

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 013 182**

51 Int. Cl.:

**A01H 4/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2019** **E 19383042 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2025** **EP 3827665**

54 Título: **Inhibidores de cinasas de mamífero para promover la inducción de la embriogénesis de las plantas *in vitro***

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.04.2025**

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.00%)  
C/ Serrano 117  
28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**SÁNCHEZ TESTILLANO, PILAR;  
MARTINEZ GIL, ANA;  
GIL AYUSO-GONTAN, CARMEN;  
BERENQUER PEINADO, EDUARDO;  
CARNEROS GARCÍA, ELENA y  
PÉREZ PÉREZ, YOLANDA**

74 Agente/Representante:

**PONS IP**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

**ES 3 013 182 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Inhibidores de cinasas de mamífero para promover la inducción de la embriogénesis de las plantas *in vitro*

- 5 La invención se refiere al uso de inhibidores de cinasas de mamífero para promover la inducción de la embriogénesis de las plantas y su regeneración *in vitro*. Además, la presente invención desvela métodos para promover la inducción de la embriogénesis de las plantas y su regeneración *in situ* utilizando inhibidores de cinasas de mamífero.

10 **Antecedentes de la técnica**

- 10 Gran cantidad de empresas aprovechan la capacidad de muchas células vegetales para regenerar embriones a través del cultivo *in vitro* para la regeneración, propagación y selección de material vegetal de alta calidad/adaptado en los sectores agroforestal e industrial, una tecnología que permite la propagación de plantas con mayor ganancia genética, reduciendo tiempo y costes de los programas de reproducción y conservación. La capacidad de regenerar plantas fértiles adultas a partir de explantes cultivados *in vitro* está bien descrita en muchas especies y a través de diversas vías de desarrollo. Se ha demostrado que múltiples factores ambientales determinan las respuestas *in vitro* de los tejidos vegetales.

- 20 A través de la embriogénesis *in vitro*, las células somáticas de las plantas donadoras pueden reprogramarse mediante diferentes tratamientos (principalmente estrés y tratamientos hormonales), dando lugar a embriones enteros que luego germinan y finalmente producen una planta. La embriogénesis *in vitro* también puede inducirse a partir de microsporas, células precursoras de granos de polen. Debido a la condición haploide de estas células, la embriogénesis de microsporas es una herramienta biotecnológica útil en la reproducción vegetal como fuente de nueva variabilidad genética, fijada en plantas totalmente homocigotas en una sola generación.

- 25 En el caso de especies leñosas, la embriogénesis somática tiene muchas ventajas ya que los programas clásicos de mejoramiento genético tienen importantes limitaciones en los árboles debido a su larga vida útil y a las dificultades de conservación de las semillas y de reproducción vegetativa. La embriogénesis somática tiene un gran potencial para la propagación a gran escala y la crioconservación de genotipos élite arbóreos, así como para las estrategias de transformación.

- 30 Se han desarrollado sistemas de embriogénesis somática y de microsporas *in vitro* de muchas especies vegetales pertenecientes a una amplia gama de familias. La principal ventaja de la propagación de plantas *in vitro* es la producción rápida de un gran número de material de siembra de alta calidad, libre de enfermedades y uniforme para las empresas agroindustriales. A pesar de décadas de investigación, la escasa regeneración *in vitro* sigue siendo un problema persistente, ya que el proceso sigue siendo muy ineficaz en muchas especies de interés económico en los campos de la agricultura y la silvicultura, un hecho que afecta gravemente a la aplicación y coste de esta tecnología en los programas de reproducción y conservación vegetal.

- 40 El rendimiento de la producción de embriones somáticos y derivados de microsporas presenta varios cuellos de botella en diversas fases del proceso. Uno de los principales problemas es la baja proporción de células que se reprograman e inician la embriogénesis, siendo la eficacia del inicio de la embriogénesis una etapa crucial. Por lo tanto, son necesarias nuevas estrategias para mejorar la inducción de la embriogénesis *in vitro* en diferentes especies de interés económico, tales como especies de plantas de cultivo y forestales.

45 **Descripción de la invención**

- 50 Para solucionar las limitaciones mencionadas anteriormente, un objeto general de la invención es proporcionar el uso de inhibidores de cinasas de mamífero, preferentemente inhibidores de cinasas de ser humano, preferentemente compuestos inhibidores de la glucógeno sintasa cinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ , *glycogen synthase kinase-3 $\beta$* ) y/o de la cinasa con repeticiones ricas en leucina 2 (LRRK2, *leucine-rich repeat kinase 2*) humanas y métodos de dichos usos para inducir la embriogénesis vegetal.

- 55 En su búsqueda de nuevas estrategias para mejorar la inducción de la embriogénesis y la producción de embriones de plantas, los inventores descubrieron sorprendentemente que los inhibidores de cinasas de mamífero, preferentemente inhibidores de cinasas de ser humano, tienen un efecto positivo en el inicio de la embriogénesis de las plantas. Asimismo, la presente divulgación muestra que los tratamientos con estos inhibidores se han aplicado con éxito a diferentes protocolos *in vitro*, en medios líquidos o sólidos, y con embriogénesis directa, indirecta y secundaria/recurrente, proporcionando efectos promotores similares sobre la inducción de la embriogénesis. Los inventores han demostrado que los inhibidores de cinasas de mamífero, preferentemente inhibidores de cinasas de ser humano, preferentemente, inhibidores de GSK3 $\beta$  y/o de LRRK2, conducen a un aumento de la inducción de la embriogénesis *in vitro*, tanto de células somáticas como de microsporas, en especies de plantas de cultivo y forestales (Figs. 1-3). Además, los inventores demostraron que este sorprendente efecto se obtiene con varios inhibidores de diversas cinasas de ser humano, todas ellas con estructuras moleculares diferentes. (Figs. 4-5). Adicionalmente, los inventores demuestran que el aumento de la inducción de la embriogénesis vegetal se obtiene tanto en cultivos de embriogénesis líquidos como sólidos utilizando como material de partida tanto microsporas (embriogénesis por

microsporas) como otros explantes vegetales (embriogénesis somática) (Figs. 7-12). Asimismo, los inventores confirmaron, mediante tinción del ADN y microscopía de fluorescencia, que los proembriones obtenidos y cuantificados a partir de cultivos tratados con los inhibidores, eran efectivamente microsporas multicelulares (Fig. 6), el primer signo de inicio de la embriogénesis. Estos experimentos confirman el uso de dichos inhibidores de cinasas de mamífero de molécula pequeña como nuevas herramientas para promover la inducción y la optimización de la embriogénesis vegetal *in vitro*. Por último, estos resultados sugieren que en otros sistemas vegetales pueden funcionar mecanismos comunes *in vitro* y que una estrategia similar podría ampliarse a otras especies para aumentar la eficacia de la inducción de la embriogénesis y la reprogramación de las células vegetales.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un inhibidor de cinasas de mamífero para mejorar la inducción de la embriogénesis de las plantas *in vitro*, en donde el inhibidor de cinasas de mamífero se selecciona de una lista que consiste en:

4-bencil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidin-3,5-diona (TDZD8),  
 5-(2-morfolinetilimin)-2,3-difenil-2,5-dihidro-1,2,4-tiadiazol (VP3.15),  
 3-acetil-4-(1-metil-1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona (VP3.36),  
 4-hidroxi-1-etil-N'-palmitoil-2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-carbohidrazida (VP0.7),  
 N-(6-metilbenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida (JZ1.3),  
 N-(6-fluorobenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida, (JZ1.6),  
 N-(6-bromobenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida (JZ1.24), y  
 (E,Z)-3-(morfolinoimino)indolin-2-ona (IGS4.75).

El término "mamífero", como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluidas vacas, caballos, perros, gatos, ratas, ratones, primates y seres humanos. En una realización preferida de la invención, el mamífero es un ser humano.

El término "cinasa", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una superfamilia de enzimas que actúa fosforilando una o más proteínas, es decir, tienen actividad proteína cinasa. Los términos también se refieren a un ácido nucleico que codifica la proteína/enzima.

En una realización preferida de la invención las cinasas de mamífero son cinasas de ser humano.

Son ejemplos de cinasas de mamífero, preferentemente cinasas de ser humano, CDK1 (UniProt:P06493), CDK10 (UniProt:Q15131), CDK11A (UniProt:Q9UQ88), CDK11B (UniProt:P21127), CDK12 (UniProt:Q9NYV4), CDK13 (UniProt:Q14004), CDK14 (UniProt:O94921), CDK15 (UniProt:Q96Q40), CDK16 (UniProt:Q00536), CDK17 (UniProt:Q00537), CDK18 (UniProt:Q07002), CDK19 (UniProt:Q9BWU1), CDK2 (UniProt:P24941), CDK20 (UniProt:Q81ZL9), CDK3 (UniProt:Q00526), CDK4 (UniProt:P11802), CDK5 (UniProt:Q00535), CDK6 (UniProt:Q00534), CDK7 (UniProt:P50613), CDK8 (UniProt:P49336), CDK9 (UniProt:P50750), CDKL1 (UniProt:Q00532), CDKL2 (UniProt:Q92772), CDKL3 (UniProt:Q8IVW4), CDKL4 (UniProt:Q5MAI5), CDKL5 (UniProt:076039), CLK1 (UniProt:P49759), CLK2 (UniProt:P49760), CLK3 (UniProt:P49761), CLK4 (UniProt:Q9HAZ1), DYRK1A (UniProt:Q13627), DYRK1B (UniProt:Q9Y463), DYRK2 (UniProt:Q92630), DYRK3 (UniProt:O43781), DYRK4 (UniProt:Q9NR20), GSK3A (UniProt:P49840), GSK3B (UniProt:P49841), HIPK1 (UniProt:Q86Z02), HIPK2 (UniProt:Q9H2X6), HIPK3 (UniProt:Q9H422), HIPK4 (UniProt:Q8NE63), ICK (UniProt:Q9UPZ9), MAK (UniProt:P20794), MAPK1 (UniProt:P28482), MAPK10 (UniProt:P53779), MAPK11 (UniProt:Q15759), MAPK12 (UniProt:P53778), MAPK13 (UniProt:O15264), MAPK14 (UniProt:Q16539), MAPK15 (UniProt:Q8TD08), MAPK3 (UniProt:P27361), MAPK4 (UniProt:P31152), MAPK6 (UniProt:Q16659), MAPK7 (UniProt:Q13164), MAPK8 (UniProt:P45983), MAPK9 (UniProt:P45984), MOK (UniProt:Q9UQ07), NLK (UniProt:Q9UBE8), PRPF4B (UniProt:Q13523), SRPK1 (UniProt:Q96SB4), SRPK2 (UniProt:P78362), SRPK3 (UniProt:Q9UPE1), ACVR1 (UniProt:Q04771), ACVR1B (UniProt:P36896), ACVR1C (UniProt:Q8NER5), ACVR2A (UniProt:P27037), ACVR2B (UniProt:Q13705), ACVRL1 (UniProt:P37023), AMHR2 (UniProt:Q16671), ANKK1 (UniProt:Q8NFD2), ARAF (UniProt:P10398), BMPR1A (UniProt:P36894), BMPR1B (UniProt:000238), BMPR2 (UniProt:Q13873), BRAF (UniProt:P15056), ILK (UniProt:Q13418), IRAK1 (UniProt:P51617), IRAK2 (UniProt:O43187), IRAK3 (UniProt:Q9Y616), IRAK4 (UniProt:Q9NWZ3), KSR1 (UniProt:Q8IVT5), KSR2 (UniProt:Q6VAB6), LIMK1 (UniProt:P53667), LIMK2 (UniProt:P53671), LRRK1 (UniProt:Q38SD2), LRRK2 (UniProt:Q5S007), RAF1 (UniProt:P04049), RIPK1 (UniProt:Q13546), RIPK2 (UniProt:O43353), RIPK3 (UniProt:Q9Y572), RIPK4 (UniProt:P57078), TESK1 (UniProt:Q15569), TESK2 (UniProt:Q96S53), TGFB1 (UniProt:P36897), TGFB2 (UniProt:P37173), TNNT3 (UniProt:Q59H18) o MLKL (UniProt:Q8NB16), - Todos los números de registro corresponden a la publicación de UniProt del 16 de octubre de 2019.

En una realización adicional de la presente invención, las cinasas de mamífero, preferentemente, las cinasas de ser humano se seleccionan de GSK3 $\beta$  y/o LRRK2.

Como se utiliza en el presente documento, el término GSK3 $\beta$  se refiere a la proteína glucógeno sintasa cinasa 3 beta (EC:2.7.11.26) expuesta en la base de datos Uniprot con los números de registro: P49841-1 (SEQ ID NO: 1) y P49841-2 (SEQ ID NO:2), o como alternativa, en la base de datos GenBank con los números de registro NP\_002084.2 (SEQ ID NO: 2), NP\_001139628.1 (SEQ ID NO: 1), NP\_001341525.1 (SEQ ID NO: 3) y/o XP\_006713673.1 (SEQ ID NO: 4)

que tiene la actividad reguladora de la señalización WNT a través de su actividad cinasa.

En una realización más, la cinasa de mamífero GSK3 $\beta$  comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 4, preferentemente una identidad de secuencia de 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o de 100 % con cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 4. En una realización más preferida, la cinasa de mamífero GSK3 $\beta$  comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 4. En una realización más preferida, la cinasa de mamífero GSK3 $\beta$  consiste en cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 4.

El término "identidad", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la proporción de aminoácidos idénticos entre dos péptidos o proteínas comparados o a la proporción de nucleótidos idénticos entre dos secuencias de nucleótidos comparadas. Los métodos para comparar secuencias se conocen en el estado de la técnica e incluyen, pero sin limitación, los programas BLASTP o BLASTN, ClustalW y FASTA. Se puede considerar que las secuencias de péptidos, de proteínas o de nucleótidos con identidades porcentuales de al menos 90 % mantendrán las mismas propiedades que las de secuencia a la que hacen referencia.

Como se utiliza en el presente documento, el término LRRK2 se refiere a la proteína cinasa con repeticiones ricas en leucina 2 (EC 2.7.11.1) expuesta en la base de datos Uniprot con el número de registro: Q5S007 (SEQ ID NO: 5), o como alternativa en la base de datos GenBank con los números de registro AAI17181.1 (SEQ ID NO: 6) y/o AAV63975.1 (SEQ ID NO: 7).

En una realización preferida adicional, la cinasa LRRK2 de mamífero comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con cualquiera de las SEQ ID NO: 5 a 7, preferentemente una identidad de secuencia de 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o de 100 % con cualquiera de las SEQ ID NO: 5 a 7. En una realización más preferida, la cinasa LRRK2 de mamífero comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 5 a 7. En una realización más preferida, la cinasa LRRK2 de mamífero consiste en cualquiera de las SEQ ID NO: 5 a 7.

En una realización preferida adicional, la cinasa GSK3 $\beta$  comprende la secuencia seleccionada de la lista que consiste en la SEQ ID NO: 1 a 4, y la cinasa LRRK2 comprende la secuencia seleccionada de la lista que consiste en la SEQ ID NO: 5 a 7.

En una realización preferida adicional de la presente invención, los inhibidores de cinasas de mamífero para inducir la embriogénesis de las plantas *in vitro*, se seleccionan de inhibidores de GSK3 $\beta$  y/o inhibidores de LRRK2.

Como se utiliza en el presente documento, el término "inhibidor" se utiliza indistintamente en el sentido de "antagonista". Estos términos definen compuestos o composiciones que tienen la capacidad de disminuir determinada actividad enzimática o competir con la actividad o función de un sustrato de dicha enzima. Como se utiliza en la presente invención, se refiere a un compuesto químico (natural o no), tal como una macromolécula biológica (p. ej., un polinucleótido, una proteína o un polipéptido, una hormona, un polisacárido, un lípido), una molécula orgánica (p. ej., una molécula orgánica pequeña), o un extracto elaborado a partir de materiales biológicos tales como bacterias, plantas, hongos, o células o tejidos animales (en particular de mamíferos, incluido el ser humano) que se haya evaluado para reducir, disminuir o inhibir (directa o indirectamente) la actividad de una cinasa.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "inhibidor de GSK3 $\beta$ " o "inhibidor de LRRK2" se refiere a cualquier molécula como se ha descrito anteriormente, capaz de inhibir la actividad de GSK3 $\beta$  o de LRRK2 según se determine inhibiendo específicamente los niveles de sustratos fosforilados específicos de GSK3 $\beta$  o LRRK2 (del total de sustratos presentes en una célula).

Para los fines de la presente invención, los inhibidores de GSK3 $\beta$  se seleccionan de: 4-bencil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidin-3,5-diona (TDZD8); 5-(2-morfolinetilimin)-2,3-difenil-2,5-dihidro-1,2,4-tiadiazol (VP3.15); 3-acetil-4-(1-metil-1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona (VP3.36); y 4-hidroxi-1-etil-N'-palmitoil-2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-carbohidrazida (VP0.7).

Para los fines de la presente invención, los inhibidores de LRRK2 se seleccionan de: N-(6-metilbenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida (JZ1.3), N-(6-fluorobenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida, (JZ1.6) y N-(6-bromobenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida (JZ1.24) y (E,Z)-3-(morfolinoimino)indolin-2-ona (IGS4.75).

En otra realización de la presente invención, la inducción de la embriogénesis de la plantas *in vitro* comprende un mayor crecimiento del embrión vegetal y/o un mayor rendimiento de la producción de embriones. Como se muestra en los Ejemplos, los resultados establecen que todos los inhibidores probados conducen a un aumento de la eficacia de inducción de la embriogénesis en el intervalo de 20-25 % para los inhibidores de GSK3 $\beta$  y de 23-30 % para los inhibidores de LRRK2, cuando se aplican a su concentración óptima.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "regulador del crecimiento de embriones vegetales" se refiere a cualquier compuesto capaz de inducir el crecimiento de embriones vegetales, preferentemente embriones de plantas agrícolas y/o forestales.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "rendimiento de la producción de embriones" se refiere al número de embriones individuales resultantes de la inducción de la embriogénesis *in vitro*, preferentemente embriogénesis de microsporas y/o somática.

- 5 En otra realización de la presente invención, los inhibidores de cinasas de mamífero se usan en la embriogénesis vegetal *in vitro* en donde la embriogénesis es somática y/o de microsporas.

La expresión "embriogénesis somática", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un tipo de cultivo tisular vegetal en el que un trozo de una planta donadora, compuesto por células somáticas, se extirpa, se cultiva y se induce para formar embriones múltiples, que después pueden germinar y producir plantas enteras.

La expresión "embriogénesis de microsporas" como se utiliza en el presente documento, se refiere a un proceso único en el que polen haploide, inmaduro (microsporas) se induce mediante diferentes tratamientos para formar embriones en cultivo. Estos embriones derivados de microsporas pueden después germinar y convertirse en plantas haploides dobles homocigotas mediante agentes de duplicación cromosómica y/o mediante duplicación espontánea.

En una realización adicional de la presente invención, los inhibidores de cinasas de mamífero se utilizan para inducir la embriogénesis de plantas *in vitro* en donde las plantas son plantas de cultivo y/o forestales.

20 Como se utiliza en el presente documento, el término "planta" se refiere a una planta entera o a partes de la misma. La expresión "parte de la planta" se refiere a células aisladas de la planta o a partes (tejidos) aisladas de la planta, de tal manera que, a partir de estas, pueden (re)generarse plantas, incluidos protoplastos vegetales, callos vegetales, grupos de plantas y células vegetales que están intactos en las plantas o forman parte de ellas, tales como semillas, hojas, tallos, pólenes, raíces, puntas de raíces, anteras, óvulos, pétalos, flores, plántulas, embriones y cápsulas.

En una realización preferida, las plantas de cultivo como se utiliza en el presente documento se seleccionan de la lista que consiste en: *Medicago spp.*, *Prunus spp.*, *Angelica spp.*, *Pimpinella spp.*, *Ceratonia siliqua*, *Malus spp.*, *Areca spp.*, *Arracacia spp.*, *Maranta spp.*, *Cynara spp.*, *Daucus carota*, *Anacardium occidentale*, *Asparagus spp.*, *Persea spp.*, *Pearl spp.*, *Pennisetum spp.*, *Vigna spp.*, *Musa spp.*, *Sechium edule*, *Jatropha spp.*, *Cocos nucifera*, *Hordeum spp.*, *Apium graveolens*, *Cyclamen spp.*, *Atalantia spp.*, *Anethum graveoles*, *Vigna subterranea*, *Laurus spp.*, *Phaseolus spp.*, *Ocimum spp.*, *Cinnamomum verum*, *Paulinia cupana*, *Areca spp.*, *Annona reticulata*, *Piper spp.*, *Acacia spp.*, *Rubus spp.*, *Vaccinium spp.*, *Bertholletia excelsa*, *Sesamum indicum*, *Artocarpus spp.*, *Vicia spp.*, *Fagopyrum esculentum*, *Carum carvi*, *Elettaria cardamomum*, *Ricinus communis*, *Castanea sativa*, *Cicer spp.*, *Cichorium spp.*, *Eugenia aromatica*, *Syzygium aromaticum*, *Trifolium spp.*, *Erythroxylum spp.*, *Cola spp.*, *Brassica spp.*, *Valerianella locusta*, *Gossypium spp.*, *Lepidium sativum*, *Cucumis spp.*, *Ficus carica*, *Corylus spp.*, *Furcraea macrophylla*, *Linum spp.*, *Geranium spp.*, *Zingiber spp.*, *Panax spp.*, *Ribes spp.*, *Vitis vinifera*, *Lygeum spartum*, *Dactylis spp.*, *Arachis hypogaea*, *Corylus avellana*, *Cannabis sativa*, *Crotalaria juncea*, *Lawsonia inermis*, *Armoracia rusticana*, *Indigofera tinctoria*, *Jasminum spp.*, *Helianthus spp.*, *Actinidia deliciosa*, *Lavandula spp.*, *Citrus spp.*, *Cymbopogon citratus*, *Lens culinaris*, *Lespedeza spp.*, *Lactuca spp.*, *Litchi chinensis*, *Eriobotrya japonica*, *Lupinus spp.*, *Macadamia spp.*, *Zea mays*, *Mangifera spp.*, *Secale spp.*, *Setaria italica*, *Echinochloa esculenta*, *Pennisetum americanum*, *Panicum miliaceum*, *Mentha spp.*, *Morus spp.*, *Sinapis spp.*, *Avena spp.*, *Elaeis guineensis*, *Abelmoschus esculentus*, *Hibiscus esculentus*, *Olea spp.*, *Allium spp.*, *Papaver spp.*, *Borassus flabellifer*, *Elaeis guineensis*, *Pastinaca sativa*, *Pisum sativum*, *Pyrus communis*, *Carya illinoensis*, *Capsicum spp.*, *Cajanus cajan*, *Ananas comosus*, *Pistacia vera*, *Punica granatum*, *Solanum spp.*, *Ipomoea spp.*, *Cucurbita spp.*, *Chrysanthemum spp.*, *Aspidosperma spp.*, *Cydonia oblonga*, *Cinchona spp.*, *Chenopodium quinoa*, *Raphanus sativus*, *Rubus spp.*, *Agrostis spp.*, *Rheum spp.*, *Oryza spp.*, *Rose spp.*, *Hevea brasiliensis*, *Lolium spp.*, *Crocus sativus*, *Vitellaria paradoxa*, *Butyrospermum parkii*, *Agave spp.*, *Glycine spp.*, *Triticum spp.*, *Spinacia oleracea*, *Fragaria spp.*, *Beta spp.*, *Sorghum spp.*, *Thymus spp.*, *Timothy spp.*, *Phleum pratense*, *Phleum alpinum*, *Saccharum officinarum*, *Nicotiana spp.*, *Bixa spp.*, *Solanum spp.*, *Lotus spp.*, *Triticale (Híbrido de Triticum aestivum y Secale cereale)*, *Cúrcuma spp.*, *Vanilla planifolia*, *Juglans spp.*, *Citrullus lanatus*, *Dioscorea spp.*, *Ilex paraguariensis*, *Pennisetum glaucum*, *Setaria italica*, *Eleusine coracana*, *Panicum virgatum*, *Echinochloa frumentacea*, *Paspalum scrobiculatum*, *Digitaria exilis*, *Milium effusum*, *Phalaris canariensis*, *Coix lacryma-jobi*. En su caso, las especies de plantas de cultivo enumeradas en el presente documento, incluyen todas las diferentes subespecies, variedades y cultivares existentes, incluyendo, sin limitación, variedades regionales, estacionales y agrícolas.

En una realización más preferida, las plantas de cultivo se seleccionan de la lista que consiste en: *Hordeum spp.*, *Zea mays*, *Secale spp.*, *Setaria italica*, *Panicum miliaceum*, *Avena spp.*, *Oryza spp.*, *Triticum spp.*, *Sorghum spp.*, *Triticale (Híbrido de Triticum aestivum y Secale cereale)*, *Pennisetum glaucum*, *Eleusine coracana*, *Phalaris canariensis*, *Cynara spp.*, *Daucus carota*, *Piper spp.*, *Trifolium spp.*, *Brassica spp.*, *Lactuca spp.*, *Mentha spp.*, *Allium spp.*, *Pisum sativum*, *Capsicum spp.*, *Solanum spp.*, *Cucurbita spp.*, *Chenopodium quinoa*, *Rubus spp.*, *Spinacia oleracea*, *Beta spp.*, *Solanum spp.*, *Helianthus spp.*, *Gossypium spp.*, *Arachis hypogaea*, *Cannabis sativa*, *Saccharum officinarum*, *Linum spp.*, *Glycine spp.*, *Nicotiana spp.*, *Medicago spp.*, y/o *Agrostis spp.* En una realización más preferida, las plantas de cultivo pertenecen a *Hordeum spp.* y/o *Brassica spp.*

65 En otras realizaciones preferidas las plantas forestales se seleccionan de una lista que consiste en: *Araucaria spp.*, *Cryptomeria japonica*, *Cupressus spp.*, *Juniperus spp.*, *Sequoia sempervirens*, *Sequoiadendron giganteum*, *Thuja spp.*

5 *Abies spp., Cedrus spp., Larix spp., Picea spp., Pinus spp., Pseudotsuga spp., Taxus spp., Ginkgo biloba, Acer spp., Anacardium occidentale, Mangifera spp., Pistacia spp., Cocos nucifera, Phoenix spp., Betula spp., Corylus spp., Paulownia tomentosa, Adansonia spp., Capparis spp., Sambucus spp., Carica papaya, Euonymus spp., Hevea brasiliensis, Manihot spp., Acacia spp., Robinia spp., Castanea spp., Fagus spp., Quercus spp., Carya spp., Juglans spp., Cinnamomum spp., Laurus spp., Persea spp., Swietenia spp., Artocarpus spp., Ficus spp., Morus spp., Myrtus communis, Psidium spp., Nothofagus spp., Fraxinus spp., Olea europaea, Platanus spp., Dendrocalamus asper, Malus spp., Photinia spp., Photinia × fraser, Prunus spp., Pyrus spp., Coffea spp., Citrus spp., Populus spp., Salix spp., Solanum erianthum; Theobroma cacao, Camelia spp., Tilia spp., Ulmus spp., Tamarillo, (Cyphomandra betacea (Cav.) (Sendtn.); Solanum betaceum Cav.), olivo de la India (Elaeocarpus robustus L.); palmera botella (Hyophorbe lagenicaulis), sisu de la India (Dalbergia sissoo), canela petrea (Ocotea catharinensis Mez.), Sándalo (Santalum album), Echinacea purpurea L., limoncillo chino (Dimocarpus longan Lour.), (Aspidosperma polyneuron Mull.Arg), ratán (Calamus spp.), jojoba (Simmondsia chinensis), (Aegle marmelos L.), cimífuga racemosa (Actaea racemosa L.), Gomortega keule, Cyclamen spp., Álamo híbrido (Populus tremuloides x Populus tremula), Palma aceitera (Elaeis guineensis Jacq.), Passiflora spp., Palmera de asaí (Euterpe oleracea Mart.), helecho arborescente (Cyathea delgadii Steub.), Eucalyptus spp., Alerce híbrido (Larix x eurolepis Henry), nimbo (Azadirachta indica). En su caso, las especies de plantas forestales enumeradas en el presente documento, incluyen todas las diferentes subespecies, variedades y cultivares existentes, incluyendo, sin limitación, variedades regionales, estacionales y agrícolas.*

20 En una realización más preferida, las plantas forestales se seleccionan de la lista que consiste en: *Araucaria spp., Cupressus spp., Juniperus spp., Abies spp., Cedrus spp., Larix spp., Picea spp., Pinus spp., Pseudotsuga spp., Taxus spp., Ginkgo biloba, Acer spp., Anacardium occidentale, Mangifera spp., Pistacia spp., Cocos nucifera, Phoenix spp., Betula spp., Corylus spp., Carica papaya, Hevea brasiliensis, Acacia spp., Robinia spp., Castanea spp., Fagus spp., Quercus spp., Cinnamomum spp., Laurus spp., Persea spp., Morus spp., Psidium spp., Fraxinus spp., Olea europaea, Platanus spp., Malus spp., Prunus spp., Pyrus spp., Coffea spp., Citrus spp., Populus spp., Salix spp., Theobroma cacao, Camelia spp., Ulmus spp., Tamarillo, (Cyphomandra betacea (Cav.) (Sendtn.); Eucalyptus spp.* En una realización más preferida, las plantas forestales pertenecen a *Quercus spp.*

30 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método, de aquí en adelante el método de la invención, para inducir la embriogénesis vegetal *in vitro*, donde el método comprende:

- a. cultivar las microsporas y/o los explantes en un medio de cultivo adecuado para el desarrollo embrionario; y
- b. añadir inhibidores de cinasas de mamífero al medio de cultivo de la etapa a); y
- c. cultivar durante un periodo suficiente para obtener embriones,

35 en donde el inhibidor de cinasas de mamífero se selecciona de una lista que consiste en:

- 4-bencil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidin-3,5-diona (TDZD8),
- 5-(2-morfolinetilimin)-2,3-difenil-2,5-dihidro-1,2,4-tiadiazol (VP3.15),
- 3-acetil-4-(1-metil-1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona (VP3.36),
- 4-hidroxi-1-etil-N'-palmitoil-2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-carbohidrazida (VP0.7),
- N-(6-metilbenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida (JZ1.3),
- N-(6-fluorobenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida, (JZ1.6),
- N-(6-bromobenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida (JZ1.24) y
- (E,Z)-3-(morfolinoimino)indolin-2-ona (IGS4.75).

45 La expresión "medio de cultivo", como se utiliza en el presente documento, pretende indicar cualquier material ya sea sólido o líquido en el que puedan crecer células, tejidos, órganos vegetales y plantas enteras. Se pueden proporcionar aditivos a las células en forma de medios y controlar las condiciones ambientales. Hay muchos tipos de medios de cultivo de tejidos vegetales que comprenden mezclas de sales minerales que contienen oligoelementos esenciales, además de diversos aditivos como aminoácidos, azúcares, reguladores del crecimiento y vitaminas que, por tanto, deben añadirse al medio de cultivo para permitir el desarrollo del (pro)embrión, explante y/o crecimiento de la planta. Son ejemplos de medios de cultivo de tejidos vegetales, sin limitación, Medio Chu (N6) (Duchefa, Sigma-Aldrich), Medio Clc/Ipomoea CP (Duchefa), medio CLC/Ipomoea ep (Duchefa), medio DKV/Juglans (Duchefa, Sigma-Aldrich), medio Erikson (Duchefa), medio Gamborg B5 (Duchefa, Sigma-Aldrich), medio Gresshoff y Doy (Duchefa), medio para orquídeas Lindemann (Duchefa), medio NLN (Duchefa), medio Nitsch (Duchefa), medio para plantas leñosas (Duchefa, Sigma-Aldrich), medio Linsmaier y Skoog (Duchefa), medio Litvay (Duchefa), medio Quorin y Lepoivre (Duchefa), medio para aceitunas Rugini (Duchefa), medio Schenk y Hildebrandt (Duchefa, Sigma-Aldrich), medio de White (Duchefa, Sigma-Aldrich), medio Westvaco WV5 (Duchefa), medio Murashige y Skoog (Duchefa, Sigma-Aldrich), medio Murashige y Skoog con vitaminas B5 (Duchefa), medio Medio Murashige y Skoog con vitaminas Nitsch (Duchefa), medio Murashige y Skoog van der Salm (Duchefa), mezcla de sales basales n°2 de Hoagland (Sigma-Aldrich), macronutrientes Sommer + micronutrientes y vitaminas MS (Testillano *et al.* 2018, Plant Cell Culture Protocols, eds. V.M. Loyola-Vargas & N. Ochoa-Alejo. Springer and Bussines Media. págs. 247-256), medio KBP (Kumlehn *et al.* 2006).

65 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "embrión vegetal" se refiere a un embrión vegetal somático o a un embrión vegetal de microspora. Los embriones vegetales somáticos pueden producirse cultivando tejido

embriogénico por métodos estándar en condiciones de laboratorio en las que algunas de las células que comprenden los tejidos, las sensibles, se inducen a reprogramarse y se desarrollan en embriones completos. En el mismo sentido, el embrión vegetal de microspora puede producirse cultivando anteras que contengan microsporas o microsporas aisladas en un medio de cultivo adecuado en condiciones definidas en el que algunas microsporas, las sensibles, se inducen a la reprogramación y se desarrollan en embriones haploides completos y doble haploides.

Como se utiliza en el presente documento, "embrión vegetal" incluye embriones en diversas fases de desarrollo.

El término "explante", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un trozo de tejido tomado de una planta donadora para su cultivo.

En una realización preferida, el método de la invención es un método en donde la embriogénesis es somática y/o por microsporas.

Todos los términos y definiciones mencionados anteriormente para el uso de los inhibidores de cinasas de mamífero para inducir la embriogénesis vegetal *in vitro*, se aplican del mismo modo al método para inducir la embriogénesis vegetal *in vitro* desvelado en el presente documento.

Por tanto, en otra realización preferida, el método de la invención es un método en donde las cinasas de mamífero son cinasas de ser humano, preferentemente GSK3 $\beta$  y/o LRRK2, como se ha desvelado anteriormente.

En una realización preferida adicional, el método de la invención es un método en donde las plantas son plantas de cultivo y/o forestales.

En otra realización preferida adicional, el método de la invención es un método en donde las plantas de cultivo se seleccionan de la lista que consiste en: *Hordeum spp.*, *Zea mays*, *Secale spp.*, *Setaria italica*, *Panicum miliaceum*, *Avena spp.*, *Oryza spp.*, *Triticum spp.*, *Sorghum spp.*, *Triticale (Híbrido de Triticum aestivum y Secale cereale)*, *Pennisetum glaucum*, *Eleusine coracana*, *Phalaris canariensis*, *Cynara spp.*, *Daucus carota*, *Piper spp.*, *Trifolium spp.*, *Brassica spp.*, *Lactuca spp.*, *Mentha spp.*, *Allium spp.*, *Pisum sativum*, *Capsicum spp.*, *Solanum spp.*, *Cucurbita spp.*, *Chenopodium quinoa*, *Rubus spp.*, *Spinacia oleracea*, *Beta spp.*, *Solanum spp.*, *Helianthus spp.*, *Gossypium spp.*, *Arachis hypogaea*, *Cannabis sativa*, *Saccharum officinarum*, *Linum spp.*, *Glycine spp.*, *Nicotiana spp.*, *Medicago spp.*, y/o *Agrostis spp.* En una realización más preferida, las plantas de cultivo pertenecen a *Brassica spp.* y/o a *Hordeum spp.*

En otra realización preferida, el método de la invención es un método en donde las plantas forestales se seleccionan de la lista que consiste en: *Araucaria spp.*, *Cupressus spp.*, *Juniperus spp.*, *Abies spp.*, *Cedrus spp.*, *Larix spp.*, *Picea spp.*, *Pinus spp.*, *Pseudotsuga spp.*, *Taxus spp.*, *Ginkgo biloba*, *Acer spp.*, *Anacardium occidentale*, *Mangifera spp.*, *Pistacia spp.*, *Cocos nucifera*, *Phoenix spp.*, *Betula spp.*, *Corylus spp.*, *Carica papaya*, *Hevea brasiliensis*, *Acacia spp.*, *Robinia spp.*, *Castanea spp.*, *Fagus spp.*, *Quercus spp.*, *Cinnamomum spp.*, *Laurus spp.*, *Persea spp.*, *Morus spp.*, *Psidium spp.*, *Fraxinus spp.*, *Olea europaea*, *Platanus spp.*, *Malus spp.*, *Prunus spp.*, *Pyrus spp.*, *Coffea spp.*, *Citrus spp.*, *Populus spp.*, *Salix spp.*, *Theobroma cacao*, *Camelia spp.*, *Ulmus spp.*, *Tamarillo*, (*Cyphomandra betacea (Cav.) (Sendtn.)*); *Eucalyptus spp.* En una realización más preferida, las plantas forestales pertenecen a *Quercus spp.*

En la presente invención, los inhibidores de GSK3 $\beta$  se seleccionan de una lista que consiste en: 4-bencil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidin-3,5-diona (TDZD8), 5-(2-morfolinetilimin)-2,3-difenil-2,5-dihidro-1,2,4-tiadiazol (VP3.15), 3-acetil-4-(1-metil-1H-indol-3-il)-1 H-pirrol-2,5-diona (VP3.36), 4-hidroxi-1-etil-N'palmitoil-2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-carbohidrazida (VP0.7).

En la presente invención, los inhibidores de LRRK2 se seleccionan de una lista que consiste en: N-(6-metilbenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida (JZ1.3), N-(6-fluorobenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida (JZ1.6), N-(6-bromobenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida (JZ1.24) y (E,Z)-3-(morfolinoimino)indolin-2-ona (IGS4.75).

En una realización preferida adicional, el método de la invención es un método en donde la concentración del inhibidor varía de 0,1  $\mu$ M a 100  $\mu$ M inclusive. Preferentemente, las concentraciones del inhibidor tienen intervalos de 0,5 - 10  $\mu$ M, 10 - 20  $\mu$ M, 20 - 30  $\mu$ M, 30 - 40  $\mu$ M, 40 - 50  $\mu$ M, 50 - 60  $\mu$ M, 70 - 80  $\mu$ M, 80 - 90  $\mu$ M, 90 - 100  $\mu$ M. Más preferentemente, las concentraciones del inhibidor tienen intervalos de 0,1 - 5  $\mu$ M, 5 - 10  $\mu$ M, 10 - 15  $\mu$ M, 15 - 20  $\mu$ M, 20 - 25  $\mu$ M, 25 - 30  $\mu$ M, 30 - 35  $\mu$ M, 35 - 40  $\mu$ M, 40 - 45  $\mu$ M, 45 - 50  $\mu$ M, 50 - 55  $\mu$ M, 55 - 60  $\mu$ M, 60 - 65  $\mu$ M, 65 - 70  $\mu$ M, 70 - 75  $\mu$ M, 75 - 80  $\mu$ M, 80 - 85  $\mu$ M, 85 - 90  $\mu$ M, 90 - 95  $\mu$ M, 95 - 100  $\mu$ M.

En una realización preferida adicional, el método de la invención es un método en donde el medio de cultivo es un medio líquido y la concentración del inhibidor varía de 0,1  $\mu$ M a 100  $\mu$ M inclusive, preferentemente de 0,5  $\mu$ M a 5  $\mu$ M inclusive.

En otra realización preferida, el método de la invención es un método en donde el medio de cultivo es un medio sólido y la concentración del inhibidor varía de 0,1  $\mu$ M a 100  $\mu$ M inclusive, preferentemente de 25  $\mu$ M a 100  $\mu$ M, preferentemente de 25  $\mu$ M a 50  $\mu$ M.

En una realización más preferida, en donde la embriogénesis es una embriogénesis a partir de microsporas, la concentración del inhibidor varía de 0,1  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  inclusive, preferentemente de 0,5  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$  y más preferentemente de 0,5  $\mu\text{M}$  a 5  $\mu\text{M}$  en donde el medio de cultivo es un medio líquido. En otra realización preferida, la concentración del inhibidor varía de 20  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  inclusive, preferentemente de 25  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$ , en donde el medio de cultivo es un medio sólido.

En una realización más preferida, en donde la embriogénesis es una embriogénesis somática, la concentración del inhibidor varía de 20  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  inclusive, preferentemente de 25  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$ , en donde el medio de cultivo es un medio sólido.

### Breve descripción de los dibujos

Fig. 1. *Embriogénesis* de microsporas *in vitro* en *B. napus*. Embriones cotiledonarios desarrollados a partir del cultivo de microsporas aisladas en medio líquido sin inhibidores de cinasas de mamífero.

Fig. 2. *Embriogénesis* de microsporas *in vitro* en *H. vulgare*. Embriones coleoptilares y en estadio foliar desarrollados a partir del cultivo de microsporas aisladas en medio líquido sin inhibidores de cinasas de mamífero.

Fig. 3. *Embriogénesis somática in vitro* en *Q. suber*. Embriones en diferentes fases de desarrollo, cultivados en medio sólido sin inhibidores de cinasas de mamífero, emergentes de masas proembriogénicas y otros embriones, algunos de ellos tienen embriones cotiledonarios diferenciados totalmente maduros.

Fig. 4. **Efectos de cuatro inhibidores diferentes de GSK3 $\beta$  (TDZD.8, VP3.15, VP3.36 y VP0.7) sobre la eficacia de inducción de la embriogénesis en cultivos de microsporas de *B. napus*.** Las columnas indican el cambio porcentual de proembriones a los 4 días y se refieren al porcentaje medio de proembriones en los cultivos de control, que se ha normalizado al 100 %. Los asteriscos de las columnas indican diferencias estadísticamente significativas con los cultivos de control, según la prueba de la *t* de Student a un valor de  $P \leq 0,05$ .

Fig. 5. **Efectos de cuatro inhibidores diferentes de LRRK2 (JZ1.3, JZ1.6, JZ1.24 y IGS4.75) sobre la eficacia de inducción de la embriogénesis en cultivos de microsporas de *B. napus*.** Las columnas indican el cambio porcentual de proembriones a los 4 días y se refieren al porcentaje medio de proembriones en los cultivos de control, que se ha normalizado al 100 %. Los asteriscos de las columnas indican diferencias estadísticamente significativas con los cultivos de control, según la prueba de la *t* de Student a un valor de  $P \leq 0,05$ .

Fig. 6. **Proembriones en cultivos tratados con TDZD.8 de embriogénesis de microsporas de *B. napus*.** Después de 4 días en cultivo, los proembriones (flechas) coexistieron con microsporas que no respondieron y muertas (estructuras más pequeñas); la tinción con DAPI (recuadro de la derecha) revela que los proembriones contienen varios núcleos (flechas), lo que indica el inicio de la embriogénesis.

Fig. 7. **Efectos de TDZD.8 (inhibidor de GSK3 $\beta$ ) y JZ1.24 (inhibidor de LRRK2) sobre la eficacia de inducción de la embriogénesis en cultivos de microsporas de *B. napus*.** Las columnas indican el cambio porcentual de proembriones a los 4 días y se refieren al porcentaje medio de proembriones en los cultivos de control, que se ha normalizado al 100 %. Los asteriscos de las columnas indican diferencias estadísticamente significativas con los cultivos de control, según la prueba de la *t* de Student a un valor de  $P \leq 0,05$ .

Fig. 8. **Evaluación de la capacidad germinativa de embriones producidos en cultivos de microsporas de *B. napus*.** Los embriones en germinación de cultivos de control (izquierda) y tratados (derecha), muestran raíces e hipocótilos bien desarrollados en la mayoría de los embriones, en ambas condiciones.

Fig. 9. **Efectos de inhibidores de GSK3 $\beta$  y LRRK2 (TDZD.8 y JZ1.24, respectivamente) seleccionados, sobre la eficacia de inducción de la embriogénesis en cultivos de microsporas de *H. vulgare*.** Las columnas indican el cambio porcentual de proembriones a los 4 días en los cultivos de control (no tratados) y tratados. Los asteriscos de las columnas indican diferencias estadísticamente significativas con los cultivos de control, según la prueba de la *t* de Student a un valor de  $P \leq 0,05$ .

Fig. 10. **Efectos de inhibidores de GSK3 $\beta$  y LRRK2 (TDZD.8 y JZ1.24) seleccionados, sobre la producción de embriones en cultivos de microsporas de *H. vulgare*.** Las columnas indican el número medio de embriones por placa formados a los 40 días en los cultivos de control (no tratados) y tratados. Las diferentes letras de las columnas indican diferencias significativas según ANOVA y pruebas de Tukey a un valor de  $P \leq 0,05$ .

Figura 11: **Efectos de inhibidores de GSK3 $\beta$  y LRRK2 (TDZD.8 y JZ1.24) seleccionados, sobre la producción de embriones en la embriogénesis somática de *Q. suber*.** Las columnas indican el número medio de embriones por gramo de explante inicial, en cultivos de control (no tratados) y tratados. Las diferentes letras de las columnas indican diferencias significativas según ANOVA y pruebas de Tukey a un valor de  $P \leq 0,05$ .

Figura 12: **Efectos de inhibidores de GSK3 $\beta$  y LRRK2 (TDZD.8 y JZ1.24) seleccionados, sobre la producción de embriones en la embriogénesis de microsporas de *Q. suber*.** Las columnas indican el número medio de embriones por gramo de explante inicial, en cultivos de control (no tratados) y tratados. Los asteriscos de las columnas indican diferencias estadísticamente significativas con los cultivos de control, según la prueba de la *t* de Student a un valor de  $P \leq 0,05$ .

### Ejemplos

#### Metodología

##### 1.1. Embriogénesis de microsporas de *B. napus*, mediante cultivo de microsporas aisladas (protocolo sin

**inhibidores)**

Como plantas donadoras se utilizaron plantas de *B. napus* L. (colza) cv. 'Topas' línea DH407. Las semillas de colza germinaron y crecieron en condiciones controladas (humedad relativa del 60 %, a 15 °C bajo fotoperiodo de día largo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad a 10 °C) en una cámara de crecimiento en macetas que contenían una mezcla de sustrato orgánico y vermiculita (2/1, v/v).

Botones florales que contenían microsporas vacuoladas, la fase más sensible para la inducción de microsporas, se aislaron para el cultivo de microsporas como ha descrito anteriormente (Prem *et al.*, 2012 BMC Plant Biology 12, 127). La superficie de los botones seleccionados se esterilizó con lejía comercial al 5,0 % (v/v) (cloro activo al 5 %) durante 20 minutos y a continuación se enjuagaron 6-7 veces con agua destilada esterilizada. Se trituraron de 10 a 15 botones utilizando un mortero y maja enfriado en 5 ml de medio NLN-13 frío que contenía sacarosa al 13 % (p/v). La suspensión se filtró a través de una malla de nailon de 48 µm y el filtrado se recogió en tubos de centrifuga Falcon de 15 ml. Los botones triturados se enjuagaron con 5 ml de NLN-13 para completar el volumen a 10 ml y el filtrado se centrifugó a continuación a 1100 rpm durante 5 min a 4 °C. El precipitado se volvió a suspender en 10 ml de NLN-13 frío y se centrifugó como se ha mencionado anteriormente. Este proceso se repitió tres veces para lavar las microsporas. El sedimento final se suspendió en NLN-13 y la densidad celular se ajustó a 10.000 células por ml. A continuación, la suspensión celular se vertió en placas de Petri de 90 mm (10 ml por placa de Petri) y se cultivó en la oscuridad. Para la inducción de la embriogénesis, los cultivos de microsporas se sometieron a un tratamiento de estrés *in vitro* de 32 °C durante 15 días. En respuesta al tratamiento inductivo, las microsporas sensibles se dividen y producen estructuras pluricelulares o proembriones, aún confinadas dentro de la pared de la microspora (exina). Se considera que dichas estructuras son el primer signo de inicio de la embriogénesis; estas pueden encontrarse después de 4-6 días en cultivo. Cuando se observaron embriones en forma de globo/corazón (alrededor de 20 días), los cultivos se llevaron a 25 °C en un agitador giratorio a 60 rpm hasta que se observó el desarrollo completo y la maduración de los embriones (Fig. 1), normalmente alrededor de 30 días en cultivo.

**1.2. Embriogénesis de microsporas de *H. vulgare*, mediante cultivo de microsporas aisladas (protocolo sin inhibidores)**

Como plantas donadoras se utilizaron plantas de *H. vulgare* L. cv. Igrí. Las semillas se vernalizaron en el suelo durante un mes a 4 °C y, a continuación, se transfirieron durante un mes a una cámara de crecimiento vegetal a 18 °C para su germinación y crecimiento. Por último, se transfirieron a un invernadero a una temperatura de 18 °C.

Espigas que contenían microsporas en la fase de microspora vacuolada, la fase más sensible de la inducción de la embriogénesis, se recogieron y su superficie se esterilizó mediante inmersión en lejía al 5 % durante 20 minutos, seguido de 4 lavados con agua destilada esterilizada. El cultivo de microsporas aisladas se sedimentó como se ha descrito anteriormente (Rodríguez-Serrano *et al.*, 2012, Journal of Experimental Botany 63(5), 2007-2024). Las espigas esterilizadas se pretrataron a 4 °C durante 21-24 días como tratamiento de estrés para inducir la embriogénesis de microsporas. Las microsporas se aislaron mezclando las espigas en 20 ml de manitol 0,4 M preenfriado a 4 °C, utilizando una batidora Waring preenfriada en una nevera a -20 °C, y el extracto se filtró a través de una malla de nailon de 100 µm en un vaso de precipitados preenfriado a -20 °C. La suspensión de microsporas recogida se transfirió a un tubo de 50 ml y se centrifugó a 800 rpm durante 10 min a 4 °C. Tras eliminar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 4 ml de maltosa 0,55 M preenfriada y se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml. Se añadieron cuidadosamente 1,5 ml de solución de manitol 0,4 M sin mezclar. Después de una centrifugación en gradiente a 800 rpm durante 10 min a 4 °C, la banda interfásica constituida por una población casi pura de microsporas vacuoladas, se resuspendió en una solución de manitol 0,4 M obteniendo un volumen final de 10 ml. Después de contar las células en la cámara de Neubauer, las microsporas sedimentadas se diluyeron en un volumen apropiado de medio KBP para obtener una densidad celular de  $1,1 \times 10^5$  células por ml, y se sembraron en placas de Petri de 30 mm, a un volumen de 1 ml por placa. A continuación, los cultivos de microsporas se incubaron a 25 °C en la oscuridad, y las microsporas se reprogramaron y produjeron estructuras/proembriones multicelulares que pueden encontrarse tras 4-6 días en cultivo, como primer signo de inicio de la embriogénesis. Los proembriones siguieron desarrollándose y produjeron embriones coleoptilares y maduros (Fig. 2), que se observaron al cabo de 30 días.

**1.3. Embriogénesis de microsporas de *Q. suber*, mediante cultivo de anteras (protocolo sin inhibidores)**

Se cortaron y recogieron ramas con varios amentos de árboles de *Q. suber* en el campo (comarca de El Pardo, Madrid, España), durante el periodo de floración (de principios de mayo a principios mediados de junio). Las puntas cortadas de las ramas se cubrieron inmediatamente con algodón húmedo y papel de aluminio, y se llevaron al laboratorio, donde se mantuvieron en la oscuridad a 4 °C durante varios días, hasta su uso para el cultivo *in vitro*. Los amentos seleccionados se separaron de las ramas y se esterilizaron por inmersión en etanol al 70 % durante 30-60 s, al vacío, para facilitar la penetración del disolvente. A continuación, se sumergieron en hipoclorito de sodio al 2 % con Tween-20 al 1 % durante 20 minutos, con agitación magnética. Después de tres lavados en agua destilada esterilizada, los amentos se prepararon para la disección y escisión de las anteras.

El cultivo de anteras y la inducción de la embriogénesis de las microsporas se realizaron como se ha descrito anteriormente (Testillano *et al.* 2018, Forestry Sciences Vol. 84. Springer International Publishing AG. págs. 93-105).

Las anteras que contenían microsporas vacuoladas, la fase más sensible de la inducción de la embriogénesis, se extrajeron cuidadosamente de amentos esterilizados en condiciones asépticas y se sembraron en placas de Petri de 90 mm de diámetro sobre un medio de inducción sólido que contenía macronutrientes del medio de Sommer, micronutrientes y vitaminas de Murashige y Skoog (MS), así como 30 g/l de sacarosa y carbón vegetal activado. Las anteras se colocaron en matrices lineales de 10-12 anteras cada una, con una separación de aproximadamente 5 mm entre cada antera, y hasta 100 anteras por placa de Petri. La embriogénesis se indujo mediante un tratamiento de estrés a 33 °C en la oscuridad durante 5 días. Tras este tratamiento inductivo, los cultivos de anteras se llevaron a 25 °C en la oscuridad. En los siguientes 20-30 días, las anteras sensibles se hinchan y los proembriones y las pequeñas masas proembriogénicas eran visibles como estructuras blancas muy pequeñas que emergían del interior de la antera, rompiendo los tejidos de la pared de la antera. Después de algunos días más, los proembriones y las masas proembriogénicas crecieron y formaron embriones globulares por embriogénesis directa e indirecta a partir de microsporas individuales.

Los embriones y las masas embriogénicas derivadas de microsporas se transfirieron a nuevas placas con un medio de proliferación que tenía una composición similar a la del medio de inducción, salvo que no contenía carbón vegetal activado y estaba suplementado con 0,5 g/l de glutamina. Se mantuvieron a 25 °C en la oscuridad y se subcultivaron cada mes en el mismo medio, donde las masas embriogénicas pueden proliferar y originar espontáneamente nuevos embriones globulares, que después desarrollan embriones en forma de corazón torpedo y cotiledonarios. En medio de proliferación, algunos de estos embriones produjeron nuevos embriones por embriogénesis secundaria y recurrente.

#### 1.4. Embriogénesis somática de *Q. suber*, mediante cultivo de embriones cigóticos inmaduros (protocolo sin inhibidores)

Se recogieron bellotas inmaduras polinizadas de *Q. suber* L. (alcornoque) en el campo (comarca de El Pardo, Madrid, España) durante el periodo de desarrollo del fruto (finales de agosto y septiembre), se llevaron al laboratorio y se conservaron a 4 °C durante una semana antes de iniciar el cultivo *in vitro*. Se seleccionaron bellotas inmaduras en la fase más sensible a la inducción de embriogénesis somática; son las de pequeño tamaño, alrededor de 1 cm de diámetro, y de color verde; contienen embriones cigóticos inmaduros en la fase cotiledonaria temprana.

Los embriones cigóticos inmaduros se extrajeron cuidadosamente de las bellotas diseccionando los tejidos circundantes con ayuda de un bisturí y unas pinzas. Después de la disección, los explantes (embriones cigóticos inmaduros) se esterilizaron por inmersión en etanol al 70 % durante 30 s y en hipoclorito sódico al 2 % durante 20 min, seguido de tres enjuagues en agua destilada esterilizada de 10 min cada uno. Se colocaron cinco explantes por placa.

La embriogénesis somática se indujo como se ha descrito anteriormente (Testillano *et al.* 2018, Plant Cell Culture Protocols, eds. V.M. Loyola-Vargas & N. Ochoa-Alejo. Springer and Bussines Media. págs. 247-256). Los explantes se cultivaron primero en medio de inducción sólido, que contenía macronutrientes Sommer, micronutrientes y vitaminas MS, Glutamina 0,5 mg/l, Sacarosa 30 g/l y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 0 5 mg/l, durante un mes a 25 °C y 16/8 h de luz/oscuridad. Durante este periodo de inducción, la reprogramación celular se produce en algunas células sensibles que iniciaron la vía de la embriogénesis, produciendo pequeñas masas proembriogénicas. A continuación, los explantes se transfirieron a un medio de proliferación sólido, con la misma composición pero sin regulador del crecimiento (sin 2,4-D). Durante las siguientes semanas de cultivo en el medio de proliferación, las masas proembriogénicas proliferaron y sobresalieron de diferentes partes de los explantes; producen nuevas masas embriogénicas y embriones, que a su vez dan lugar a nuevos embriones, que se convirtieron en embriones cotiledonarios totalmente desarrollados, por embriogénesis recurrente y secundaria (Fig. 3).

#### 1.5. Tratamiento con inhibidores de cinasas de mamífero en cultivos de embriogénesis de microsporas de *B. napus* y *H. vulgare* en medios líquidos

Los compuestos se añadieron a los medios de cultivo líquido de microsporas utilizando soluciones madre de 10 mM en DMSO. Se añadieron volúmenes apropiados de soluciones madre de los fármacos a los medios de cultivo para obtener las concentraciones de trabajo seleccionadas de los inhibidores, manteniendo la concentración de DMSO por debajo del 0,2 %.

- En cultivos de microsporas de *B. napus*: 4-bencil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidin-3,5-diona (TDZD8), 5-(2-morfolinetilimin)-2,3-difenil-2,5-dihidro-1,2,4-tiadiazol (VP3.15), 3-acetil-4-(1-metil-1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona (VP3.36), 4-hidroxil-1-etil-N'-palmitoil-2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-carbohidrazida (VP0.7), N-(6-metilbenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida (JZ1.3), N-(6-fluorobenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida, (JZ1.6) y N-(6-bromobenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida (JZ1.24) y (E,Z)-3-(morfolinoimino)indolin-2-ona (IGS4.75) se probaron a 3-4 concentraciones diferentes, que variaban de 0,5 a 5 µM.

- En cultivos de microsporas de *H. vulgare*: se probaron los inhibidores 4-bencil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidin-3,5-diona (TDZD8) y N-(6-bromobenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida (JZ1.24) a las concentraciones seleccionadas (2,5 µM y 5 µM, respectivamente).

Los compuestos se añadieron desde el inicio del cultivo y se evaluó su efecto sobre la eficacia de la embriogénesis. Se mantuvieron varias placas de los mismos cultivos sin los inhibidores, como controles.

**1.6. Evaluación del efecto de inhibidores de cinasas de mamífero sobre la inducción de la embriogénesis *in vitro* en cultivos de microsporas aisladas de *B. napus* y *H. vulgare***

La inducción de la embriogénesis se cuantificó en cultivos de control y tratados mediante el número de proembriones formados (considerado como el primer signo de inicio de la embriogénesis), como se ha descrito anteriormente, y por el número de embriones producidos al cabo de 40 días. Los proembriones se identificaron fácilmente al microscopio invertido en placas de cultivo de 4 días como estructuras multicelulares redondeadas de mayor tamaño y densidad que las microsporas, todavía rodeados por la exina (pared especial de la microspora). Los embriones producidos tras 40 días en cultivo se cuantificaron mediante imágenes captadas con un microscopio estereoscópico. Se recogieron al azar micrografías obtenidas con microscopios invertidos y estereoscópicos de placas de cultivo de microsporas no tratadas y tratadas. El porcentaje medio de proembriones y el número medio de embriones por placa se obtuvieron a partir de tres experimentos independientes por cada tratamiento y sistema *in vitro*. Se contaron un mínimo de 1.000 proembriones para cada tratamiento y especie vegetal. Los resultados sobre los proembriones se expresaron en porcentajes (cambio porcentual) y se refirieron al porcentaje medio de proembriones en los cultivos de control, que se ha normalizado al 100 %.

Para evaluar si las estructuras proembrionarias de los cultivos tratados, identificados al microscopio invertido para su cuantificación, eran en realidad microsporas en división, similares a las mismas estructuras en los cultivos de control, se realizó una técnica de tinción sencilla para visualizar los núcleos en el interior de los proembriones. Muestras de cultivos de control y tratados durante 4 días, que contenían proembriones, se tiñeron con 10 µg/ml de diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Se analizaron preparaciones de calabaza mediante microscopía de fluorescencia con excitación UV para observar los núcleos.

**1.7. Evaluación de la calidad/capacidad germinativa de los embriones producidos tras el tratamiento con inhibidores de cinasas de mamífero**

Para evaluar la calidad de los embriones producidos en cultivos de embriogénesis de microsporas en presencia de los inhibidores de cinasas de mamífero, se realizaron ensayos de germinación de embriones. Se utilizaron embriones cotiledonarios de microsporas de *B. napus* procedentes de cultivos de control y tratados para la germinación de embriones *in vitro* y su conversión en plántulas como se ha descrito anteriormente (Prem *et al.*, 2012, BMC Plant Biology 12, 127). Los embriones de dicotiledóneas de 34 - 40 de edad, tras desecarlos al aire sobre papel de filtro estéril, germinaron en medio MS que contenía sacarosa al 2 % (p/v) y gelificaron con agar bacteriológico 7 g/l (p/v). Los embriones derivados de microsporas se incubaron durante 15 - 20 días a 18 °C en condiciones de oscuridad hasta la activación de la radícula y la plúmula, y se cuantificaron en términos de porcentaje de embriones que mostraban un crecimiento normal, similar al de la germinación del embrión cigótico.

**1.8. Tratamientos con inhibidores de cinasas en cultivos de embriogénesis de microsporas y somática de *Q. suber* en medios sólidos**

Dado que los sistemas *in vitro* de *Q. suber* eran procesos de dos etapas en medios de cultivo sólidos, se aplicó una estrategia diferente a la de los cultivos líquidos de microsporas para los tratamientos con los inhibidores de cinasas de mamífero. Durante la embriogénesis *in vitro* de *Q. suber*, después de la incubación en medio de inducción, la transferencia de explantes al medio proliferante implica la multiplicación de masas proembriogénicas, inicio de la embriogénesis, por embriogénesis recurrente y secundaria, y desarrollo embrionario. Por lo tanto, los tratamientos con los inhibidores de cinasas de mamífero se realizaron durante los primeros 15-30 días en medios proliferantes, y posteriormente, los explantes con embriones emergentes se transfirieron a medios proliferantes recientes sin el inhibidor.

Dado que los medios sólidos implican mucha menos difusión y disponibilidad de compuestos para las células en comparación con los medios líquidos, como se refiere en otros sistemas *in vitro*, la concentración de los inhibidores de cinasas de mamífero utilizados en medios sólidos era unas 10 veces mayor que en medios líquidos, en el intervalo de 25 a 100 µm. Se añadieron volúmenes apropiados de soluciones madre de 10 mM en DMSO de los compuestos seleccionados a los medios enfriados, antes de su gelificación, manteniendo la concentración de DMSO por debajo del 0,2 %. Se mantuvieron como controles placas paralelas simuladas de los mismos cultivos.

**1.9. Evaluación del efecto de inhibidores sobre la inducción de la embriogénesis *in vitro* en cultivos de embriogénesis de microsporas y somática de *Q. suber***

La eficacia de la inducción de la embriogénesis se cuantificó en los cultivos de control y tratados mediante el número de embriones cotiledonarios producidos a los 15-30 días de tratamiento (medio de cultivo que contenía el inhibidor) seguidos de 30 días de recuperación (medio de cultivo sin inhibidor). La producción de embriones se calculó como el número de embriones cotiledonarios originados por gramo de masa embriogénica al inicio del cultivo.

## Resultados

### 1.1. Efecto de inhibidores de cinasas sobre cultivos de embriogénesis de microsporas de *B. napus*

5 Para evaluar el efecto de los inhibidores de cinasas sobre la inducción de la embriogénesis *in vitro*, primero los probamos en la embriogénesis de microsporas de *B. napus*, como plataforma modelo para comprobar los inhibidores de cinasas de mamífero y diferentes concentraciones. Después de estos análisis, se probó un inhibidor de cinasas de mamífero seleccionado de cada categoría en otras dos especies vegetales, *H. vulgare* y *Q. suber*, con diferentes sistemas *in vitro*. La eficacia de la inducción de la embriogénesis se evaluó en cultivos de control y en cultivos tratados con los inhibidores de cinasas de mamífero, a diferentes concentraciones. Los resultados de las pruebas con los inhibidores de GSK3 $\beta$  y de LRRK2 se muestran como el porcentaje de proembriones (primer signo de inicio de la embriogénesis) en las Figs. 4 y 5, respectivamente.

15 La presencia de los inhibidores en los medios de cultivo afectó a la producción de proembriones en comparación con los cultivos de control, siendo la proporción de proembriones diferente en función de la concentración utilizada. Cuatro inhibidores de GSK3 $\beta$ , TDZD8; VP3.15, VP3.36, VP0.7, se probaron a 3-4 concentraciones en el intervalo de 0,1  $\mu$ M a 5  $\mu$ M. Los resultados de la cuantificación de los proembriones producidos, como primer signo de inicio de la embriogénesis, en los cultivos de control y tratados, mostraron que todos los inhibidores, al menos con una o dos de las concentraciones utilizadas, condujeron a un aumento de la producción de proembriones (Figs. 4 y 5). Las concentraciones y los compuestos que proporcionaron una mejora del rendimiento al inicio de la embriogénesis fueron las siguientes: inhibidores de GSK3 $\beta$ , TDZD-8 0,5  $\mu$ M y 1  $\mu$ M, VP3.15 2,5  $\mu$ M, VP3.36 2,5  $\mu$ M y VP0.7 5  $\mu$ M (Fig. 4); inhibidores de LRRK2, JZ1.24 2,5  $\mu$ M, JZ1.3 5  $\mu$ M, IGS4.75 5  $\mu$ M y JZ1.6 1  $\mu$ M (Fig. 5). Con las demás concentraciones, los cultivos tratados mostraron una proporción de proembriones similar o ligeramente superior a la de los cultivos de control (Figs. 4 y 5), mientras que no mostraron ningún efecto nocivo/tóxico.

25 Los resultados mostraron que el aumento de la eficacia de inducción de la embriogénesis proporcionado por el uso de los inhibidores, estaba en el intervalo de 20-25 % en el caso de los inhibidores de GSK3 $\beta$  y de 23-30 % en el de los inhibidores de LRRK2.

30 Para confirmar que los proembriones cuantificados en los cultivos tratados eran microsporas multicelulares que habían iniciado la embriogénesis, las preparaciones de calabaza de los cultivos de control y tratados a los 4 días se tiñeron con DAPI y se observaron mediante microscopía de fluorescencia. Los resultados mostraron que los proembriones de los cultivos tratados contenían varios núcleos (Fig. 6), al igual que en los cultivos de control, lo que indica que en realidad eran microsporas en división que probablemente iniciaron la embriogénesis.

35 Teniendo en cuenta estos resultados en *B. napus*, los compuestos que se seleccionaron para probar en otros sistemas de embriogénesis *in vitro* fueron:

- 40 - 4-bencil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidin-3,5-diona (TDZD.8) como inhibidor de GSK3 $\beta$  y
- N-(6-bromobenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida (JZ1.24) como inhibidor de LRRK2.

45 Como se muestra en la Fig. 7, los compuestos seleccionados, TDZD.8, el inhibidor de GSK3 $\beta$ , y JZ1.24, el inhibidor de LRRK2, mostraron un aumento de eficacia en la embriogénesis, es decir, un aumento en el porcentaje de proembriones que fue un aumento del 20 % en el caso de TDZD.8 a 0,5  $\mu$ M y del 27,5 % en el caso de JZ1.24 a 2,5  $\mu$ M en cultivos de microsporas de *B. napus* (Fig. 7).

50 La calidad de los embriones producidos en cultivos de microsporas tratados con los inhibidores mencionados se evaluó con ensayos de germinación. Embriones cotiledonarios totalmente desarrollados de cultivos de control y tratados, producidos al cabo de 30 días, se desecaron y se cultivaron en condiciones de germinación. Los resultados mostraron que los embriones de los cultivos tratados germinaron muy bien, produciendo raíces e hipocótilo, de forma similar y en la misma proporción que los embriones de los cultivos de control (Fig. 8).

### 1.2. Efecto de los inhibidores de cinasas sobre cultivos de embriogénesis de microsporas de *H. vulgare*

55 Los inhibidores seleccionados, TDZ.8 y JZ1.24 se probaron en cultivos de embriogénesis de microsporas de un cultivo diferente, *H. vulgare*. Los inhibidores se aplicaron primero a las mismas concentraciones que proporcionaron los mejores resultados en *B. napus*, TDZD8 a 0,5  $\mu$ M y JZ1.24 a 2,5  $\mu$ M, pero los resultados obtenidos (porcentaje de proembriones) en los cultivos tratados con *H. vulgare* utilizando estas concentraciones fueron similares a los de los cultivos de control. Por lo tanto, probaron dos concentraciones ligeramente superiores de ambos inhibidores (1  $\mu$ M y 2,5  $\mu$ M para TDZD8; y 2,5  $\mu$ M y 5  $\mu$ M para JZ1.24). Los resultados mostraron que los dos inhibidores condujeron un aumento del inicio de la embriogénesis en *H. vulgare*, cuando se utilizan a concentraciones ligeramente diferentes que en *B. napus*, TDZD8 a 2,5  $\mu$ M (Tocris) y JZ1.24 a 5  $\mu$ M. Esto indica que las concentraciones óptimas de estos inhibidores podrían diferir entre especies, probablemente debido a diferencias en cuanto a las propiedades de la pared y la permeabilidad celular y a las características específicas de cada planta y sistema *in vitro*. La cuantificación de los proembriones formados a los 4 días mostró que los tratamientos con los dos inhibidores a las concentraciones seleccionadas mejoraron la eficacia de la inducción de la embriogénesis en *H. vulgare*, siendo el aumento en la

formación de proembriones del 27 % en el caso de cultivos tratados con TDZD8 a 2,5  $\mu\text{M}$  y del 47 % en el caso de cultivos tratados con JZ1.24 a 5  $\mu\text{M}$  (Fig. 9).

5 Los cultivos tratados y no tratados siguieron desarrollándose y se cuantificó el número total de embriones producidos por placa a los 40 días. Los cultivos de microsporas tratados con estos inhibidores produjeron más embriones que los cultivos de control, siendo el aumento del 22 % para JZ1.24 y del 15 % para TDZD8 (Fig. 10).

10 Los resultados indicaron que los inhibidores de GSK3 $\beta$  y LRRK2 de mamífero, de molécula pequeña, produjeron un efecto promotor similar en los cultivos de microsporas de *H. vulgare* que en los de *B. napus*, un aumento de la eficacia de la inducción de la embriogénesis *in vitro*.

### 1.3. Efecto de inhibidores de cinasas sobre cultivos de embriogénesis de microsporas y somática de *Q. suber*

15 Para evaluar la posibilidad de ampliar los hallazgos de *B. napus* y *H. vulgare* a especies y procesos más distantes, los inhibidores seleccionados, TDZD.8 y JZ1.24, se aplicaron a una especie leñosa forestal *Q. suber*, en la que se establecieron dos sistemas diferentes de embriogénesis *in vitro*, embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos inmaduros y embriogénesis de microsporas, dos sistemas de cultivo que consistían en cultivos de dos etapas en medios sólidos.

20 Los tratamientos con inhibidores se aplicaron a concentraciones 10 veces superiores a las de los medios líquidos, debido a la menor difusión y disponibilidad de los compuestos en medio gelificado. La evaluación de los efectos de los compuestos sobre la eficacia de la embriogénesis en los dos sistemas, se evaluó cuantificando los embriones producidos en los cultivos de control y tratados. Los resultados mostraron que los tratamientos con los dos tipos de inhibidores aumentaron la eficacia de la inducción de la embriogénesis y condujeron a una mayor producción de  
25 embriones, en la embriogénesis somática a partir de cultivos de embriones cigóticos inmaduros (Fig. 11), así como en la embriogénesis de microsporas a partir de cultivos de anteras (Fig. 12).

30 Los resultados indicaron que también en una especie leñosa y en diferentes sistemas de embriogénesis *in vitro*, con medios de cultivo sólidos, los inhibidores GSK3 $\beta$  y LRRK2 de mamífero, de molécula pequeña, produjeron el mismo efecto que en los sistemas de colza y cebada en medios líquidos, un aumento de la eficacia de la inducción de la embriogénesis *in vitro*.

### Conclusiones

35 La presente invención aborda un importante reto de las técnicas de propagación de plantas *in vitro*, que es mejorar la eficacia de la inducción de la embriogénesis para la producción rápida de un gran número de material de siembra de alta calidad, libre de enfermedades y uniforme para las empresas agroindustriales, reduciendo tiempo y costes, en muchas especies de interés económico. La nueva estrategia descrita en la presente invención, utiliza por primera vez sistemas *in vitro* de plantas con inhibidores de proteínas cinasas de mamífero, específicamente inhibidores de las  
40 familias GSK3 $\beta$  y LRRK2, que han demostrado capacidad para aumentar la inducción de la embriogénesis y el rendimiento de la producción de embriones en tres especies de cultivo y forestales diferentes. Asimismo, los tratamientos con estos inhibidores se han aplicado satisfactoriamente en diferentes protocolos *in vitro*, en medios líquidos o sólidos, y con embriogénesis directa, indirecta y secundaria/recurrente, proporcionando efectos promotores similares sobre la embriogénesis. Varios inhibidores de cada grupo, con diferente estructura molecular, han  
45 demostrado ser capaces de mejorar la eficacia de la embriogénesis, dando un apoyo adicional al uso de este tipo de moléculas pequeñas como nuevas herramientas para optimizar los protocolos de embriogénesis de las plantas *in vitro*.

### 2. Síntesis y caracterización de los inhibidores de la presente invención.

50 La 4-bencil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidin-3,5-diona (TDZD8) se desvela en Martínez A *et al.* (Martínez A *et al.* J Med Chem. 2002; 45(6):1292-9).

El 5-(2-morfolinetilimin)-2,3-difenil-2,5-dihidro-1,2,4-tiadiazol (VP3.15), se desvela en el documento EP2484670A1.

55 La 3-acetil-4-(1-metil-1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona (VP3.36) se desvela en Perez DI *et al.* (Perez DI *et al.* J Med Chem. 2011; 54(12):4042-56).

La 4-hidroxi-1-etil-N'-palmitoyl-2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-carbohidrazida (VP0.7) se desvela en Palomo V *et al.* (Palomo V *et al.* J Med Chem. 201; 60(12):4983-5001).

60 **N-(benzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida:** 276,0 mg de ácido 4-morfolinobenzoico (1,3 mmol), 331,00 mg de EDCI (1,4 mmol), 24,4 mg de DMAP (0,3 mmol) y 335  $\mu\text{l}$  (2,4 mmol) de trietilamina, se disolvieron en diclorometano. Después de agitar durante 1 hora a temperatura ambiente, se añadieron 200 mg de 2-aminobenzotiazol (1,3 mmol).  
65 La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante la noche. Transcurrido este tiempo, el crudo se lavó con soluciones saturadas de NaHCO<sub>3</sub> y NaCl, respectivamente. A continuación, la fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, el disolvente se evaporó a baja presión y se purificó por cromatografía en una columna rápida

usando una mezcla de eluyentes de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (20:1) para obtener un sólido de color amarillo (72 mg, 16 %). Pureza por HPLC > 95 %. MS: m/z 340 [M + 1]<sup>+</sup>. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10,21 (s, 1 H, NH), 7,90 (d, J = 9,0 Hz, 2 H), 7,84 (dd, J = 8,5, 1,5 Hz, 1 H), 7,62 (dd, J = 8,3, 1,2 Hz, 1 H), 7,44 - 7,35 (m, 1 H), 7,35 - 7,27 (m, 1 H), 4,01 - 3,71 (m, 4 H), 3,49 - 3,16 (m, 4 H). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 164,6, 159,1, 154,3, 148,2, 132,2, 129,4, 126,0, 123,7, 121,3, 121,1, 120,7, 113,8, 66,5, 47,4.

**N-(6-metoxibenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida:** 230,0 mg de ácido 4-morfolinobenzoico (1,1 mmol), 276,6 mg de EDCI (1,4 mmol), 24,43 mg de DMAP (0,2 mmol) y 248 µl (1,7 mmol) de trietilamina, se disolvieron en diclorometano. Después de agitar durante 1 hora a temperatura ambiente, se añadieron 200 mg de 2-amino-6-metoxibenzotiazol (1,1 mmol). La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante la noche. Transcurrido este tiempo, el crudo se lavó con soluciones saturadas de NaHCO<sub>3</sub> y NaCl, respectivamente. A continuación, la fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, el disolvente se evaporó a baja presión y se purificó por cromatografía en una columna rápida usando una mezcla de eluyentes de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (50:1) para obtener un sólido de color amarillo (36 mg, 9 %). P.f.: 237,6-240,0 °C. Pureza por HPLC: 95 %. MS: m/z 370 [M+H]<sup>+</sup>. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,47 (s, 1H), 7,88 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,64 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,33 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 7,04 (dd, J = 8,8, 2,6 Hz, 1H), 6,94 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 3,93-3,83 (m, 7H), 3,36-3,31 (m, 4H). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 164,8, 156,9, 156,0, 153,8, 142,7, 132,8, 129,8, 120,8, 120,5, 114,80, 113,1, 104,6, 65,8, 55,6, 46,8.

**N-(6-trifluorometilbenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida:** 189,9 mg de ácido 4-morfolinobenzoico (0,9 mmol), 228,53 mg de EDCI (1,2 mmol), 22,41 mg de DMAP (0,2 mmol) y 223 µl (1,5 mmol) de trietilamina, se disolvieron en diclorometano. Después de agitar durante 1 hora a temperatura ambiente, se añadieron 200 mg de 2-amino-6-trifluorobenzotiazol (0,9 mmol). La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante la noche. Transcurrido este tiempo, el crudo se lavó con soluciones saturadas de NaHCO<sub>3</sub> y NaCl, respectivamente. A continuación, la fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, el disolvente se evaporó a baja presión y se purificó por cromatografía en columna rápida automática (Biotage®Isolera One) usando una mezcla de eluyentes de hexano/AcOEt para obtener un sólido de color amarillo (79 mg, 26 %). P.f.: 218,5-218,5 °C. Pureza por HPLC: 95 %. MS: m/z 408 [M+H]<sup>+</sup>. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10,85 (s, 1H), 8,13 (s, 1H), 7,89 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 7,57-7,53 (m, 2H), 6,84 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 3,87-3,83 (m, 4H), 3,31-3,26 (m, 4H). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163,8, 160,8, 153,4, 149,4, 131,2, 128,5, 124,9 (d, J = 32,5 Hz), 124,3, 122,1 (d, J = 3,4 Hz), 119,6 (d, J = 32,2 Hz), 118,0 (d, J = 4,2 Hz), 112,7, 65,4, 46,3, 28,6. C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S. C teórico (%), 56,01; H, 3,96; N, 10,31; S, 7,87. C encontrado (%), 56,13; H, 3,98; N, 10,38; S, 7,59.

**N-(6-metilbenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida (JZ1.3):** 252,4 mg de ácido 4-morfolinobenzoico (1,2 mmol), 303,5 mg de EDCI (1,58 mmol), 20,06 mg de DMAP (0,2 mmol) y 272 µl (1,9 mmol) de trietilamina, se disolvieron en diclorometano. Después de agitar durante 1 hora a temperatura ambiente, se añadieron 200 mg de 2-amino-6-metilbenzotiazol (1,2 mmol). La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante la noche. Transcurrido este tiempo, el crudo se lavó con soluciones de HCl (0,1 M), NaHCO<sub>3</sub> saturado y NaCl saturado, respectivamente. A continuación, la fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, el disolvente se evaporó a baja presión y se purificó por cromatografía en columna rápida automática (Biotage®Isolera One) usando una mezcla de eluyentes de hexano/AcOEt para obtener un sólido de color amarillo (43 mg, 10 %). P.f.: 287,7-288,8 °C. MS (ESI<sup>+</sup>): m/z 354 [M+H]<sup>+</sup>. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10,56 (s, 1H), 7,89 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 7,63 (s, 1H), 7,42 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 7,16 (dd, J = 8,3, 1,7 Hz, 1H), 6,85 (d, J = 8,9 Hz, 1H), 3,87-3,83 (m, 4H), 3,29-3,26 (m, 4H), 2,46 (s, 3H). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 164,7, 158,5, 154,2, 146,1, 133,7, 132,3, 129,4, 127,5, 121,3, 121,1, 120,3, 113,8, 66,5, 47,5, 21,4. C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S. C teórico (%), 64,57; H, 5,42; N, 11,89; S, 9,07. C encontrado (%), 64,33; H, 5,38; N, 11,85; S, 8,96.

**N-(6-clorobenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida:** 224,4 mg de ácido 4-morfolinobenzoico (1,1 mmol), 269,89 mg de EDCI (1,4 mmol), 26,4 mg de DMAP (0,2 mmol) y 242 µl (1,7 mmol) de trietilamina, se disolvieron en diclorometano. Después de agitar durante 1 hora a temperatura ambiente, se añadieron 200 mg de 2-amino-6-clorobenzotiazol (1,1 mmol). La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante la noche. Transcurrido este tiempo, el crudo se lavó con soluciones de HCl (0,1 M), NaHCO<sub>3</sub> saturado y NaCl saturado, respectivamente. A continuación, la fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, el disolvente se evaporó a baja presión y se purificó por cromatografía en columna rápida automática (Biotage®Isolera One) usando una mezcla de eluyentes de hexano/AcOEt para obtener un sólido de color blanco (96 mg, 24 %). P.f.: 245,4-246,4 °C. Pureza por HPLC: 97 %. MS: m/z 374 [M+H]<sup>+</sup>. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10,25 (s, 1H), 7,89 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 7,81 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 7,52 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,33 (dd, J = 8,7, 2,1 Hz, 1H), 6,89 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 3,92-3,82 (m, 4H), 3,33-3,30 (m, 4H). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 164,5, 159,3, 154,4, 146,8, 139,7, 133,5, 129,4, 126,7, 121,5, 121,0, 120,8, 113,7, 66,5, 47,4. C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S. C teórico (%), 57,83; H, 4,31; N, 11,24; S, 8,58. C encontrado (%), 57,56; H, 4,09; N, 11,43; S, 8,40.

**N-(6-fluorobenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida (JZ1.6):** 168,20 mg de ácido 4-morfolinobenzoico (1,2 mmol), 296,3 mg de EDCI (1,5 mmol), 29,05 mg de DMAP (0,2 mmol) y 265 µl (1,9 mmol) de trietilamina, se disolvieron en diclorometano. Después de agitar durante 1 hora a temperatura ambiente, se añadieron 200 mg de 2-amino-6-fluorobenzotiazol (1,2 mmol). La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante la noche. Transcurrido este tiempo, el crudo se lavó con soluciones de HCl (0,1 M), NaHCO<sub>3</sub> saturado y NaCl saturado, respectivamente. A continuación, la fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, el disolvente se evaporó a baja presión y se purificó por cromatografía en columna rápida automática (Biotage®Isolera One) usando una mezcla de eluyentes de hexano/AcOEt para obtener un sólido de color blanco (79 mg, 19 %). P.f.: 228,3-229,3 °C. Pureza por HPLC: 98 %.

MS: m/z 358 [M+H]<sup>+</sup>. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,96 (s, 1H), 7,81 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 7,74 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 7,49 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 7,28 (dd, J = 8,7, 2,1 Hz, 1H), 6,84 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 3,87-3,85 (m, 4H), 3,34-3,30 (m, 4H). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 164,4, 159,2, 154,4, 147,0, 138,7, 133,6, 129,3, 126,8, 121,6, 121,0, 120,8, 113,8, 66,5, 47,4. C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S: C teórico (%), 60,49; H, 4,51; N, 11,76; S, 8,97. C encontrado (%), 60,68; H, 4,50; N, 11,55; S, 8,72.

5 **N-(6-etoxibenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida:** 213,1 mg de ácido 4-morfolinobenzoico (1,0 mmol), 256,2 mg de EDCl (1,3 mmol), 25,12 mg de DMAP (0,2 mmol), se disolvieron en diclorometano. Después de agitar durante 6 horas a temperatura ambiente, se añadieron 200 mg de 2-amino-6-etoxibenzotiazol (1,0 mmol) y 229 µl de trietilamina (1,9 mmol). La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante la noche. Transcurrido este tiempo, el  
10 crudo se lavó con soluciones de HCl (0,1 M), NaHCO<sub>3</sub> saturado y NaCl saturado, respectivamente. A continuación, la fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, el disolvente se evaporó a baja presión y se purificó por cromatografía en columna rápida automática (Biotage® Isolera One) usando una mezcla de eluyentes de hexano/AcOEt para obtener un sólido de color amarillo (20 mg, 5 %). P.f.: 222,8-223,8 °C. Pureza por HPLC: 95 %. MS: m/z 384 [M+H]<sup>+</sup>. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,07 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,54 (d, J = 8,9 Hz, 1H), 7,35-7,18 (m, 1H), 7,04 (dd, J = 8,9, 2,4 Hz, 1H), 6,89 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 4,07 (q, J = 6,9 Hz, 2H), 3,89-3,69 (m, 4H), 3,38-3,25 (m, 4H), 1,43 (t, J = 6,9 Hz, 3H). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 164,4, 157,1, 156,0, 154,2, 142,3, 133,3, 129,3, 121,3, 121,2, 119,7, 115,5, 114,2, 113,8, 106,0, 104,9, 99,5, 66,5, 64,1, 64,1, 47,5, 14,8.

20 **N-(6-bromobenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida (JZ1.24):** 180,9 mg de ácido 4-morfolinobenzoico (0,9 mmol), 217,6 mg de EDCl (1,1 mmol), 21,33 mg de DMAP (0,2 mmol), se disolvieron en diclorometano. Después de agitar durante 6 horas a temperatura ambiente, se añadieron 200 mg de 2-amino-6-bromobenzotiazol (0,9 mmol) y 195 µl de trietilamina (1,4 mmol). La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante la noche. Transcurrido este tiempo, el crudo se lavó con soluciones de HCl (0,1 M), NaHCO<sub>3</sub> saturado y NaCl saturado, respectivamente. A  
25 continuación, la fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, el disolvente se evaporó a baja presión y se purificó por cromatografía en columna rápida automática (Biotage® Isolera One) usando una mezcla de eluyentes de hexano/AcOEt para obtener un sólido de color amarillo (41 mg, 11 %). P.f.: 237,5-238,5 °C. Pureza por HPLC: 98 %. MS: m/z 418 [M+H]<sup>+</sup>. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10,51 (s, 1H), 7,96 (s, 1H), 7,87 (d, J = 9,0 Hz, 3H), 7,44 (dd, J = 8,6, 1,9 Hz, 2H), 7,38 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 6,86 (d, J = 9,0 Hz, 3H), 3,89-3,83 (m, 11H), 3,33-3,26 (m, 11H). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 165,2, 160,4, 154,8, 147,1, 134,1, 130,0, 129,9, 124,3, 122,1, 121,1, 117,2, 114,1, 66,9,  
30 47,8.

**N-(6-propoxibenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida:** 248,8 mg de ácido 4-morfolinobenzoico (1,2 mmol), 299,00 mg de EDCl (1,6 mmol), 29,3 mg de DMAP (0,2 mmol), se disolvieron en diclorometano. Después de agitar durante 6 horas a temperatura ambiente, se añadieron 250 mg de 2-amino-6-propoxibenzotiazol (1,2 mmol) y 267,6 µl  
35 (1,9 mmol) de trietilamina. La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante la noche. Transcurrido este tiempo, el crudo se lavó con una solución de HCl (0,1 M). A continuación, la fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, el disolvente se evaporó a baja presión y se purificó por cromatografía en una columna rápida usando una mezcla de eluyentes de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (50:1) para obtener un sólido de color amarillo (127 mg, 27 %). Pureza por HPLC > 95 %. MS: m/z 398 [M+H]<sup>+</sup>. RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,88 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,46 (d, J = 8,9 Hz, 1H), 7,31 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 6,96 (dd, J = 8,9, 2,5 Hz, 1H), 6,88 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 3,98 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 3,89 - 3,83 (m, 4H), 3,32 - 3,27 (m, 4H), 1,85 (h, J = 7,3 Hz, 2H), 1,06 (t, J = 7,4 Hz, 2H). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163,6, 156,3, 155,2, 153,3, 141,27, 132,2, 128,4, 120,4, 120,3, 114,5, 112,8, 103,9, 69,2, 65,5, 46,5, 21,6, 9,5. C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S. C teórico (%), 63,46; H, 5,83; N, 10,57; S, 8,07. C encontrado (%), 63,73; H, 5,74, N, 10,09; S, 7,71.

45 **N-(6-isopropilbenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida:** 269,4 mg de ácido 4-morfolinobenzoico (1,3 mmol), 324,00 mg de EDCl (1,7 mmol), 32,00 mg de DMAP (0,3 mmol), se disolvieron en diclorometano. Después de agitar durante 6 horas a temperatura ambiente, se añadieron 250 mg de 2-amino-6-isopropilbenzotiazol (1,3 mmol) y 290,0 µl  
50 (2,1 mmol) de trietilamina. La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante la noche. Transcurrido este tiempo, el crudo se lavó con una solución de HCl (0,1 M). A continuación, la fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, el disolvente se evaporó a baja presión y se purificó por cromatografía en una columna rápida usando una mezcla de eluyentes de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (50:1) para obtener un sólido de color amarillo (218,4 mg, 44 %). Pureza por HPLC > 95 %. MS: m/z 382 [M+H]<sup>+</sup>. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10,35 (s, 1H), 7,89 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,68 (d, J = 1,7 Hz, 1H), 7,49 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,26-7,22 (m, 1H), 6,88 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 3,89-3,81 (m, 4H), 3,33-3,25 (m, 4H), 3,03 (p, J = 6,9 Hz, 1H), 1,31 (d, J = 6,9 Hz, 6H). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163,7, 157,7, 153,2, 145,3, 143,9, 131,3, 128,4, 124,0, 120,4, 119,4, 119,1, 117,5, 112,8, 65,5, 46,5, 33,2, 23,3. C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S: C teórico (%), 66,12; H, 6,08; N, 11,00; S, 8,40. C encontrado (%), 66,09; H, 6,13; N, 10,69; S, 8,54.

El inhibidor de fórmula (E,Z)-3-(morfolinoimino)indolin-2-ona (IGS4.75): se desvela en Salado IG. *et al.*, (Salado IG. *et al.*, Eur J Med Chem. 29 de sep. de 2017: 138:328-342).

REIVINDICACIONES

1. Uso de al menos un inhibidor de cinasas de mamífero para mejorar la inducción de la embriogénesis de las plantas *in vitro*, en donde el inhibidor de cinasas de mamífero se selecciona de una lista que consiste en:
- 5 4-bencil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidin-3,5-diona (TDZD8),  
5-(2-morfolinetilimin)-2,3-difenil-2,5-dihidro-1,2,4-tiadiazol (VP3.15),  
3-acetil-4-(1-metil-1H-indol-3-il)-1 H-pirrol-2,5-diona (VP3.36),  
4-hidroxi-1-etil-N'-palmitoil-2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-carbohidrazida (VP0.7),
- 10 N-(6-metilbenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida (JZ1.3),  
N-(6-fluorobenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida, (JZ1.6),  
N-(6-bromobenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida (JZ1.24), y  
(E,Z)-3-(morfolinoimino)indolin-2-ona (IGS4.75).
- 15 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las cinasas de mamífero son cinasas de ser humano, preferentemente las cinasas GSK3β y/o LRRK2.
3. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la cinasa GSK3β comprende la secuencia seleccionada de la lista que consiste en la SEQ ID NO: 1 a 4, y la cinasa LRRK2 comprende la secuencia seleccionada de la lista que consiste en la SEQ ID NO: 5 a 7.
- 20 4. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la embriogénesis es somática y/o por microsporas.
- 25 5. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las plantas son plantas de cultivo, preferentemente de *Brassica spp.* y/o de *Hordeum spp.*, o en donde las plantas son plantas forestales, preferentemente de *Quercus spp.*
- 30 6. Método para inducir la embriogénesis de las plantas *in vitro*, que comprende:
- a. cultivar las microsporas y/o los explantes en un medio de cultivo adecuado para el desarrollo embrionario; y  
b. añadir inhibidores de cinasas de mamífero al medio de cultivo de a); y  
c. cultivar durante un periodo suficiente para obtener embriones,
- 35 en donde el inhibidor de cinasas de mamífero se selecciona de una lista que consiste en:
- 4-bencil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidin-3,5-diona (TDZD8),  
5-(2-morfolinetilimin)-2,3-difenil-2,5-dihidro-1,2,4-tiadiazol (VP3.15),  
3-acetil-4-(1-metil-1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona (VP3.36),
- 40 4-hidroxi-1-etil-N'-palmitoil-2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-carbohidrazida (VP0.7),  
N-(6-metilbenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida (JZ1.3),  
N-(6-fluorobenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida, (JZ1.6),  
N-(6-bromobenzotiazol-2-il)-4-morfolinobenzamida (JZ1.24) y  
(E,Z)-3-(morfolinoimino)indolin-2-ona (IGS4.75).
- 45 7. Método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde las cinasas de mamífero son cinasas de ser humano, preferentemente GSK3β y/o LRRK2.
8. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, en donde la cinasa GSK3β comprende la secuencia seleccionada de la lista que consiste en la SEQ ID NO: 1 a 4, y la cinasa LRRK2 comprende la secuencia seleccionada de la lista que consiste en la SEQ ID NO: 5 a 7.
- 50 9. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde la embriogénesis es somática y/o por microsporas.
- 55 10. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en donde las plantas son plantas de cultivo, preferentemente de *Brassica spp.* y/o de *Hordeum spp.*, o en donde las plantas son plantas forestales, preferentemente de *Quercus spp.*
- 60 11. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en donde la concentración del inhibidor de cinasas de mamífero varía de 0,5 μM a 100 μM.

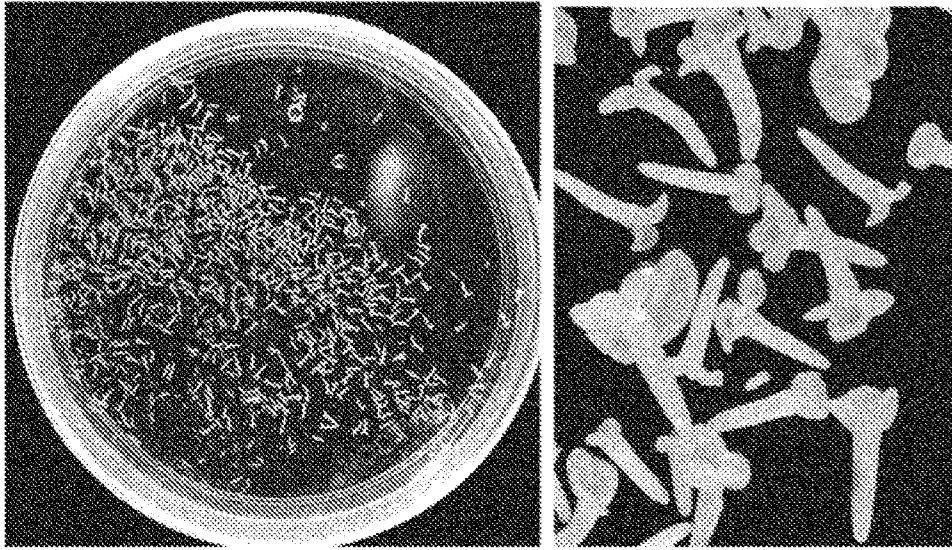


Fig. 1

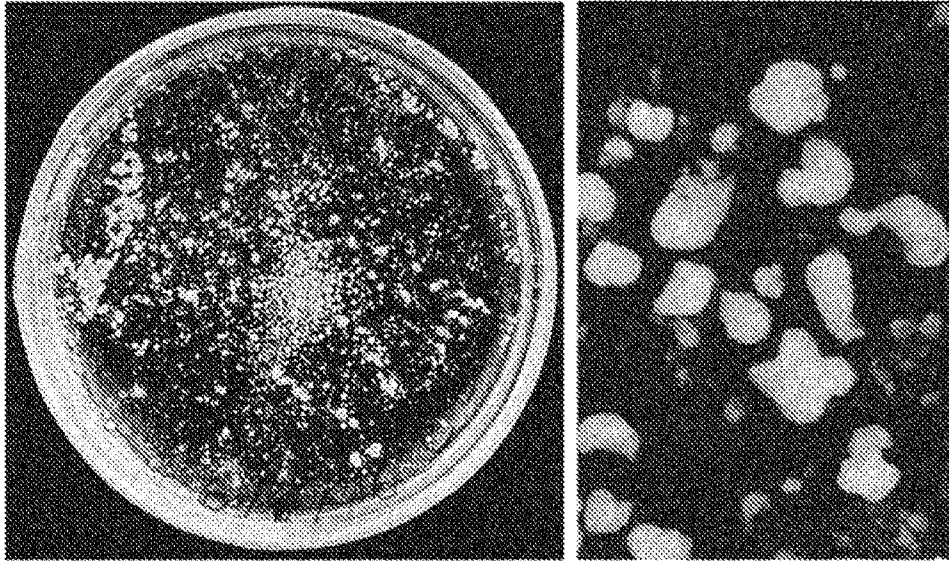


Fig. 2

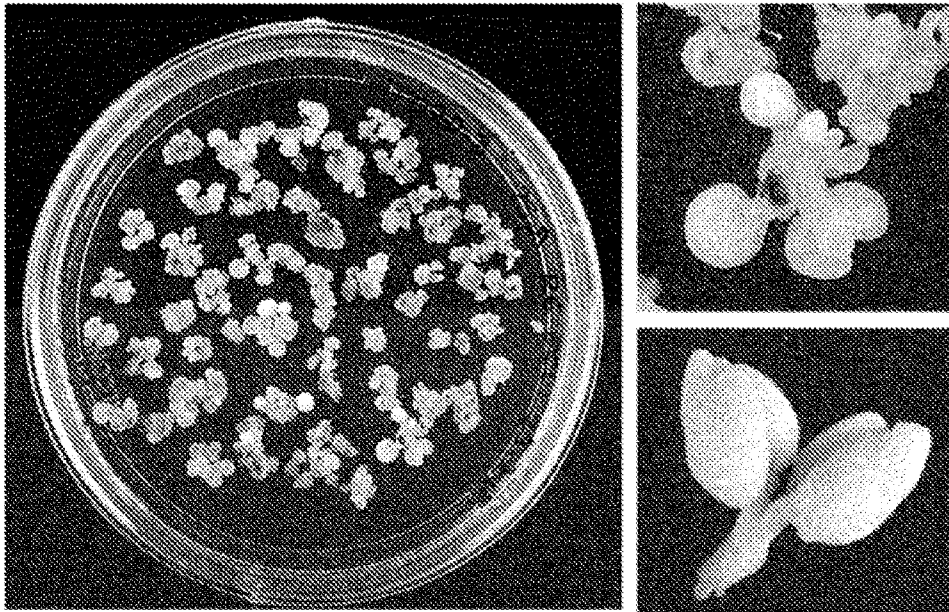


Fig. 3

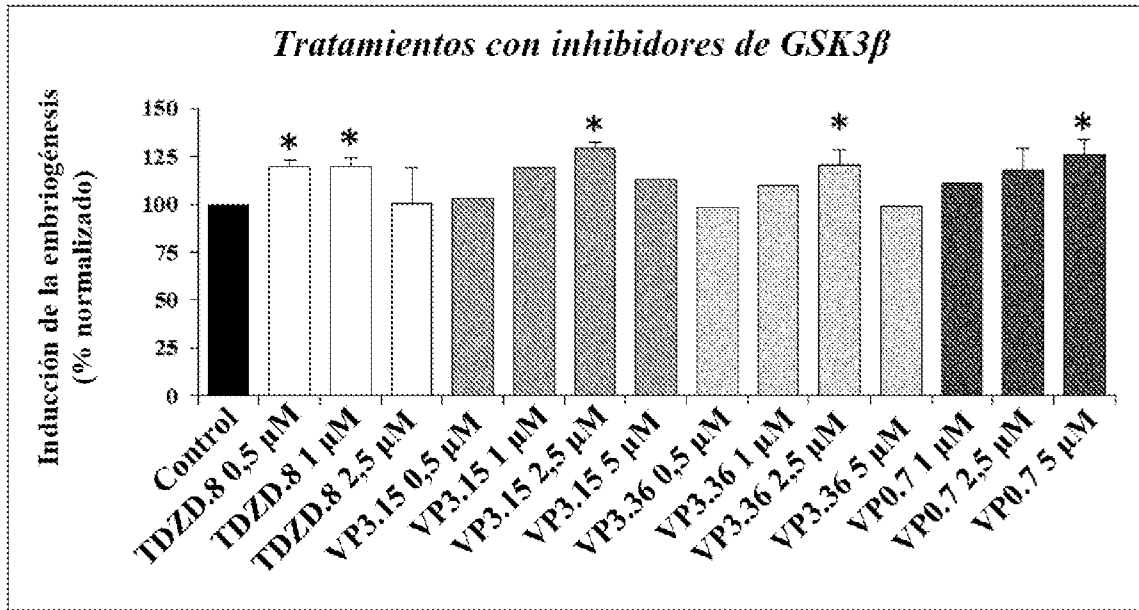


Fig. 4

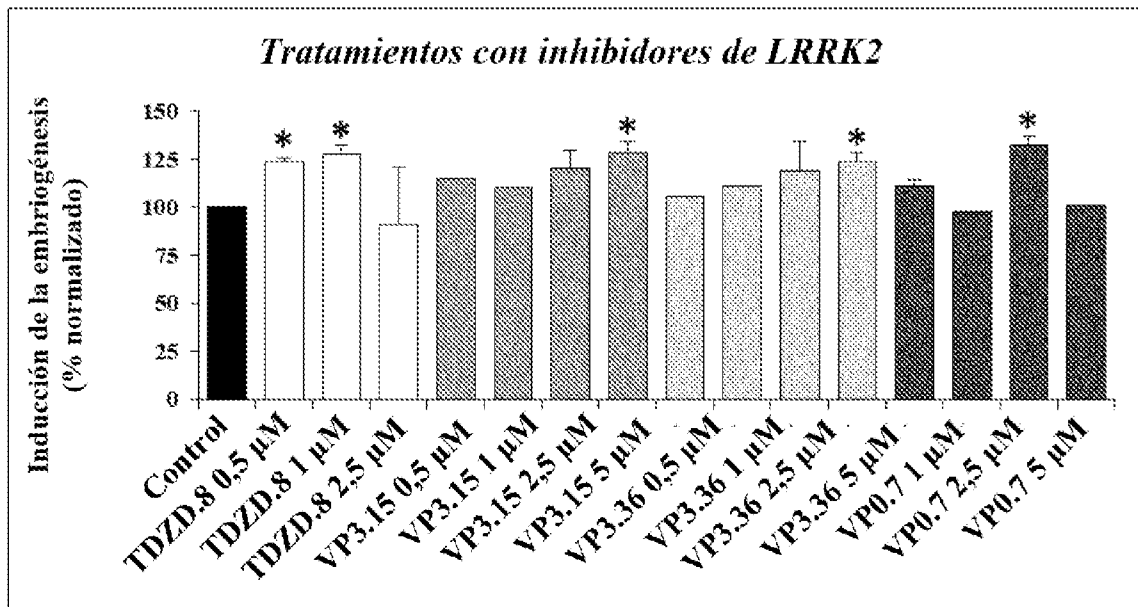


Fig. 5

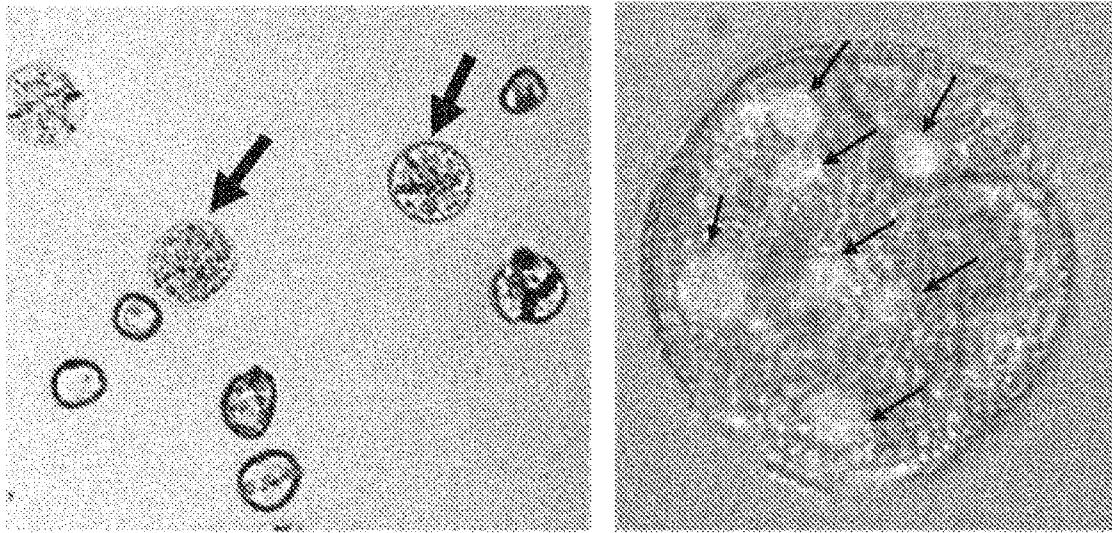
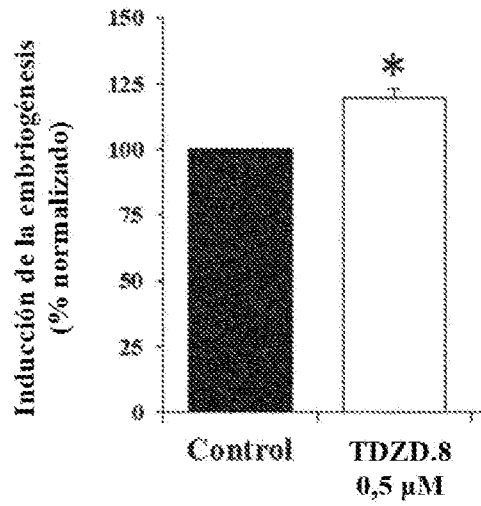


Fig. 6

*Inhibidor de GSK3 $\beta$  seleccionado*



*Inhibidor de LRRK2 seleccionado*

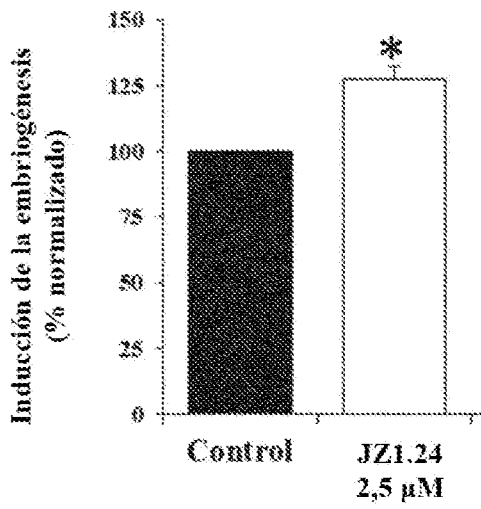


Fig. 7

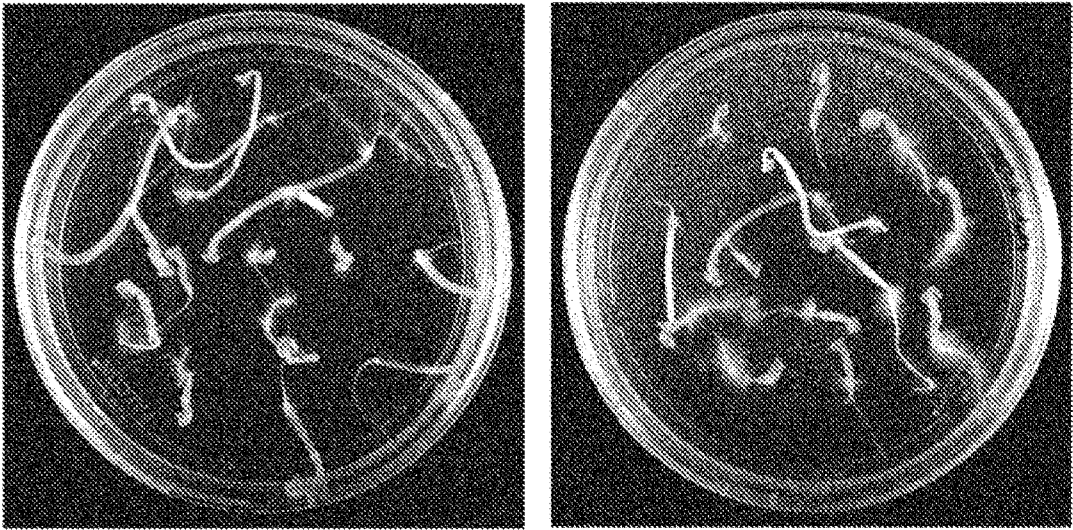


Fig. 8

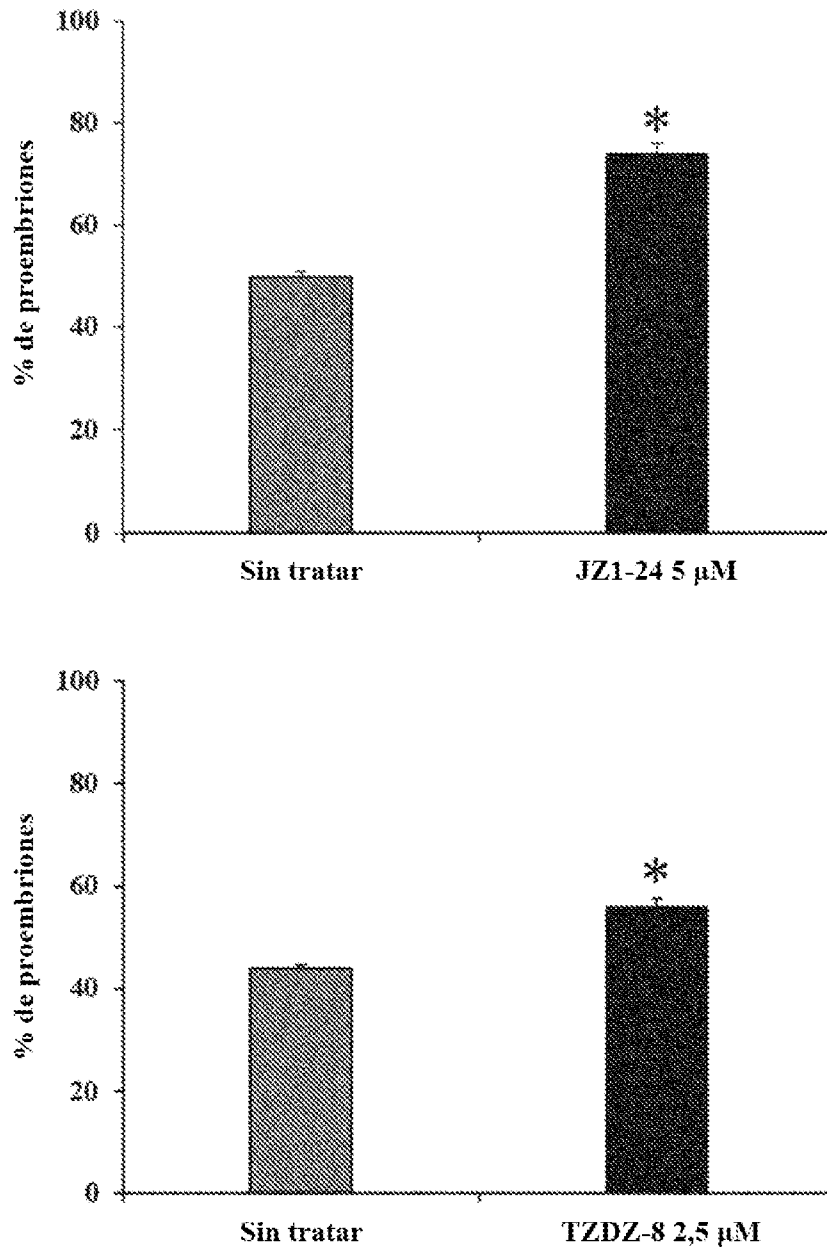


Fig. 9

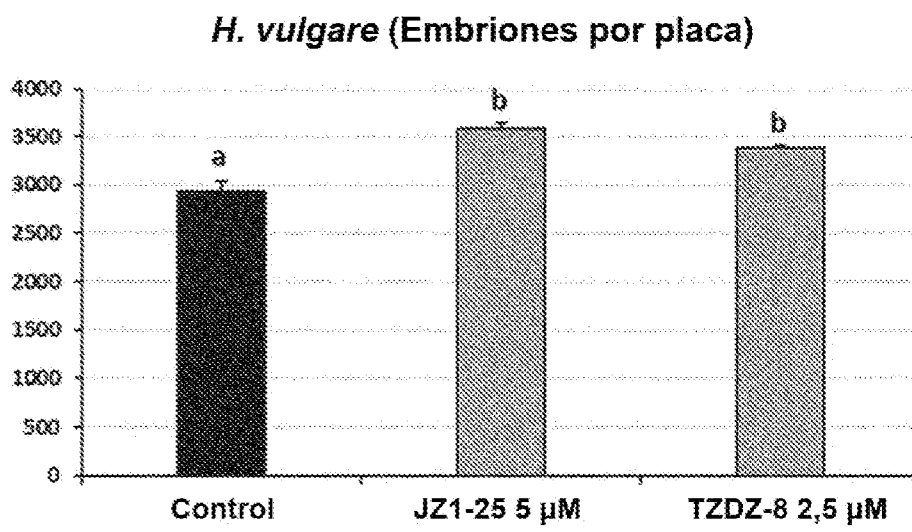


Fig. 10

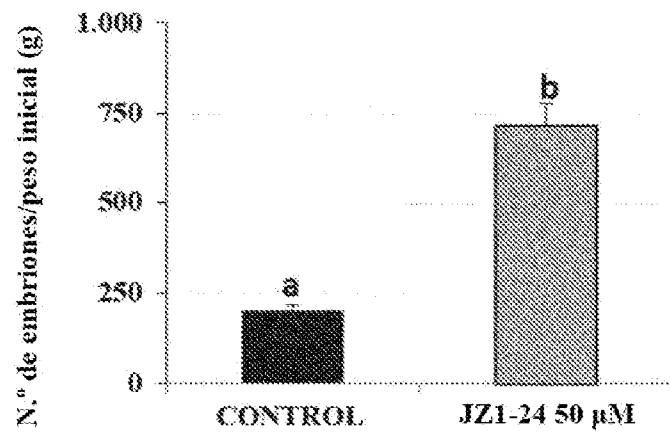
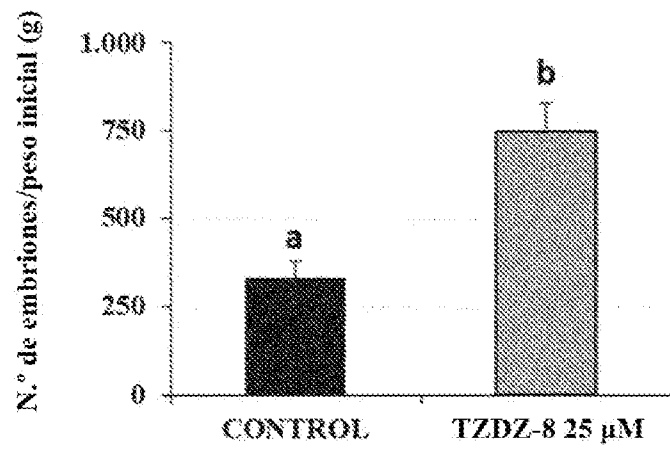


Fig. 11

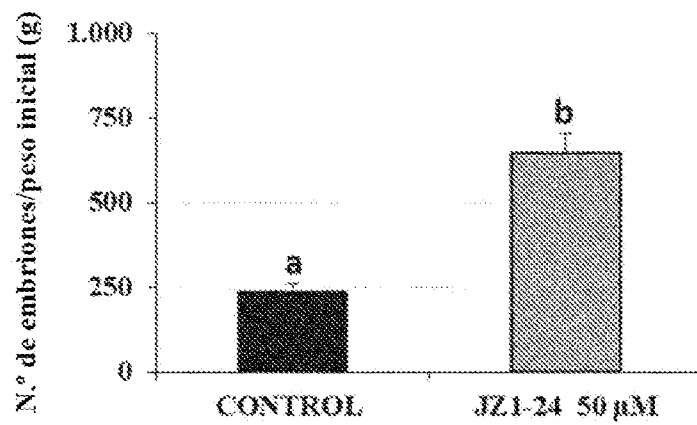
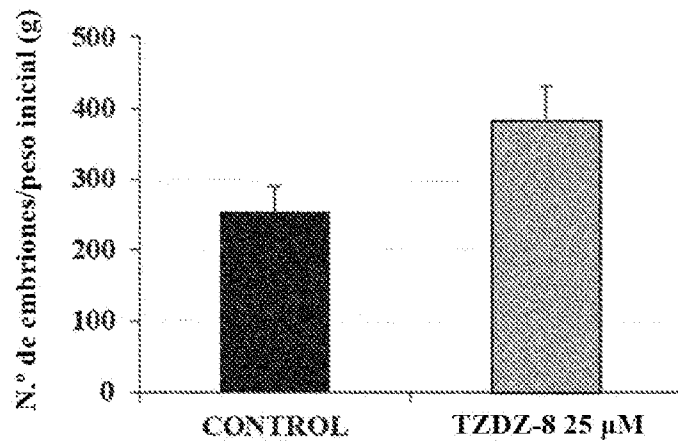


Fig. 12