoy se usa en muchas ocasiones, el cultivo de microsporas aisladas es una técnica que resulta en algunos casos más eficaz. En efecto, al aislar las microsporas se eliminan del cultivo los tejidos de la pared de la antera, lo que evita la interferencia del tejido esporofítico materno durante la embriogénesis del polen (Murovec y Bohanec, 2012). Una vez aisladas las microsporas pueden someterse a tratamientos con soluciones enzimáticas con el objeto de digerir la pared celular y obtener protoplastos (Evans y Bravo, 2013).

4.2 Factores que influyen en la respuesta androgénica.

Las condiciones que se requieren para inducir la reprogramación del desarrollo de las microsporas varían según las especies y las variedades, y a menudo dentro de los genotipos de una misma especie. Algunos factores parecen influir de forma general en la inducción de la androgénesis en la mayoría de las especies estudiadas (Silva, 2012). Estos son:

4.2.1 El genotipo de la planta donante.

Estudios realizados en *Solanum tuberosum*, demostraron que la capacidad de las microsporas de reprogramar su vía natural de desarrollo hacia la embriogénesis es un rasgo recesivo hereditario controlado por más de un gen (Smykal, 2000). Foroughi-Wehr et al. (1982) distinguieron cuatro rasgos heredados de forma independiente y diferente, “inducción de callos”, “estabilización de callos”, “regeneración de plantas” y “formación de plantas albinas versus verdes”. Se ha visto que las variedades de arroz *Oryza indica* y *O. japonica* muestran diferentes capacidades de formación de callos y regeneración de plantas. Mientras que la variedad *O. indica* tiene baja capacidad de formación de callos y regeneración de

plantas, en su mayoría albinas, la variedad *O. japónica* tiene mayor tendencia a formar callos y regenerar plantas verdes (Silva, 2010).

4.2.2 *El estado fisiológico y las condiciones de crecimiento de la planta donante.*

La edad de la planta donante influye en la respuesta androgénica, observándose que plantas correspondientes a la primera floración muestran mayor capacidad de inducción androgénica (Germanà 2011; Pelliccione, 2013).

Los factores ambientales como el fotoperiodo, intensidad de luz, temperatura y la nutrición mineral, afectan críticamente al crecimiento y desarrollo de la planta donante y a la inducción de la androgénesis (Mayakaduwa y Silva, 2018). Lo más conveniente es cultivar las plantas en cámaras de crecimiento donde estos parámetros puedan ser regulados, lo que evita además el riesgo por infección o contaminación (Ferrie y Caswell, 2011).

4.2.3 *El pretratamiento de estrés empleado.*

El estrés puede inducir la reorganización del citoesqueleto de las microsporas, provocando cambios en la expresión génica orientados a la respuesta celular, a la supresión del programa gametofítico y a la expresión del programa embrionario (Li, 2014; Seguí-Simarro, 2010).

Los pretratamientos de estrés que requieren las diferentes especies y también las variedades dentro de cada especie suelen ser bastante variables (Mayakaduwa y Silva, 2018). Estos pretratamientos pueden ser físicos, empleando choques térmicos de frío o calor, fisiológicos, sometiendo a las células a inanición, suprimiendo del medio el azúcar o el nitrógeno y la falta o el exceso de agua, o químicos, usando agentes que elevan la presión osmótica como el manitol o el ficol o agentes mitóticos como la colchicina. De todos ellos, el choque térmico, ya sea por calor ya sea por frío, se considera el tratamiento más eficaz para inducir el desarrollo de la embriogénesis (Germanà, 2011).

En la especie modelo *Brassica napus*, el tratamiento de estrés habitual con el que se consigue la reprogramación del desarrollo de las microsporas es un tratamiento térmico de 32°C durante al menos un periodo de 24 horas (Lichter, 1982; Corral-Martínez, Driouich y Seguí-Simarro, 2019). Estudios recientes han demostrado que este tipo de estrés con altas

temperaturas aumenta los niveles de Ca^{2+} intracelular de las microsporas en las primeras etapas de la embriogénesis, lo que afecta a la arquitectura, disposición y composición de la pared celular, que desarrolla una capa subintinal rica en calosa y pobre en celulosa (Ahmadi, Ahmadi y da Silva, 2018; Corral-Martínez, Driouich y Seguí-Simarro, 2019).

4.2.4 El estadio de desarrollo de la microspora.

No existe consenso sobre cuál es el estadio de desarrollo en el que se produce la mejor respuesta androgénica. La mayoría de estudios sostienen que cuando las microsporas se encuentran en un estadio “uninucleado tardío”, antes de la primera división mitótica o en el “binuclear temprano”, justo después de la primera división mitótica, son más susceptibles de ser inducidas hacia la embriogénesis (Seguí-Simarro, 2010; Germanà, 2011; Murovec y Bohanec, 2012; Li, 2014). Esto se debe probablemente a que se encuentran en un estado transcripcional proliferativo aún no completamente diferenciado, lo que les puede facilitar el desviarse de su ruta gametofítica (Seguí-Simarro, 2010; Mayakaduwa y Silva, 2018).

Los granos de polen maduros, aunque presentan más resistencia a la muerte celular durante el cultivo *in vitro* debido a su avanzado estado de diferenciación, suelen ser más tenaces a la desviación hacia la ruta esporofítica (Soriano, Li y Boutilier, 2013; Li, 2014).

4.2.5 La composición del medio de cultivo.

El medio de cultivo no sólo proporciona nutrición a las microsporas, sino que también puede contribuir a dirigir las hacia la vía del desarrollo embrionario (Germanà, 2011).

Los medios basales más utilizados son el medio B5 (Gamborg, Miller y Ojima, 1968), el medio Murahige & Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962), el medio de Lichter (Lichter, 1981) y el medio N6 (Chu, 1978), con diferentes modificaciones según las distintas especies. Estos medios basales es conveniente suplementarlos con reguladores de crecimiento y con compuestos orgánicos apropiados en las concentraciones efectivas para la embriogénesis directa, o para la formación de callos y regeneración posterior de plantas haploides (Mayakaduwa y Silva, 2018).

La naturaleza y concentración de auxinas parecen determinar la vía de desarrollo de las microsporas. Por ejemplo, el α -ácido naftalenoacético (ANA) suele promover la

embriogénesis directa sin la fase de callo, mientras que el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) suele favorecer la formación de callos (Germanà, 2011).

El carbohidrato más comúnmente utilizado es la sacarosa, aunque su sustitución por maltosa ha sido una innovación importante y fue utilizada por primera vez en el cultivo de anteras de cereales (Mayakaduwa y Silva, 2018).

4.3 Destino de las microsporas tras la inducción de la androgénesis.

Tras el tratamiento de estrés, muchas de las microsporas aisladas detienen su desarrollo e inician un proceso de muerte celular programada, adoptando en ocasiones previamente una morfología parecida al grano de polen (Seguí-Simarro y Nuez, 2008). Un elevado porcentaje de las microsporas que resisten al tratamiento de estrés no son capaces de reprogramar su vía de desarrollo y continúan su programa gametofítico hacia la maduración del grano de polen. Las microsporas que consiguen comenzar con el programa esporofítico pueden tras varias divisiones proliferar formando callos y solo una pequeña proporción llega a formar directamente embriones. (Li, 2014).

Los embriones formados de manera directa podrán evolucionar y formar plantas haploides, mientras que los callos podrán dar también lugar a embriones de manera indirecta o formar órganos y plantas completas a través de un programa de organogénesis. Cuando la regeneración de las plantas ocurre a partir de células de callos, pueden ocurrir variaciones gametoclonales no deseadas y albinismo. Es por ello que la embriogénesis directa es la vía de regeneración preferida y la que ha sido más estudiada (Murovec y Bohanec, 2012).

La mayoría de los estudios básicos sobre embriogénesis directa en microsporas se han llevado a cabo con especies de plantas modelo como *Brassica napus* (Fig. 2) (Testillano, 2019).

En esta especie la microspora uninucleada tardía sufre, tras la inducción del tratamiento un reordenamiento del citoesqueleto, un desplazamiento del núcleo hacia el centro de la célula y la formación de bandas preprofásicas ausentes en la vía gametofítica marcando un plano de división (Fig. 2A) (Soriano et al., 2014).

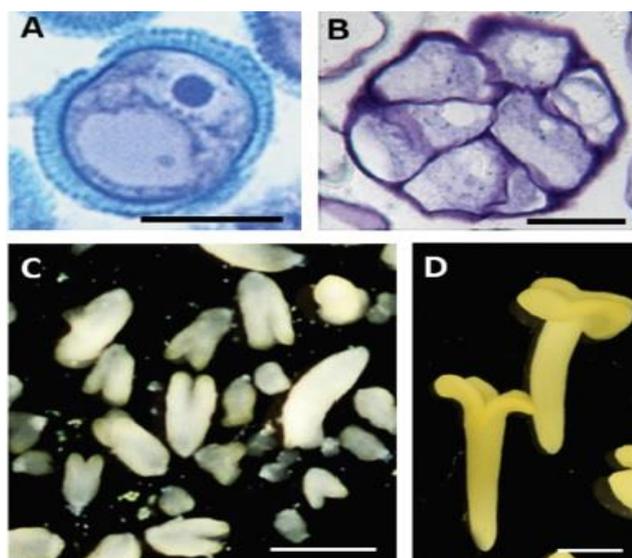


Figura 2. Principales estadios de desarrollo durante la embriogénesis de las microsporas de *B. napus*. A) Microspora en estadio uninucleado tardío. B) Proembrión tras 4-6 días de cultivo. C) Embriones globulares, corazones y torpedos después de 15-20 días de cultivo. D) Embriones cotiledonares después de 30 días. Fuente: Testillano, 2019.

La primera división que suele ocurrir en la microspora uninucleada o en la célula vegetativa del grano de polen binucleado es simétrica, a diferencia de la división asimétrica que caracteriza el desarrollo natural del grano de polen (Zaki y Dickinson, 1991; Soriano et al., 2014). A esta división le siguen divisiones proliferativas continuas, orientadas al azar dentro de la exina que producen estructuras multicelulares o proembriones (Fig. 2B).

Tras la ruptura de la exina, los embriones se desarrollan siguiendo una vía similar a la embriogénesis cigótica, pudiendo observarse embriones en estado globular, corazón, torpedo (Fig. 2C) o cotiledonar, con dos cotiledones aparentes, típico de las especies dicotiledóneas (Fig. 2D). En el caso de las monocotiledóneas, se observa la formación embriones globulares, escutelares y con un cotiledón (Testillano, 2019).

El bajo porcentaje de formación de embriones parece deberse en gran medida, por una parte a la muerte celular programada inducida por el estrés y por otra a las bajas tasas de reprogramación celular y de adquisición de totipotencia (Testillano, 2019).

La muerte celular se debe a que en respuesta al estrés se produce un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en las microsporas y se activa la autofagia, que es una

importante vía catabólica concomitante con un aumento de la actividad de proteínas de muerte celular, de proteasas y de metacaspasas (Testillano, 2019). En cultivos de microsporas de colza y cebada, se ha observado que los tratamientos farmacológicos con inhibidores de especies reactivas de oxígeno (ROS), con inhibidores de activación de autofagia y con inhibidores de la actividad de las proteasas y metacaspasas, conducen a una reducción de los niveles de muerte celular y en consecuencia a un aumento de la tasa de iniciación de la embriogénesis (Bárány et al., 2018; Pérez-Pérez et al., 2019).

La reprogramación celular y adquisición de totipotencia están reguladas principalmente por mecanismos hormonales y epigenéticos. La activación de la biosíntesis de auxinas endógenas, así como su transporte y acción polar, probablemente en combinación con un equilibrio adecuado de citoquinina/auxina, son necesarios para la embriogénesis de las microsporas (Testillano, 2019). Esta regulación hormonal actúa a la par que se producen cambios epigenéticos globales durante las etapas iniciales de la embriogénesis, tales como la hipometilación del ADN, la desmetilación de la histona H3K9 y la acetilación de las histonas H3 y H4. Experimentos recientes con microsporas de colza y cebada han demostrado que la adición al medio de cultivo de inhibidores de la metilación del ADN, como la 5-azacytidina (azaC) (Solís, et al., 2015), inhibidores de la metilación de H3K9 como el BIX-01294 (Berenguer et al., 2017) e inhibidores de la histona deacetilasa como la tricostatina A (Zhang et al., 2016), promueven la reprogramación celular y el inicio de la embriogénesis.

4.4 Desarrollo in vivo e in vitro del polen en algunas especies de los géneros Hemerocallis y Lilium.

El término *Hemerocallis*, del griego “Hemero”, que significa día, y “callis”, belleza, alude a que las flores de las especies de este género solo permanecen abiertas durante 24 horas. Las flores están formadas por un perigonio conformado por seis tépalos, un androceo constituido por seis estambres y un gineceo tripartito compuesto por ovario, estilo y estigma (Rodríguez-Enriquez y Grant-Downton, 2013).

Este género de plantas monocotiledóneas se haya incluido actualmente según el sistema de clasificación APG IV en el orden *Asparagales*, familia *Asphodelaceae*, subfamilia *Hemerocallidoideae* (Byng, et al., 2016). Aunque estas plantas son nativas de Asia, sus flores grandes y vistosas las han hecho populares en todo el mundo. La facilidad de cultivo, el hecho de que se adapten bien a muy diversas condiciones climáticas y a diferentes tipos de suelo y

que también sean muy resistentes a plagas y enfermedades (Grant-Downton et al., 2014), ha contribuido a su amplia distribución por parques y jardines en todo el mundo (Ren et al., 2017; Mosonyi, 2019).

Además de las especies silvestres, a día de hoy, existe una gran diversidad de variedades híbridas formadas a partir del cruce entre especies fértiles del género muy resistentes y las numerosas variedades existentes. Estos ejemplares híbridos (Fig. 3) presentan cada vez mayor diversidad fenotípica, mostrando nuevas combinaciones de gamas de colores, formas y tamaños muy diferentes a las existentes ya en el mercado, llegando algunos ejemplares a alcanzar precios de miles de dólares en exposiciones internacionales (Mosonyi, 2019).



Figura 3. Ejemplares híbridos procedentes de una plantación en Valle de Guerra (Tenerife) Fotografías cedidas por la profesora Rodríguez Enríquez.

El verdadero interés de estas plantas reside sin embargo en otra característica que tienen las flores y las raíces de alguna de las plantas de este género, que explica que sus flores sean consumidas como alimento en los países asiáticos (Mlcek y Rop, 2011) y que hayan sido utilizadas durante milenios por la medicina china (Jiangxi Medical College, 1986). Estas plantas poseen metabolitos secundarios que tienen importantes actividades farmacológicas, anticancerígenas (Cichewicz et al., 2004), antidepresivas (Lin et al., 2013), antiinflamatorias (Li et al., 2017), antioxidantes (Lin et al., 2011), antilipolíticas (Mori et al., 2009) y antiparasitarias (Cichewicz, 2002), por lo que pueden ser un punto de partida excelente para el desarrollo de nuevos fármacos que podrían ser utilizados para tratar alguna de las patologías más preocupantes de nuestro siglo (González 2016; Davó, 2018). Son estas características las que han hecho que las especies de este género hayan sido propuestas como posibles organismos modelo (Rodríguez-Enríquez y Grant-Dowton, 2013).

4.4.1 Desarrollo *in vivo* del polen en algunas especies de *Hemerocallis*.

El desarrollo *in vivo* del polen en *H. fulva* (Fig. 4) fue descrito por primera vez por Fullmer (Fullmer, 1899). Observó que la célula madre de la microspora (Fig. 4.1), tras la primera división meiótica, daba lugar a una díada, (Fig. 4.2) y que después de la segunda división meiótica, en ocasiones, en lugar de una tétrada podían generarse cinco, seis, siete e incluso hasta ocho microsporas (Fig. 4.3). Cada una de esas microsporas aumentaba su tamaño y su núcleo, situado en el centro de la célula, sufría entonces una división que daba lugar a una célula vegetativa y una célula generativa (Fig. 4.4.), lo que es habitual. En algunas ocasiones observó que la célula vegetativa se volvía a dividir varias veces pudiéndose formar hasta seis núcleos vegetativos (Fig. 4.5), lo que es bastante excepcional.

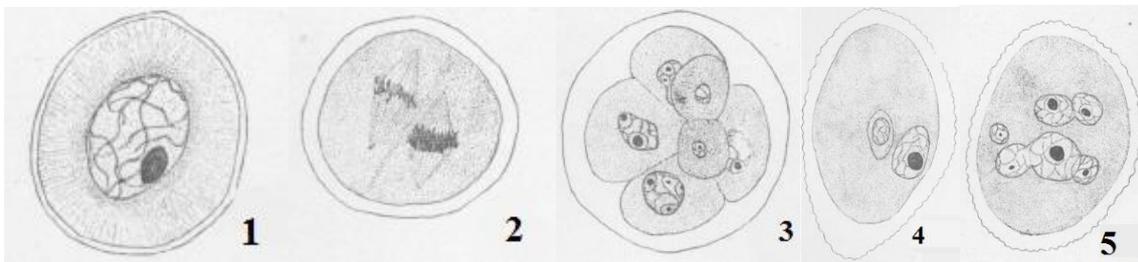


Figura 4. Desarrollo *in vivo* del polen en *H. fulva*. 1) Célula madre de la microspora; 2) Díada; 3) 6 microsporas tras la segunda división meiótica; 4) Estadio binucleado; 5) 6 núcleos de la célula vegetativa. Fuente: Fullmer, 1899.

Casi medio siglo más tarde, Chandler (1940) realizó el estudio comparativo del desarrollo del polen entre el clon triploide *H. fulva* Europa y el polen de ejemplares silvestres de la misma especie que crecían en Europa.

En los individuos diploides silvestres observó que tras las divisiones meióticas las células madre de las microsporas, formaban tétradas. Sin embargo en el clon triploide, vio que se producía una asociación incompleta de los cromosomas y un reparto desigual del material genético durante la meiosis, lo que causó que solo el 25% de las células madre de las microsporas formasen tétradas, dando lugar el resto a un número variable de microsporas de pequeño tamaño que podían llegar a 20. Tras la primera división mitótica, las microsporas formaron la célula generativa y la célula vegetativa. Después de la segunda división mitótica de la célula generativa observó que los núcleos espermáticos tenían un número diferente de cromosomas según provenían de un ejemplar diploide o triploide. Además, mientras que esta

división en la especie diploide solo ocurría en el tubo polínico, en la especie triploide podía ocurrir ya en el grano de polen.

Muy recientemente, Yan et al (2017), publicaron un artículo en el que mostraban fotos del desarrollo del polen en el interior de las anteras de *H. citrina* y *H. fulva*. Dado que no especifican en las fotos a qué especie corresponden las imágenes, presuponemos que en ambas el polen sigue el mismo patrón de desarrollo. Los autores observaron que después de la primera división meiótica y sin pasar por una etapa de díada aparente (Fig. 5a) las microsporas sufrían la segunda división meiótica y pasaban por un verdadero estadio de tétrada (Fig. 5b).

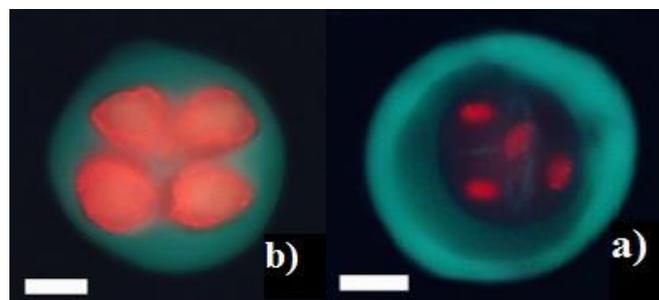


Figura 5. Microsporas de *Hemerocallis*: a) estadio de díada incompleto; b) estadio de tétrada. Fuente: Yan et al., 2017.

Tras la digestión de la pared de calosa de las tétradas, las microsporas presentaban una forma irregular arqueada (Fig. 6), se expandían polarizadamente, adquirían una forma elipsoidal y mostraban un núcleo muy aparente que ocupaba una posición central (Fig. 6a). Tras la formación de una gran vacuola que desplazaba al núcleo a la periferia (Fig. 6b) ocurría la primera división mitótica y se formaba la célula vegetativa y la célula generativa separadas por una pared celular arqueada (Fig. 6c). Con la desintegración de esta pared, la célula generativa quedaba liberada en el citoplasma de la célula vegetativa, conformando un grano de polen maduro compuesto por dos células (Fig. 6d).

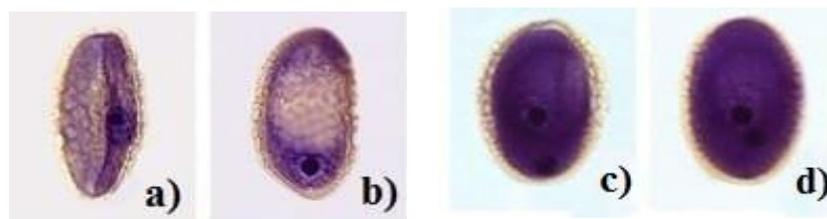


Figura 6. Estadios de desarrollo de las microsporas de *Hemerocallis*: a) uninucleado temprano; b) uninucleado tardío; c) binucleado temprano; d) binucleado tardío. Fuente: Yan et. al, 2017.

4.4.2 Desarrollo *in vitro* y androgénesis en algunas especies de los géneros *Hemerocallis* y *Lilium*.

Hasta la fecha y a nuestro conocimiento, pocos han sido los intentos para conseguir la androgénesis en especies del género *Hemerocallis* (Zhou, 1988; Zhou, 1989; Ahn et al., 2002). Por esta razón hemos considerado incluir entre nuestras palabras clave, *Lilium*, por la proximidad de ambos géneros y porque ha sido objeto recientemente de algunos trabajos en este campo (Anggraeni e Iriawati, 2017).

El primer investigador que aisló y cultivó por primera vez “*in vitro*” protoplastos obtenidos a partir de granos de polen maduros y microsporas uninucleadas tardías de *H. Fulva*, fue Zhou (Zhou, 1988; 1989).

En un primer experimento este autor cultivó protoplastos “*in vitro*” en el medio K3 (Nagy y Maliga, 1976) adicionado de bencilaminopurina (BA) (0,2 mg/l), 2,4-D (0,1 mg/l) y ANA (1 mg/l) y observó la formación de algo que parecía ser un tubo polínico con estructuras tubulares y nodulares atípicas (Fig. 7).

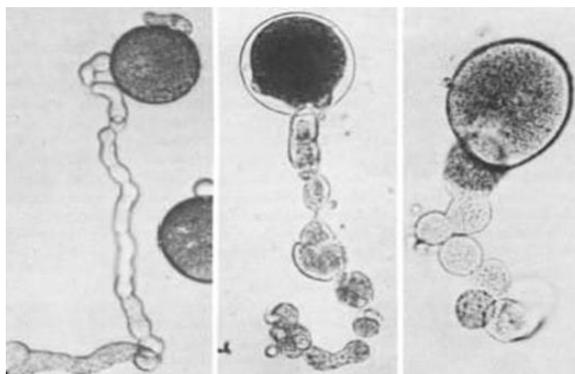


Figura 7. Estructuras en forma de tubo, nódulo y cuenta. Fuente: Zhou, 1988.

Un año más tarde el mismo autor (Zhou, 1989) realizó un segundo experimento utilizando como material vegetal pequeños primordios florales de entre 2 y 2,5 cm, cuyas anteras contenían microsporas en estadio uninucleado tardío. Después de someter los brotes florales a un pretratamiento de 5-6°C durante 4-7 días, aisló protoplastos de las microsporas y los inoculó en el medio K3 y pudo observar la formación de estructuras multicelulares embrionarias (Fig. 8).

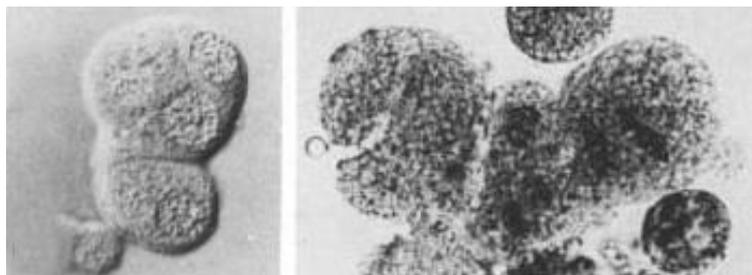


Figura 8. Formación de proembriones multicelulares después de 15 días de cultivo. Fuente: Zhou, 1989.

Algunos años después, Ahn et al. (2002) realizaron un estudio sobre el efecto de los pretratamientos, los medios basales, los reguladores de crecimiento y otros suplementos sobre la formación de callos y la regeneración de plantas en anteras de *H. dumortieri* y *H. fulva kwanso*. Los mejores resultados los obtuvieron con anteras procedentes de primordios florales muy jóvenes, de entre 0,5 y 1,0 cm de longitud.

Para determinar el efecto del pretratamiento, sometieron los brotes florales a pretratamientos de frío (4°C o 10°C) o de calor (30°C o 35°C), durante periodos de tiempo variables. Obtuvieron los mejores resultados cuando los brotes fueron mantenidos a una temperatura de 4°C durante 4 días.

Comparando los medios minerales B5 (Gamborg, Miller y Ojima, 1968) y el medio MS, suplementados con diferentes combinaciones de hormonas a distinta concentración, observaron que en el caso de *H. dumortieri*, con el medio basal MS suplementado con BA 2,0 mg/l y ANA 2,0 mg/l era mayor el porcentaje de callos formados y de regeneración de plantas. Sin embargo las anteras de *H. fulva kwanso* se desarrollaron mejor en el medio basal MS suplementado con kinetina, a la concentración de 1,0 mg/l y 2,4-D a la concentración de 1,0 mg/l.

Cuando estudiaron la acción sobre el proceso de compuestos orgánicos como la glutamina, observaron que las concentraciones más efectivas para la formación de callos y regeneración de plantas para *H. dumortieri* y *H. fulva kwanso* fueron de 0,8 g/l y de 1,0 g/l respectivamente. En cuanto al carbón vegetal, este tuvo un efecto negativo sobre el desarrollo de las microsporas de ambas especies que no formaron ni callos ni plantas.

En los últimos años el género *Lilium* ha atraído el interés de varios autores. Han, Niimi y Nakano (2000) se interesaron en la especie híbrida *Lilium x* "Connecticut King". El material

para su experimento fueron microsporas aisladas de anteras de brotes florales de entre 2 y 3 cm de longitud que contenían microsporas en estadio uninucleado medio-tardío, pretratandolas con frío a una temperatura de 4°C durante 4 días, inoculando las microsporas aisladas en un medio líquido MS suplementado con 0,25 M de sacarosa o maltosa tras el pretratamiento . Vieron que cuando el medio de cultivo contenía sacarosa las microsporas no progresaban, pero sí cuando contenía maltosa, aunque los callos no fueron capaces de regenerar plantas.

Niimi, Han y Fujisaki (2001) realizaron un estudio sobre el híbrido *Lilium* x “Enchantment”. El material para su experimento fueron anteras aisladas de jóvenes brotes florales de entre 2,5 y 3,0 cm de longitud que contenían microsporas en estadio uninucleado. Estudiaron las condiciones de cultivo de las plantas madre, la influencia de la época del año en la que se recolectaban los brotes y los pretratamientos sobre la formación de callos y regeneración de plantas. Las anteras fueron inoculadas en el medio de cultivo MS suplementado con 0,1 mg/l de BA y 0,01 mg/l de ANA. Las plantas que fueron regeneradas a partir de callos se mantuvieron a 4°C durante 8 semanas antes de ser trasplantadas y cultivadas en un invernadero. Los autores constataron que el mayor porcentaje de regeneración de plantas se producía con anteras que provenían de brotes florales no pretratados, recolectados a finales de marzo sobre plantas madre que habían sido cultivadas en invernadero. Las plantas regeneradas resultaron ser todas diploides de origen somático, pues la división celular y la formación de callos ocurrieron en la capa media de la pared de la antera.

Han y Niimi (2005) llevaron a cabo el cultivo *in vitro* de anteras de *Lilium formosanum*. Utilizaron brotes florales de entre 4 y 5 cm de longitud cuyas anteras contenían microsporas en estadio uninucleado que pretrataron con frío a 4°C durante 2 días. Las anteras fueron entonces aisladas e inoculadas en el medio de cultivo MS suplementado con 0,01 mg/l de BA y 0,1 mg/l de ANA. Las plantas fueron regeneradas a partir de callos y tras ser mantenidas a 4°C durante 10 semanas fueron trasplantadas y cultivadas en un invernadero.

Los autores consiguieron regenerar 18 plantas, y de ellas 15 resultaron ser haploides (H) y 3 dobles haploides (DH). Para obtener un mayor número de individuos dobles haploides (DH) trataron los individuos haploides obtenidos con colchicina a la concentración de 0,5 mM en un medio MS.

Anggraeni e Iriawati (2017) utilizaron para sus ensayos la especie *Lilium longiflorum*. Cultivaron anteras aisladas en el medio basal MS adicionado con diversas concentraciones de distintos reguladores de crecimiento. Los brotes utilizados entre 0,1 y 4,0 cm de longitud fueron clasificados por tamaños. Observaron que en brotes florales de tamaño 0,6-1,0 cm, el 100% de las microsporas se encontraban en estadio de célula madre y que en los brotes florales de tamaño 1,6-2,0 cm las microsporas se encontraban en un 86,7% en estadio de célula madre y en un 13,2% en estadio díada. Los mayores porcentajes de formación de callos y brotes se obtuvieron con brotes florales de entre 0,6-1,0 cm o entre 1,6-2,0 cm.

El medio de cultivo más adecuado para la formación de callos (Fig. 9a) y la regeneración de plantas (Fig. 9b) fue el medio basal MS suplementado con 0,75 μ M BA y 7,5 μ M ANA. Según los autores los brotes podían emerger a partir de callo o directamente de las microsporas (Fig. 9c).



Figura 9. Formación de callos, brotes indirectos y directos en anteras cultivadas *in vitro* de *L. Longiflorum*: a) callo; b) brotes formados a partir del callo; c) brotes directos sin pasar por la fase callo. Fuente: Anggraeni e Iriawati, 2017.

5 Discusión

La inducción *in vitro* de la androgénesis ha sido posible en más de 250 especies de angiospermas (Maluszynski et al., 2003; Testillano, 2019), a pesar de que este fenómeno es extremadamente raro en la naturaleza (Pichot, Borrut y Maâtaoui, 1998). Por ello, esta técnica está siendo una herramienta muy útil para la mejora vegetal, disminuyendo considerablemente el tiempo que necesitan los sistemas tradicionales de obtención de líneas puras. Además, al posibilitar la selección de genes de interés, la fijación de alelos recesivos beneficiosos y la eliminación de alelos recesivos letales o deletéreos (Seguí-Simaro, 2015; Testillano, 2019), permite mejorar la calidad de los cultivos.

Los experimentos que se han llevado a cabo hasta la fecha con brotes florales, anteras, microsporas, polen y protoplastos de especies o variedades del género *Hemerocallis* han sido

muy escasos, probablemente debido a que hasta la fecha estas plantas no han sido consideradas con suficiente interés económico si se comparan con los cultivos tradicionales que alimentan a la humanidad, que han sido objeto de numerosas investigaciones (Seguí-Simarro, 2015; Testillano, 2019). Nosotros estamos convencidos de que su estudio podría tener un enorme interés para la industria de plantas ornamentales y muy especialmente para las compañías farmacéuticas (Mosonyi, 2019; Davó, 2018).

Las condiciones que se requieren para inducir la androgénesis difieren entre las distintas especies y, dentro de las mismas, entre sus variedades y genotipos (Silva, 2012), lo cual hace imposible la propuesta de un protocolo de inducción de androgénesis común para todas ellas. Sin embargo el conocimiento del proceso en especies modelos cuya respuesta androgénica ha sido excelente (Maraschin et al., 2005) y el reconocimiento de que varios factores son claves en la inducción de la androgénesis (Silva, 2012), puede servir de guía a la hora de diseñar experimentos para otras especies (Li et al., 2014).

En dos variedades de arroz, *Oryza indica* y *O. japonica*, se ha demostrado que la capacidad de respuesta androgénica se encuentra bajo control genético, por lo que puede ser diferente para las distintas especies (Smykal, 2000). Podríamos aventurarnos a pensar que en el género *Hemerocallis* también deben existir genotipos más susceptibles a la inducción de la androgénesis. De la misma manera, y teniendo en cuenta que las condiciones de crecimiento de las plantas madre influyen en su capacidad de ser inducidas (Ferrie y Caswell, 2011), sería aconsejable cultivar las plantas donantes en lugares cuyas condiciones de crecimiento puedan ser controladas, tal y como se demostró con las plantas del híbrido *Lilium* x “Enchantment” (Niimi, Han y Fujisaki, 2001).

Numerosos estudios realizados hasta la fecha han puesto en evidencia que el estrés es uno de los factores más decisivos en la reprogramación del desarrollo de las microsporas, provocando en las primeras etapas de la androgénesis cambios en la expresión génica de las microsporas y cambios en la reorganización del citoesqueleto (Li, 2014; Seguí-Simarro, 2010).

Entre los distintos tipos de pretratamiento que existen, el choque térmico parece ser el más eficaz para la inducción de la androgénesis (Germanà, 2011). Recordemos que fue el frío el responsable de la formación de los primeros haploides espontáneos descritos por la bibliografía (Blakeslee, 1922). En especies de *Hemerocallis* y de *Lilium* el frío ha sido el tratamiento de estrés empleado habitualmente aunque en la especie modelo *Brassica napus*,

en la que se conocen sistemas *in vitro* eficientes y bien establecidos de embriogénesis (Testillano, 2019) el tratamiento de estrés más habitual con el que se consigue la reprogramación de las microsporas es el calor, siendo necesario para la inducción la aplicación de aplicando una temperatura de 32°C durante al menos 24 horas (Lichter, 1982; Corral-Martínez, Driouich y Seguí-Simarro, 2019).

El estadio de desarrollo de las microsporas parece influir en su capacidad de reprogramación celular, de forma que las microsporas más jóvenes aún no completamente diferenciadas suelen presentar mayor facilidad para desviarse de su ruta gametofítica (Seguí-Simarro, 2010; Mayakaduwa y Silva, 2018). Lo mismo parece ocurrir en plantas de *Hemerocallis* en las que se comprobó que solo los protoplastos obtenidos de microsporas en estadio uninucleado tardío llegaban a formar proembriones (Zhou, 1989), mientras que aquellos procedentes de granos de polen maduros no iniciaron el programa embriogénico (Zhou, 1988). Esto se interpretó considerando que las microsporas estaban muy diferenciadas, lo que las hacía incapaces de desviarse de la ruta gametofítica programada (Soriano et al., 2013; Li, 2014). Estos resultados, y la consideración del éxito obtenido con anteras aisladas en estadio de célula madre o de díada en *L. longiflorum* (Anggraeneti e Iriawati, 2017), nos hace pensar en la conveniencia de utilizar también en el caso de *Hemerocallis* brotes florales muy jóvenes, de escasa longitud, con microsporas que se encuentren justo después de la primera meiosis.

Un buen soporte a la hora de seleccionar las microsporas son los primeros trabajos de seguimiento del desarrollo del polen *in vivo* realizados en plantas del género *Hemerocallis* (Fullmer, 1899). La relación entre el tamaño de los brotes florales y el estadio de desarrollo de las microsporas debe ser comprobado en cada experimento. Como ya fue demostrado, la cronología del proceso y el desarrollo del mismo puede depender de las especies e incluso variar según el grado de ploidía de las plantas (Chandler, 1940).

El medio basal MS suplementado con distintas combinaciones de hormonas a diferentes concentraciones ha sido el más empleado tanto en especies del género *Hemerocallis* como de *Lilium*, independientemente de que se use como material vegetal brotes florales, anteras, microsporas aisladas, polen o protoplastos.

Los reguladores de crecimiento más empleados han sido la BA y el ANA a concentraciones variables según las especies. La fuente de carbono más utilizada fue la sacarosa aunque en ocasiones, como en el caso del cultivo de microsporas del *Lilium*

“Connecticut King” la maltosa resultó ser más favorable para la formación de callos, a pesar de que no se llegasen a regenerar plantas (Han, Niimi y Nakano, 2000), como ocurre en el cultivo de cereales (Mayakaduwa y Silva, 2018),

No siempre tras una inducción eficiente se consigue la regeneración de los haploides (H) o dobles haploides (DH) deseados. En ocasiones, las plantas obtenidas no resultaron ser dobles haploides (DH) sino diploides de origen somático, como se demostró cuando se cultivaron *in vitro* anteras del híbrido *Lilium* x “Enchantment” (Niimi, Han y Fujisaki, 2001).

La muerte celular programada ocurre con demasiada frecuencia entre las poblaciones de microsporas aisladas, de forma que un elevado porcentaje de las mismas muere por esta causa, lo que reduce considerablemente el rendimiento de los cultivos. A pesar del gran número de estudios realizados sobre este tema en los últimos años para determinar sus causas, este fenómeno sigue sin estar controlado, por lo que el porcentaje de microsporas que llega a formar embriones sigue siendo bajo (Testillano, 2019). Muchas de las microsporas aisladas que sobreviven forman callos antes de la regeneración de los haploides, existiendo la posibilidad de que se produzcan variaciones somaclonales y por ello esta vía es menos aconsejable que la embriogénesis directa (Murovec y Bohanec, 2012). Los resultados más recientes obtenidos, aplicando fármacos inhibidores de especies reactivas de oxígeno (ROS) e inhibidores de autofagia (Bárány et al., 2018; Pérez-Pérez et al., 2019) o de moduladores epigenéticos (Solís et al., 2015; Zhang et al., 2016; Berenguer et al., 2017) con el fin de mejorar la eficiencia de la embriogénesis son muy prometedores. Pensamos que estos fármacos deberían ser también ensayados con las plantas del género *Hemerocallis*.

6 Conclusiones/Conclusions

Conclusiones

- La mejora del conocimiento del proceso de androgénesis y el desarrollo de técnicas que faciliten su aplicación práctica, puede aportar grandes beneficios. Por ejemplo, si la seguridad alimentaria se ve amenazada debido al descenso del rendimiento en la producción a consecuencia del cambio climático, controlar la androgénesis puede ser una vía importante para incrementar tanto la productividad agrícola como la calidad de los cultivos. En esta área los científicos españoles han hecho importantes aportaciones.
- La androgénesis se halla bajo el control de múltiples factores y uno de los más cruciales de estos reguladores es el estrés por temperatura. Encontrar la temperatura adecuada plantea un problema a la hora de desarrollar un protocolo único conveniente para todas las especies. Durante la androgénesis, tanto la adquisición de totipotencia como la reprogramación celular que ocurre en las microsporas, parecen estar reguladas por mecanismos hormonales y epigenéticos.
- La inducción de la androgénesis en plantas del género *Hemerocallis* podría abrir una nueva vía para la creación de nuevas variedades con un gran valor ornamental. La androgénesis puede también ser muy útil para seleccionar líneas puras de haploides (H) y dobles haploides (DH) con alta capacidad de síntesis de moléculas de interés. Estas líneas podrían ser una herramienta muy útil para desarrollar drogas con las que poder tratar algunas de las enfermedades más preocupantes de este siglo como son el cáncer, la depresión, la obesidad, la diabetes o el Alzheimer.
- Las plantas del género *Hemerocallis* podrían servir como sistema modelo para estudiar la androgénesis en monocotiledóneas, grupo de plantas al que pertenecen gran parte de las especies cultivadas de las que se alimenta la mayoría de la población humana.
- Experimentos previos han indicado que la androgénesis es posible en plantas del género *Hemerocallis*, pero se necesitan más investigaciones para poder mejorar la eficiencia del proceso. Recientemente se ha demostrado que si se añaden compuestos que eviten la muerte celular o que actúen como moduladores epigenéticos al medio en el que se encuentran las microsporas, se produce un aumento de la tasa de

supervivencia y de reprogramación. Por ello proponemos que se ensayen estos tratamientos con especies y variedades del género *Hemerocallis*, con objeto de mejorar la eficiencia de la inducción androgénica y el número de embriones formados.

Conclusions

- Gaining knowledge about the process of androgenesis and the development of techniques to improve the practical application of this process could have many benefits. For example, if food security is threatened because agricultural yields are lowered due to climate change, harnessing androgenesis could be an important way to boost agricultural productivity and crop quality. Spanish scientists have already made some notable contributions to advances made in this area.
- Androgenesis is controlled by multiple factors, and one of the most crucial of these regulators is temperature stress. However, finding a suitable temperature stress poses a problem when trying to develop one protocol that would be suitable for all species of interest. During androgenesis, both the acquisition of totipotency and the cellular reprogramming that occurs in microspores seem to be regulated by hormonal and epigenetic mechanisms.
- The induction of androgenesis in plants of the genus *Hemerocallis* could offer a way to create new varieties with great ornamental value. Androgenesis might also be useful to enable the selection of pure lines of haploids (H) and double haploids (DH) that have a high capacity to produce molecules of interest. Such lines could provide a useful tool for the development of much needed drugs to tackle serious conditions such as cancer, depression, obesity, diabetes or Alzheimer's disease.
- Plants of the genus *Hemerocallis* could also serve as a model system to study androgenesis in the monocot group of plants, which is the grouping that the majority of crops eaten by humans belong to.
- Previous experiments have indicated that androgenesis is possible in plants of the genus *Hemerocallis*, but more work is needed to improve the efficiency of this process. It has recently been shown that if compounds that prevent cell death and compounds that act as epigenetic modulators are added to the culture medium in which microspores are cultivated, this causes an increase in the survival and in the rate

of reprogramming of these microspores. Therefore, we propose that using such treatments in species and varieties of plants of the genus *Hemerocallis* would improve the induction of androgenesis and the number of embryos that are formed.

7 Bibliografía

- Ahmadi, B., Ahmadi, M., y da Silva, J. A. T.** 2018. Microspore embryogenesis in *Brassica*: calcium signaling, epigenetic modification, and programmed cell death. *Planta* **248**(6): 1339-1350.
- Ahn, M. S., Lim, H. C., Choi, S. R., Choi, D. C., Choi, J. S., et al.** 2002. Effects of Basal Media, Growth Regulators and Addition Agents on Callus Formation and Plant Regeneration for Anther Culture of *Hemerocallis* spp. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology* **20**(2): 124-129.
- Anggraeni, A., y Iriawati, I.** 2017. Response of *Lilium longiflorum* Thunb. Anther with Various Microspore Development Stages in Combinations of Plant Growth Regulator Concentration. *Agrosainstek: Jurnal Ilmu dan Teknologi Pertanian* **1**(2): 49-55.
- Bárány, I., Berenger, E., Solís, M. T., Pérez-Pérez, Y., Santamaría, M. E., et al.** 2018. Autophagy is activated and involved in cell death with participation of cathepsins during stress-induced microspore embryogenesis in barley. *Journal of Experimental Botany* **69**: 1387-1402.
- Berenger, E., Bárány, I., Solís, M. T., Pérez-Pérez, Y. Risueno, M. C., Testillano, P. S.** 2017. Inhibition of histone H3K9 methylation by BIX-01294 promotes stress-induced microspore totipotency and enhances embryogenesis initiation. *Frontiers in Plant Science* **8**: 1161.
- Blakeslee, A. F., Belling, J., Farnham, M. E. y Bergner, A. D.** 1922. A haploid mutant in the Jimson weed, *Datura stramonium*. *Science* **55**: 646-647.
- Byng, J. W., Chase, M. W., Christenhusz, M. J., Fay, M. F., Judd, W. S. et al.** 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* **181**(1): 1-20.
- Cichewicz, R. H., Lim, K.C, McKerrow, J.H y Nair, M.G.** 2002. Kwanzoquinones A-G and other constituents of *Hemerocallis fulva* «Kwanzo» roots and their activity against the human pathogenic trematode *Schistosoma mansoni*. *Tetrahedron* **58**(42):8597-606.
- Cichewicz, R. H., Zhang, Y., Seeram, N. P. y Nair, M. G.** 2004. Inhibition of human tumor cell proliferation by novel anthraquinones from daylilies. *Life sciences* **74**(14): 1791-1799
- Chandler, C.** 1940. Microsporogenesis in triploid and diploid plants of *Hemerocallis fulva*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **67**(8): 649-672.
- Chu, C. C.** 1978. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops, p. 43-50. *Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture*. Science Press, Peking.
- Corral-Martínez, P., Driouich, A., y Seguí-Simarro, J. M.** 2019. Dynamic Changes in Arabinogalactan-Protein, Pectin, Xyloglucan and Xylan Composition of the Cell Wall During Microspore Embryogenesis in *Brassica napus*. *Frontiers in Plant Science* **10**: 332.
- Cronquist, A.** 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press, New York.
- Davó, A.** 2018. Aislamiento de constituyentes químicos bioactivos de las raíces de lirios de día. Universidad de la Laguna, San Cristóbal de la Laguna.
- Evans, D. A. y Bravo, J. E.** 2013. Plant Protoplast Isolation and Culture, p. 33-35. *En: Bourne, G. H., Danielli, J. F., Jeon, K. W. y Giles, K. L. (eds.), Plant Protoplasts: International Review of Cytology* **16**. Academic Press, New York.
- Ferrie, A. M. R. y Caswell, K. L.** 2011. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **104**(3): 301-309.
- Foroughi-Wehr B., Friedt W. y Wenzel., G.** 1982. On the genetic improvement of androgenetic haploid formation in *Hordeum vulgare* L. *Theoretical Applied Genetics* **62**:246-248.

- Fullmer, E. L.** 1899. The development of the microsporangia and microspores of *Hemerocallis fulva*. Botanical Gazette **28**(2): 81-88.
- Gamborg, O. L., Miller, R.A. y Ojima, K.** 1968. Nutrient requirement suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research **50**:151-158.
- Germanà, M. A.** 2011. Anther culture for haploid and doubled haploid production. Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC) **104**(3): 283-300.
- Grant-Downton, R.T, Terhem, R.B, Kapralov M.V, Mehdi, S., Rodriguez-Enriquez M.J et al.** 2014. A Novel *Botrytis* Species is Associated with a Newly Emergent Foliar Disease in Cultivated *Hemerocallis*. PLoS ONE **9**(6): e89272.
- González, L.** 2016. “*Hemerocallis*” Nueva fuente de moléculas aplicables al tratamiento de algunas enfermedades actuales. Universidad de la Laguna, San Cristóbal de la Laguna.
- Guha, S. y Maheshwari, S. C.** 1964. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. Nature **204**(4957): 497.
- Han, D. S. y Niimi, Y.** 2005. Production of haploid and doubled haploid plants from anther-derived callus of *Lilium formosanum*. En: Okubo, H., Miller, W. B. y Chastagner, G. A. (eds.), IX International Symposium on Flower Bulbs. Acta Horticulturae **673**: 389-393.
- Han, D. S., Niimi, Y. y Nakano, M.** 2000. Formation of calli from isolated microspore cultures of Asiatic hybrid “Connecticut King”. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science **69**(1): 52-56.
- Jiangxi Medical College.** 1986. Dictionary of Chinese traditional medicine. Science and Technology Press, Shanghai.
- Li, H., Soriano, M., Cordewener, J., Muino, J. M., Riksen, T., Fukuoka, H et al.** 2014. The Histone Deacetylase Inhibitor Trichostatin A Promotes Totipotency in the Male Gametophyte. The Plant Cell **26**(1): 195-209
- Li, H.** 2014. Microspore embryogenesis: reprogramming cell fate from pollen to embryo development. Wageningen University, Wageningen.
- Li, C. F., Chen, X. Q., Chen, S. M., Chen, X. M., Geng, D., et al.** 2017. Evaluation of the toxicological properties and anti-inflammatory mechanism of *Hemerocallis citrina* in LPS-induced depressive-like mice. Biomedicine & Pharmacotherapy **91**: 167-173.
- Lichter, R.** 1981. Anther culture of *Brassica napus* in a liquid culture medium. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie **103**(3): 229-237.
- Lichter, R.** 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie **105**(5): 427-434.
- Lin, Y. L., Lu, C. K., Huang, Y. J. y Chen, H. J.** 2011. Antioxidative caffeoylquinic acids and flavonoids from *Hemerocallis fulva* flowers. Journal of agricultural and food chemistry **59**(16): 8789-8795.
- Lin, S. H., Chang, H. C., Chen, P. J., Hsieh, C. L., Su, K. P. y Sheen, L. Y.** 2013. The antidepressant-like effect of ethanol extract of daylily flowers (金針花 *Jīn Zhēn Huā*) in rats. Journal of traditional and complementary medicine **3**(1): 53-61.
- Maluszynski, M., Kasha, K. J. y Szarejko, I.** 2003. Published doubled haploid protocols in plant species, p. 309-335. En: Maluszynski, M., Kasha, K. J., Foster, B.P. y Szarejko, I. (eds.), Doubled Haploid Production in Crop Plants. Springer, Dordrecht.
- Maraschin, S. F., De Priester, W., Spaink, H. P. y Wang, M.** 2005. Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. Journal of Experimental Botany **56**(417): 1711-1726.

- Mayakaduwa, D. R. G. y Silva, T. D.** 2018. Anther culture as a Supplementary Tool for Rice Breeding, p. 2-15. *En* Shah, F., Hayat, Z. y Iqbal, A. (eds.), *Rice Crop – Current Developments*. IntechOpen, London.
- Mlcek, J. y Rop, O.** 2011. Fresh edible flowers of ornamental plants - A new source of nutraceutical foods. *Trends Food Science Technology* **22**(10):561-569.
- Mori, S., Takizawa, M., Satou, M., Sakasai, M., Kusuoku, H., Nojiri, H., et al.** 2009. Enhancement of Lipolytic Responsiveness of Adipocytes by Novel Plant Extract in Rat. *Experimental Biology and Medicine* **234**(12):1445-9.
- Mosonyi, I. D., Tilly-Mándy, A., Kohut, I. y Honfi, P.** 2019. Flower forcing possibilities in *Hemerocallis* hybrids. *En*: Van Tuyl, J. M. (ed.), XII International Symposium on Flower Bulbs and Herbaceous Perennials. *Acta Horticulturae* **1237**: 177-184.
- Murovec, J. y Bohanec, B.** 2012. Haploids and doubled haploids in plant breeding, p.88-105. *En*: Abdurakhmonov I. Y. (ed.), *Plant breeding*. InTech, Rijeka.
- Murashige, T. y Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* **15**: 473-497.
- Nagy, I. J. y Maliga, P.** 1976. Callus induction and plant regeneration from mesophyll. *Z. Pflanzenphysiol.* **78**: 453-455.
- Niimi, Y., Han, D. S. y Fujisaki, M.** 2001. Production of virus-free plantlets by anther culture of *Lilium* x “Enchantment”. *Scientia Horticulturae* **90**: 325-334.
- Nitsch, J. P. y Nitsch, C.** 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science*. **163**(3862): 85-87.
- Parra-Vega, V., Corral-Martínez, P., Rivas-Sendra, A. y Seguí-Simarro, J. M.** 2015. Induction of embryogenesis in *Brassica napus* microspores produces a callosic subintinal layer and abnormal cell walls with altered levels of callose and cellulose. *Frontiers in Plant Science* **25**(6) : 1018.
- Pelliccione, S.** 2014. Microspore embryogenesis induction in hot pepper genotypes. Universidad de Granada, Granada.
- Pérez-Pérez, Y., Bárány, I., Berenger, E., Carneros, E., Risueno, M. C. y Testillano, P. S.** 2019. Modulation of autophagy and protease activities by small bioactive compounds to reduce cell death and improve stress induced microspore embryogenesis initiation in rapeseed and barley. *Plant Signaling & Behavior* **14**(2): 1-7.
- Pichot, C., Borrut, A. y El Maataoui, M.** 1998. Unexpected DNA content in the endosperm of *Cupressus dupreziana* A. Camus seeds and its implications in the reproductive process. *Sex Plant Reproduction* **11**(3): 148–152.
- Pintos, B., Martín, L. y Gómez, A.** 2014. Embriogénesis del polen (embriogénesis gamética). *Reduca (Biología)*. Serie Botánica. **7**(2): 19-33.
- Reinert, J., Bajaj, Y. P. S. y Heberle, E.** 1975. Induction of haploid tobacco plants from isolated pollen. *Protoplasma* **84**(1-2): 191-196.
- Ren, Y., Gao, Y. K., Liu, J. J., Fu, M. y Zhang, Q. X.** 2017. Investigation on resources of *Hemerocallis* in North China. *En*: Zhang, D. (ed.), II International Symposium on Germplasm of Ornamentals. *Acta Horticulturae* **1185**: 65-72.
- Rodríguez-Enríquez, M. J. y Grant-Downton, R. T.** 2013. A new day dawning: *Hemerocallis* (daylily) as a future model organism. *AoB Plants* **5**: 1-15.
- Scholl, R. L. y Amos, J. A.** 1980. Isolation of Doubled-Haploid Plants Through Anther Culture in *Arabidopsis thaliana*. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie* **96**(5): 407–414
- Seguí-Simarro, J. M. y Nuez, F.** 2008. How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiologia plantarum* **134**(1): 1-12.

- Seguí-Simarro, J. M.** 2010. Androgenesis revisited. *The Botanical Review* **76(3)**: 377-404.
- Seguí-Simarro, J. M.** 2015. Editorial: Doubled Haploidy in Model and Recalcitrant Species. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1175.
- Silva, T. D.** 2010. Indica rice anther culture: Can the impasse be surpassed?. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **100**:1-11.
- Silva, T. D.** 2012. Microspore Embryogenesis, p. 574-596. *En Dr. Sato, K. I. (ed.), Embryogenesis*. IntechOpen, London.
- Smykal, P.** 2000. Pollen embryogenesis. The stress mediated switch from gametophytic to sporophytic development. Current status and future prospects. *Plant Biology* **43**: 481-489.
- Solís, M. T., El-Tantawy, A. A., Cano, V., Risueno, M. C. y Testillano, P. S.** 2015. 5-Azacytidine promotes microspore embryogenesis initiation by decreasing global DNA methylation, but prevents subsequent embryo development in rapeseed and barley. *Frontiers in Plant Science* **6**: 472.
- Soriano, M., Li, H., Jacquard, C., Angenent, G. C., Krochko, J., et al.** 2014. Plasticity in Cell Division Patterns and Auxin Transport Dependency during in Vitro Embryogenesis in *Brassica napus*. *The Plant Cell* **26(6)**: 2568-2581.
- Soriano, M., Li, H. y Boutilier, K.** 2013. Microspore embryogenesis: establishment of embryo identity and pattern in culture. *Plant reproduction* **26(3)**: 181-196.
- Testillano, P. S.** 2019. Microspore embryogenesis: targeting the determinant factors of stress-induced cell reprogramming for crop improvement. *Journal of Experimental Botany* **70(11)**: 2965-2978.
- Yan, D., Wang, L. J., Zhao, C. H., Zhao, Y. Y., y Liu, J. X.** 2017. Embryology of *Hemerocallis* L. and its systematic significance. *Plant Systematics and Evolution* **303(5)**: 663-673.
- Zaki, M. A. M., y Dickinson, H. G.** 1991. Microspore-derived embryos in *Brassica*: the significance of division symmetry in pollen mitosis to embryogenic development. *Sexual Plant Reproduction*: **4**: 48-55.
- Zhang, L., Zhang, Y., Gao, Y., Jiang, X., Zhang, M., et al.** 2016. Effects of histone deacetylase inhibitors on microspore embryogenesis and plant regeneration in Pakchoi (*Brassica rapa* sp. *chinensis* L.). *Scientia Horticulturae* **209**: 61-66.
- Zhou, C.** 1988. A study on isolation and culture of pollen protoplasts. *Plant Science* **59(1)**: 101-108.
- Zhou, C.** 1989. Cell divisions in pollen protoplast culture of *Hemerocallis fulva* L. *Plant Science* **62(2)**: 229-235.