



UNIVERSIDAD
DE ALMERÍA



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Androgénesis y producción de doble haploides en pimiento

TRABAJO FIN DE MÁSTER
MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL Y AGROALIMENTARIA

Trabajo Fin de Máster

Autor: García Maldonado, Julián

Tutor: Yuste Lisbona, Fernando Juan

Departamento de Biología y Geología, Área de Genética

Noviembre, 2020

Resumen

El proceso de androgénesis se define como el desarrollo de un individuo haploide/doble haploide el cual se ha originado exclusivamente a partir del núcleo masculino. Este proceso junto con la ginogénesis, constituyen las dos vías principales para la obtención de individuos haploides, o doble haploides si se produce una duplicación cromosómica. Estos individuos son una herramienta muy poderosa en campos como la mejora genética o el análisis genético. Dentro de la androgénesis existen varios caminos para la obtención de organismos haploides o doble haploides a partir del material gamético masculino. En este trabajo vamos a hacer una revisión de las diferentes vías de la androgénesis. Además, veremos cómo esta tecnología se ha desarrollado en el cultivo de pimiento, un cultivo con gran importancia cultural y económica en muchas zonas, lo que ha dado pie al desarrollo de protocolos para la obtención de organismos doble haploides específicos para este cultivo.

Palabras clave: Androgénesis, doble haploides, pimientos, *Capsicum*.

Abstract

Androgenesis is defined as the development of an individual genetically coming exclusively from a male nucleus, in this case the result is a haploid/doubled haploid individual. Androgenesis together with gynogenesis are the two main ways to achieve haploid/doubled haploid individual. The doubled haploid case is attached to a chromosome duplication. These individuals are a powerful tool in fields like plant breeding or genetics analyses. Within androgenesis there are several ways to obtain haploid or doubled haploid organisms from the male nucleus. In this work we carry out a review on the different paths to achieve the androgenesis. Moreover, we will see how this technology is applied on pepper crop, which is an important economic resource in some places as well as a traditional crop in several cultures. Therefore, a lot of protocols have been developed in order to obtain doubled haploid individuals.

Key words: Androgenesis, doubled haploids, pepper crops, *Capsicum*.

ÍNDICE:

1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	1.
2. PAPEL ACTUAL DE LA TECNOLOGÍA DOBLE HAPLOIDE EN MEJORA GENÉTICA.	3.
3. DIFERENTES VÍAS QUE REGULAN LA ANDROGÉNESIS.....	5.
3.1. Androgénesis a partir de microsporas/granos de polen.	6.
3.1.1. Cultivo de anteras/microsporas aisladas	6.
3.1.2. Factores a tener en cuenta	6.
3.1.3. Estrés, detonante de la inducción hacia la embriogénesis	9.
3.1.4. Cambios morfológicos en la microspora	13.
3.1.5. Modulación y expresión génica durante la inducción a la androgénesis ..	14.
3.2. Androgénesis a partir de meiocitos	16.
4. ANDROGÉNESIS EN PIMIENTO	17.
4.1. Historia e importancia del cultivo de pimiento	17.
4.2. Revisión de protocolos para la obtención de doble haploides en pimiento	18.
4.2.1. Método de Dumas Vaulx.....	19.
4.2.2. Método bifásico de Dolcet-Sanjuan.....	20.
4.2.3. Método de Supena y colaboradores	21.
4.2.4. Método a partir de microsporas aisladas	23.
5. DISCUSIÓN DE LOS PROTOCOLOS	25.
6. CONCLUSIONES	27.
7. BIBLIOGRAFÍA	28.

1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

La primera descripción sobre un individuo haploide se dio en 1922 de la mano de Dorothy Bergner (Dorothy Bergner et al., 1922), pero no fue hasta unos 40 años más tarde cuando se consiguió obtener un protocolo para reproducir este proceso en el laboratorio (Guha & Maheshwari, 1964), dando lugar a la androgénesis. Hoy en día existen protocolos para la obtención de individuos haploides en más de 200 especies (Maluszynski et al., 2003; Thomas et al., 2003), siendo las más interesantes aquellas que tienen valor comercial, ya sea en el campo hortofrutícola, medicinal u ornamental. El factor que permite el desarrollo de este tipo de cultivos es la capacidad totipotencial de las células vegetales, lo que les permite regenerar individuos completos a través de la formación directa de un embrión desde una célula desdiferenciada (embriogénesis), o también se pueden dar sucesivos procesos de diferenciación dando lugar a los diferentes órganos de la planta hasta alcanzar el individuo completo (organogénesis). Esta capacidad totipotencial se encuentra presente prácticamente en todos los tejidos de las plantas: hojas, tallos, cotiledones, ovarios, anteras... (Razdan, 2003). El hecho de que la regeneración se de a partir de un material gamético que ha sufrido una reducción cromosómica da lugar a los cultivos haploides, los cuales pueden recuperar su dotación cromosómica mediante una duplicación de cromosomas dando lugar a organismos doble haploides (Jensen, 1974).

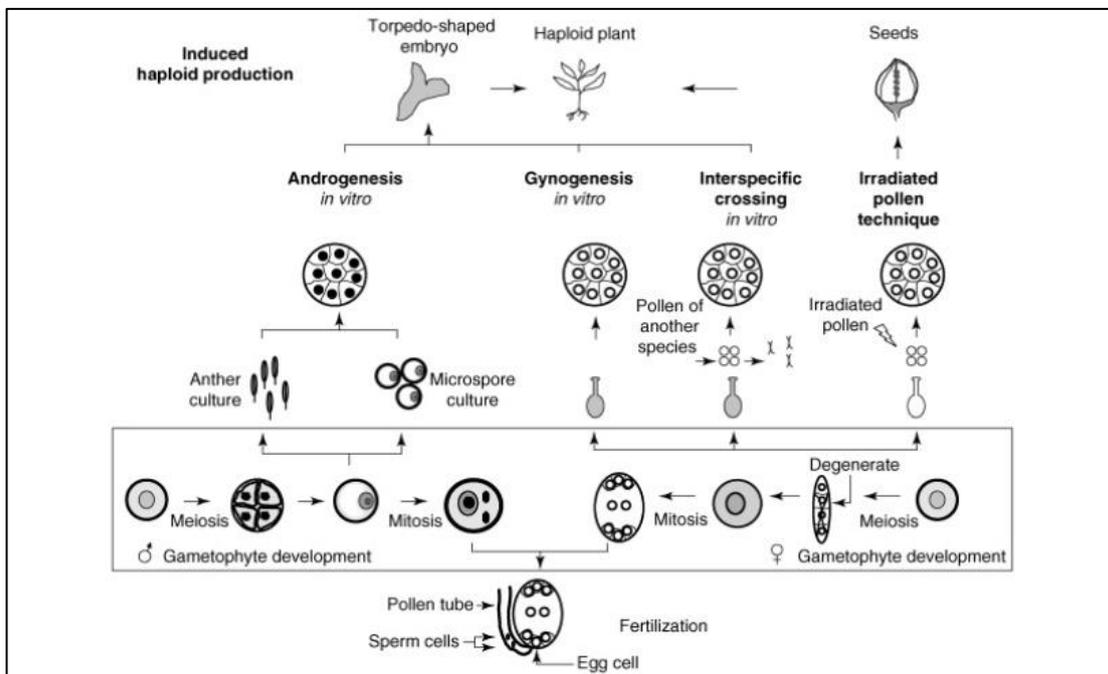


Figura 1. Diferentes vías para obtención de individuos haploides *in vitro*. Gametofito masculino: androgénesis. Gametofito femenino: ginogénesis, cruce interespecífico y técnica del polen irradiado. Figura tomada de Forster et al. 2007.

La aparición de individuos haploides puede darse tanto de forma natural como de forma inducida *in vitro* (Forster et al., 2007), siendo esta última la más interesante, ya que de forma natural los procesos de haploidía se dan en muy baja frecuencia (Palmer et al., 2005). Centrándonos en la inducción de este proceso, se puede llegar a la obtención de individuos haploides mediante varios caminos partiendo siempre del gametofito ya sea el masculino o el femenino (Dunwell, 2010; Forster et al., 2007) (Figura 1).

Partiendo del gametofito femenino encontramos tres alternativas. Una de ellas es conocida como ginogénesis, en la que los embriones haploides se desarrollan a partir de las células del óvulo. Estos óvulos se cultivan con parte del saco embrionario, normalmente los medios utilizados para estos cultivos son inductores para el desarrollo de los embriones haploides. En la mayoría de los casos los embriones provienen de la ovocélula, pero también pueden desarrollarse a partir de las células sinérgidas o las antípodas (Bohanec, 2009). Este tipo de técnica se desarrolla en cultivos como cebollas, pepino o remolacha azucarera. Otra ruta es la inducción de la ginogénesis utilizando polen irradiado, de este modo la célula generativa o espermática del grano el polen es incapaz de fusionarse con la ovocélula, pero si es capaz de desencadenar la ginogénesis (Seguí-Simarro, 2010). Normalmente esta vía se utiliza cuando el resto de las técnicas no son efectivas, pero puede llegar a ser muy eficiente (Forster et al., 2007). La última ruta es conocida como el método de *Hordeum bulbosum* descubierto en 1970 (Kasha & Kao, 1970), este método, ya más desarrollado en nuestros días, consiste en el cruce de dos plantas sexualmente incompatibles, ya sean cruces intraespecíficos, interespecíficos o intergénicos. En este caso se forma un cigoto híbrido que elimina los cromosomas aportados por la planta macho, a veces puede requerir un rescate del embrión ya que la degeneración del endospermo hace que no se desarrolle el embrión haploide.

Por otro lado, tenemos los embriones desarrollados a partir del gametofito masculino. Este proceso es conocido como androgénesis, y se define como el desarrollo de un individuo haploide/doble haploide el cual se ha originado exclusivamente a partir del núcleo masculino (Seguí-Simarro & Nuez, 2008). Aunque, en un primer momento el término androgénesis fue acuñado para el desarrollo de embriones en los cuales tras la fecundación el material genético del núcleo femenino quedaba desactivado o se producía su lisis (Rieger et al., 2012) (Figura 2). Pero este suceso se da con muy poca incidencia en la naturaleza, además de sus escasas aplicaciones técnicas.

El estudio de estos procesos actualmente está siendo clave en algunos campos como la mejora vegetal o el análisis genético de especies vegetales, donde se están consiguiendo avances muy significativos en comparación con años anteriores. Por lo que el objetivo de este trabajo es describir la situación actual de la tecnología doble haploide a través de la androgénesis, dejando a un lado el proceso de ginogénesis. Para ello pondremos en contexto el papel actual de esta tecnología, realizaremos una revisión del proceso de androgénesis en todos sus niveles y por último veremos cómo esta técnica se ha desarrollado en pimiento. Esta especie representa una gran parte del valor económico

en muchas zonas. Y que, además, ha sido muy utilizada tradicionalmente en muchas culturas, por lo que ha dado pie al estudio y al desarrollo de protocolos para la obtención de doble haploides.

2. PAPEL ACTUAL DE LA TECNOLOGÍA DOBLE HAPLOIDE EN MEJORA GENÉTICA

El uso de esta tecnología en este campo ha proporcionado que muchas de las variedades que se comercializan actualmente sean producidas a partir de doble haploides, por poner un ejemplo, el 50% de las variedades de cebada que hay actualmente en Europa se ha producido vía doble haploides (Germanà, 2011).

El principal uso de las líneas de doble haploides es la obtención de líneas homocigotas, estas líneas serán utilizadas como parentales de una F1 híbrida. La razón por la que la producción de semillas se realiza a través de la F1 híbrida, es la heterosis. Esta cualidad consiste en un incremento considerable de la producción por parte de la F1 híbrida respecto a sus parentales, por ello se habla de un vigor híbrido. Con este sistema de producción de líneas puras a través de doble haploides, los programas de mejora consiguen alcanzar la homocigosis genética en una sola generación, cuando de forma tradicional eran necesarias unas 7 u 8 generaciones para alcanzar un alto porcentaje de homocigosis (Figura 2).

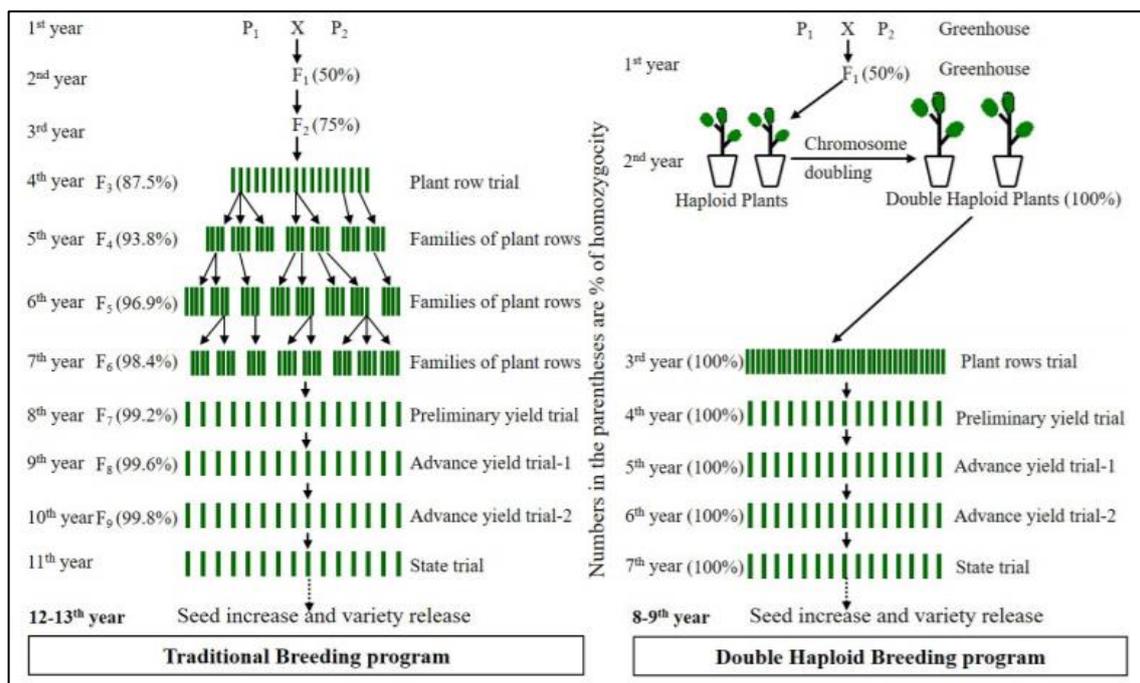


Figura 2. A la izquierda, forma tradicional de alcanzar la homocigosis mediante autopolinización. A la derecha, obtención de líneas homocigotas mediante doble haploides. Figura tomada de Rahman & Michalak de Jiménez, 2016.

Otra técnica tradicional de los programas de mejora que ha visto aumentada su eficiencia gracias a la introducción de la tecnología haploide, es la introgresión de un

carácter específico en una línea élite (Figura 3). La técnica tradicional consiste en cruzar nuestra línea élite con la línea que contiene el carácter que queremos introducir, tras realizar el primer cruce, la F₁ resultante se cruza de nuevo con la línea élite para recuperar la dotación genética perdida. La descendencia obtenida en este caso se le denomina primera generación de retrocruzamiento o BC₁ (BackCross 1), esta es de nuevo cruzada con la línea élite para seguir recuperando la dotación genética de nuestra línea élite. Este proceso se realiza de forma repetida hasta recuperar casi la totalidad de nuestra línea élite, siempre asegurándonos de que el carácter que queremos introducir se está fijando. Con la introducción de la tecnología doble haploide junto con la aplicación de marcadores moleculares podemos acortar los plazos desde la primera generación BC₁, ya que podemos seleccionar los individuos que tienen nuestro carácter de interés, además de recuperar nuestra línea élite con el desarrollo de doble haploides.

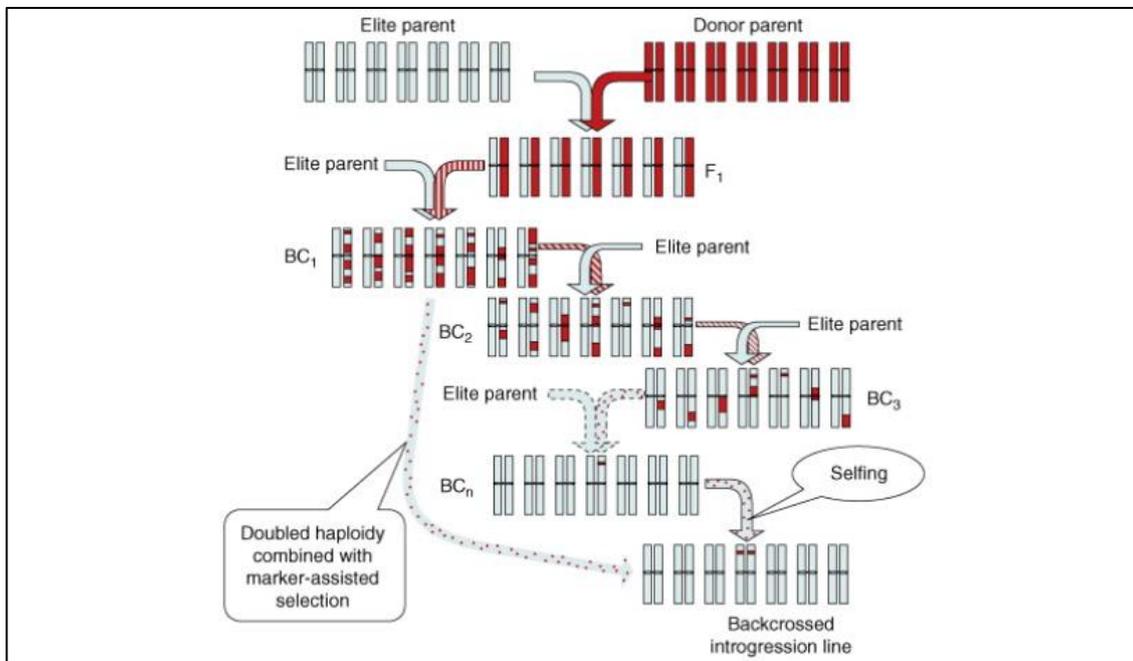


Figura 3. Introgresión de un gen determinado mediante dos vías, la tradicional (backcross) y desarrollada a partir de doble haploides junto con marcadores moleculares. Figura tomada de Forster et al., 2007.

Las aplicaciones que los dobles pueden tener más allá de las mencionadas pueden ser muy numerosas, hasta el punto de que pueden ser introducidas en cualquier trabajo o experimento en un momento dado. Algunos ejemplos pueden ser la variación gametoclinal que permite realizar mutaciones sobre el mismo material gamético, y después obtener plantas adultas doble haploides. El estudio de caracteres cuantitativos que dependen de múltiples QTL (Quantitative Trait Locus) y el mapeo genético también se pueden ver beneficiados de esta técnica, ya que permite un análisis más simple, así como una mayor facilidad a la hora de obtener material para su estudio.

3. DIFERENTES VÍAS QUE REGULAN LA ANDROGÉNESIS

Existen tres formas diferentes de alcanzar la androgénesis (Figura 4), la primera ya mencionada, hace referencia al desarrollo del individuo haploide dentro del saco embrionario tras la desactivación del material genético femenino. La segunda ruta se trata de la producción de individuos haploides a partir de granos de polen jóvenes o a partir de la microspora vacuolada, en este caso se pueden obtener embriones haploides o doble haploide si se ha producido una duplicación espontánea, ya sea de forma directa por embriogénesis o de forma indirecta por organogénesis. Y por último la tercera ruta consiste en la desviación de meiocitos hacia el desarrollo de callos, en esta última ruta cabe la posibilidad de encontrar individuos dihaploides heterocigóticos por la fusión de núcleos en el meiocito.

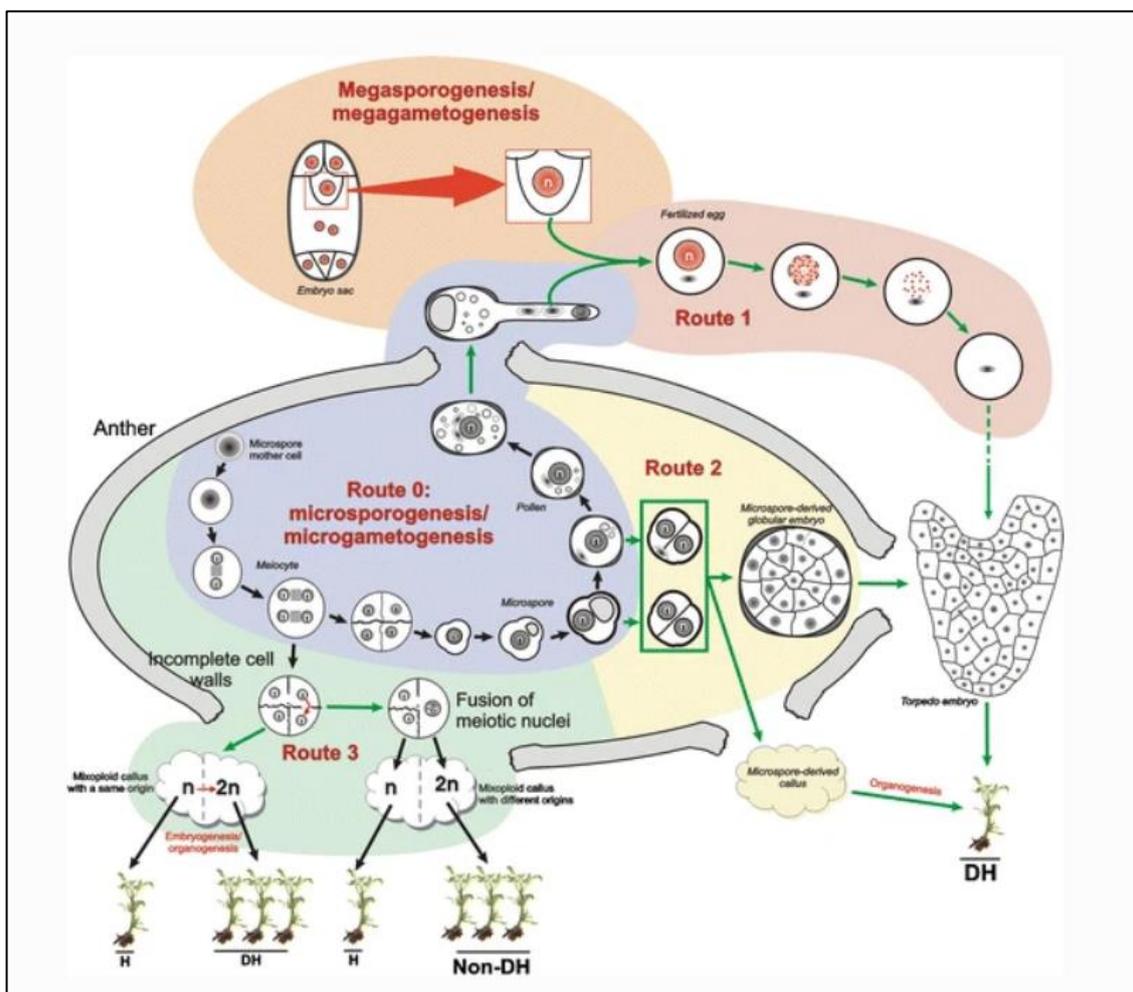


Figura 4. Diferentes vías para el desarrollo de la androgénesis. Ruta 1, desactivación del material genético femenino. Ruta 2, a partir de microsporas/granos de polen. Ruta 3, a partir de meiocitos. Figura tomada de Seguí-Simarro, 2010.

3.1. Androgénesis a partir de microsporas/granos de polen

3.1.1. Cultivo de anteras/microsporas aisladas

El cultivo de anteras ha sido el método tradicional para la obtención de individuos haploides a través de la androgénesis (Dunwell, 2010). Además, ha sido introducido como una herramienta muy poderosa en los programas de mejora genética por lo que se han desarrollado protocolos para un gran número de especies (Maluszynski et al., 2003). El desarrollo de estos protocolos no resulta una tarea fácil ya que hay que tener en cuenta factores externos e internos al proceso (Datta, 2005; M. Wang et al., 2000). Por otro lado, el cultivo de microsporas aisladas no es más que una modificación del cultivo de anteras, que nos permite trabajar con un mayor número de microsporas. Este tipo de cultivo ha sido más utilizado en procesos de investigación, además, también nos permite estudiar los efectos del tejido remanente del esporofito (Touraev et al., 2001).

3.1.2. Factores a tener en cuenta

- **Genotipo**

Se trata del factor más determinante a la hora de producir la androgénesis, dentro de las especies en las que se ha conseguido la producción de doble haploides se han encontrado grandes diferencias entre los diferentes cultivares (Germanà, 2006). Por lo que a la hora de diseñar un protocolo de cultivos de anteras hay que afinar bien en la descripción, ya que no sería igual de eficiente en todas las variedades de la especie. Además, no solo el hecho de si se va a dar una respuesta satisfactoria a la inducción a la androgénesis está controlado por el genotipo, si no que la forma en la que las células van a interactuar con el medio y se van a desarrollar también está controlado por el genotipo. Por lo que dentro de una misma especie podemos encontrar variedades que respondan a la inducción originando un callo o directamente un embrión haploide/doble haploide (Petolino & Thompson, 1987).

- **Estado de desarrollo del polen**

El estado de desarrollo del polen se considera otro de los factores más determinantes a la hora de provocar la inducción a la androgénesis. La ventana en la que el polen es óptimo ha sido bien estudiada (Maraschin et al., 2005; Touraev et al., 2001), esta coincide alrededor de la primera mitosis de la microspora, que abarca desde la formación de la microspora vacuolada hasta la formación de granos de polen inmaduros binucleados. El hecho que permite la inducción en esta ventana del desarrollo del grano del polen parece estar asociado a su actividad transcripcional, que sería todavía bastante proliferativa en vez de diferencial. Una vez el grano de polen ha sufrido una mayor diferenciación, donde el número de transcritos es muy elevado y los granos de polen han comenzado a acumular reservas, estos pierden la competencia que les permite empezar la androgénesis (Honys & Twell, 2004). Aunque esta ventana ha sido estudiada

en muchas especies no es aplicable a todos los casos, habiendo algunos ejemplos donde la ventana de actuación es mucho más breve. Incluso se han obtenido individuos haploides fuera de este rango, como por ejemplo el obtenido por Binarova y colaboradores, en *Brassica napus* (Binarova et al., 1997). Donde consiguieron resultados satisfactorios más allá de los primeros estadios del grano de polen, aplicando un tratamiento más severo sobre granos de polen con las células vegetativas ya formadas.

Para obtener las anteras con los granos de polen en los estadios óptimos es necesario llevar a cabo una tinción que nos muestre el estado de las microsporas, esta tinción se suele hacer con acetocarmina (Sharma & Sharma, 2014). Otro compuesto utilizado para las tinciones de las anteras es DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (Germanà, 2011). El problema de esta selección es que no todas las anteras maduran a la vez dentro del mismo botón floral, incluso el desarrollo dentro de la misma antera es diferente. También se pueden encontrar diferencias entre los botones florales en una misma planta, ya que no todos se desarrollan con la misma velocidad. Por lo que de forma general se selecciona el tamaño de flor que más microsporas en estadios óptimos ha mostrado de forma general en toda la planta.

- **Estado fisiológico y condiciones de cultivo de las plantas donadoras**

Si tenemos en cuenta todos los factores que afectan al desarrollo de un cultivo podríamos decir que hay muchas maneras de llevar las plantas hasta el estado óptimo para la recolección de las anteras, por lo que todos estos factores pueden afectar al desarrollo de las anteras. Por ejemplo, según el fotoperiodo en el que el cultivo se ha desarrollado podemos encontrar una respuesta diferente a la inducción a la androgénesis (Datta, 2005). De esta forma podemos extrapolar a diferentes factores: nivel endógeno de hormonas (Sunderland et al., 1977), estado fisiológico de la planta (Heberle-Bors, 1985), instalaciones donde se desarrolla el cultivo, temperatura a la que se desarrolla, estado de nitrificación de la planta... (Germanà, 2011).

Al igual que ha pasado con los otros factores que afectan a la androgénesis, resulta muy difícil establecer las condiciones óptimas a las que los cultivos donadores de anteras deben desarrollarse. Por lo que a la hora de establecer un protocolo debemos afinar hasta el nivel de especie o cultivar, proceso que requiere mucho tiempo si se quiere estudiar el máximo de factores posibles.

- **Esterilización de la flor y escisión de las anteras**

Antes de realizar la escisión de las anteras es necesario llevar a cabo una desinfección de los botones florales, ya que se trata de un entorno accesible para los diferentes agentes contaminantes. La forma en la que las anteras responden a los agentes desinfectantes puede afectar a la respuesta de las microsporas a la androgénesis. Los protocolos se han adaptado según el tipo de cultivo, podemos encontrar algunos ejemplos de desinfección en el manual de Maluszynski et al 2003 (Maluszynski et al.,

2003). Los principales compuestos que se van a utilizar para las desinfecciones son etanol, hipoclorito sódico y el producto comercial Tween (Germanà, 2011).

Durante la escisión de las anteras se pueden ocasionar daños en el tejido de estas, lo que puede desencadenar una respuesta por parte de los tejidos de las anteras que dé lugar a la formación de callos (Germanà, 2011). La única forma de evitar estas lesiones son las buenas prácticas por lo que la escisión de anteras se suele realizar bajo lupa.

- **Composición del medio**

La composición del medio no solo va a ser importante a la hora de aportar los nutrientes adecuados para el desarrollo de doble haploides, si no que va a influir directamente en el desarrollo de estos. Además de otras funciones, como mantener el pH del medio o las condiciones de asepsia. Otro aspecto que parece estar muy conectado con el desarrollo de la androgénesis es la presión osmótica (Datta, 2005), esta presión está controlada por la concentración de carbohidratos, que también juegan su papel nutricional en el medio. La sacarosa ha sido la fuente de carbono más utilizada en la producción de medios (Powell, 1990) La maltosa también ha sido utilizada con éxito en la obtención de doble haploides pero, al igual que con otras fuentes de carbohidratos, los resultados han variado de forma aleatoria en función del cultivo (Germanà, 2011).

El contenido de hormonas de crecimiento no parece estar muy vinculado al desarrollo de la androgénesis, aunque si ha mostrado resultados satisfactorios en especies recalcitrantes (Maheshwari et al., 1982). En algunas especies como el trigo se ha demostrado que la concentración y el tipo de auxinas influye en el desarrollo de callos o embriones (Germanà, 2011).

Otros componentes han sido tradicionalmente añadidos al medio tales como caseína, prolina, biotina, glutamina, carbono activado... De todos ellos uno que merece especial mención es el carbono activado, ya que su adición al medio ha incrementado la respuesta a la embriogénesis (Bajaj, 1983). En algunos protocolos, es el propio material vegetal quien aporta componentes al medio, como es el caso del co-cultivo con ovarios (Lantos et al., 2009).

Los medios más utilizados para el cultivo de anteras han sido el medio N6, MS, Nitsch and Nitsch y B5 (Germanà, 2011). Siempre hay que tener en cuenta la respuesta de cada cultivo al medio, por lo que los medios de cultivo van a variar en función de la especie o el cultivar, llegando a desarrollarse medios con unas características muy concretas. El estado físico en el que nos vamos a encontrar el medio depende mucho del tipo de uso que le vayamos a dar a los doble haploides, es decir, hay que tener en cuenta si se trata de una producción en masa de estos o si por el contrario se trata de un estudio concreto.

3.1.3. Estrés, detonante de la inducción hacia la embriogénesis

Para cambiar el sentido de la ruta que las microsporas toman hacia la formación de los granos de polen y reconducirlas hasta el desarrollo de embriones, es necesario la aplicación de estrés (Touraev et al., 1996). Tras la aplicación del estrés las microsporas adquieren un estado totipotente que les permite desarrollarse como embriones (Figura 5), estos tipos de estrés se pueden clasificar en 3 categorías denominadas como widely used, neglected y novel en la jerga técnica (Shariatpanahi et al., 2006).

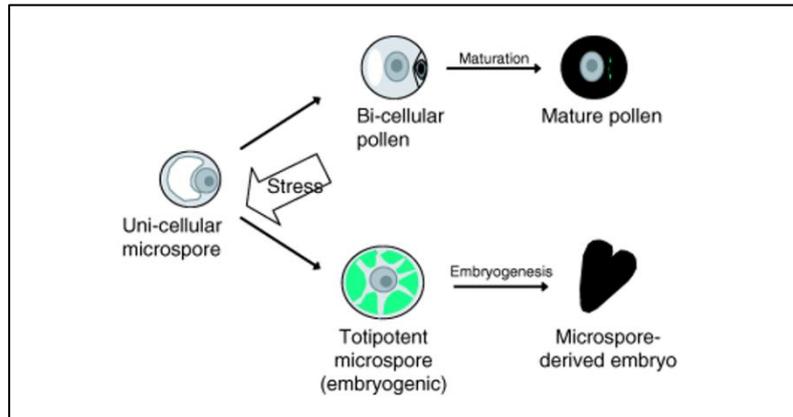


Figura 5. Efecto de la aplicación de un estrés sobre la microspora. Figura tomada de (Shariatpanahi et al., 2006).

Widely used

- **Cold shock**

La aplicación de un choque térmico frío ha sido utilizado en muchas especies y de diferentes maneras. La forma y el lugar donde se aplica el tratamiento ha variado según especies e investigadores (Shariatpanahi et al., 2006). En algunos casos ha sido la planta entera la que se ha sometido a estas condiciones y en otros casos se ha reducido a los botones florales o a las anteras. La forma de aplicación también es heterogénea, abarcando desde un choque térmico rápido, hasta bajadas de temperaturas prolongadas en el cultivo de plantas donadoras.

Una bajada de la temperatura puede ayudar al desarrollo de doble haploides de diferentes maneras. Este tratamiento ayuda a evitar la descomposición de las anteras (Duncan-Heberle, 1997), garantiza una mayor supervivencia microsporas (Sunderland & Roberts, 1979) o ayuda a la aparición de dihaploides incrementando la tasa de endoreduplicación (Amssa et al., 1980). Aparte de estas respuestas, este tratamiento incrementa el número de aminoácidos libres, provoca un estrés nutricional y retrasa la senescencia (Shariatpanahi et al., 2006). Todas estas respuestas pueden contribuir de diferentes maneras al desarrollo de doble haploides.

- **Hot shock**

El choque térmico por calor ha sido utilizado en muchas especies con importantes aplicaciones agrícolas, como son el trigo, la colza, el lino, la berenjena, avena... (Shariatpanahi et al., 2006).

La forma en la que afecta al desarrollo de la microspora ha sido dividida en dos vías (Shariatpanahi et al., 2006), una de ellas relacionada con la síntesis de proteínas HSP (Heat-Shock Protein) y la otra relacionada con cambios en los eventos del ciclo celular. Cabe destacar como el choque térmico puede ocasionar endo-reduplicación, además, del paso de la microspora desde la fase G2 del ciclo celular hasta la fase G1 sin que se produzca la mitosis. También han sido estudiados cambios en el citoesqueleto, microtúbulos e incluso cambios en la densidad de electrones. Con respecto a la síntesis de HSP, estas han sido relacionadas con la inhibición de la apoptosis.

- **Sugar starvation**

Se trata de un tratamiento muy extendido entre algunos de los cultivos más importantes como la cebada, el arroz y el trigo.

Al igual que en los dos casos anteriores se produce una síntesis de HSP (en Cold shock no está clara su función todavía), además de un cambio en la actividad quinasa de las proteínas (Garrido et al., 1993). También se dan cambios a nivel del núcleo afectando a su número de poros, estructura, cromatina..., así como cambios en la membrana plasmática afectando a la composición de sus fosfolípidos (Garrido et al., 1993; Kyo & Harada, 1990a, 1990b).

- **Colchicina**

Este tratamiento está menos extendido, pero ha sido utilizado en cultivos de café, maíz y en canola (Shariatpanahi et al., 2006).

Los estudios llevados a cabo por Zhao y colaboradores (Zhao & Simmonds, 1995; Zhao et al., 1996a, b) indican que la acción de la colchicina depende del estadio en el que se encuentra la microspora, siendo el estado más susceptible cuando esta se encuentra vacuolada. En estos casos se produce una despolimerización de los microtúbulos bloqueando el desarrollo del grano del polen y conduciéndolo a la embriogénesis.

Neglected stres

- **Irradiación-γ**

Aunque en un principio la irradiación con rayos gamma se utilizó para producir mutaciones en las células haploides, este tipo de radiación ha sido utilizado en raras ocasiones para la inducción al desarrollo de embriones por parte de las microsporas.

- **Etanol**

En este caso el etanol ha reportado resultados contradictorios, en los que parece que es su combinación con la fuente de azúcar la que parece determinar la inducción o la inhibición del desarrollo de embriones (Shariatpanahi et al., 2006).

- **Choque hipertónico**

La aplicación de un choque hipertónico a las anteras antes de ser puestas a cultivar ha mostrado buenos resultados, aunque no se trata del método más extendido ha sido utilizado en el desarrollo de protocolos más recientes (Supena et al., 2006).

- **ABA**

El papel del ABA (ácido abscísico) como una de las principales hormonas vegetales producidas en el proceso de androgénesis ha sido bien estudiado (Maraschin et al., 2005), este se postula como el regulador de la expresión génica. Más allá de esto, este compuesto también ha sido utilizado como inductor de la androgénesis. Su aplicación se ha dado tanto como pretratamiento como adicionado en el cultivo de anteras. Su papel parece estar relacionado con la inhibición de ciertos ARN implicados en el desarrollo normal del gametofito, conduciendo a este a la formación del esporofito, en este caso haploide/doble haploide.

- **Otras formas de estrés**

Dentro de este apartado se incluyen otros tipos de estrés que están menos expandidos como son el obtenido por centrifugación, por adicción de agentes de determinación sexual femenina o la reducción de la presión atmosférica. Este tipo de tratamiento se han dado de forma muy esporádica y con resultados contradictorios en algunos casos (Shariatpanahi et al., 2006).

Novel stresses

- **Nivel alto del pH**

Esta técnica fue estudiada en profundidad por Barinova y colaboradores en 2004 (Barinova et al., 2004). Su estudio se desarrolló sobre plantas de tabaco y la planta conocida como boca de dragón (*Antirrhinum majus*). Haciendo un primer cultivo de anteras con pH de 8 o superiores, seguido de un cultivo a pH 6,5 consiguieron una mayor tasa de producción de embriones. Tras estudiar el proceso asociaron el descenso de la actividad de la invertasa de sacarosa como el desencadenante de la inducción. A pH más altos esta encima pierde actividad produciendo un déficit en la fuente de carbono, actuando como un estrés nutricional (Starvation).

- **Oligosacáridos: carragenos**

Varios tipos de carragenos fueron testados junto con otro tipo de sustancias normalmente gelificantes, todas ellas pertenecientes a las membranas plasmática ya sea de plantas, algas, bacterias u hongos (Lemonnier-Le Penhuizic et al., 2001). Solo los carragenos fueron capaces de producir un aumento en la androgénesis, este tratamiento fue combinado con un tratamiento térmico de 24h a 32,5°C y aplicado en *Brassica oleracea var itálica* obteniendo como resultado el doble de embriones en el cultivo. En este trabajo determinaron además la concentración óptima de carragenos para este cultivo, puntualizando que todavía es pronto para categorizar los carragenos como un inductor de amplio espectro.

- **Metales pesados**

El estudio de los metales pesados como inductores de la androgénesis ha sido tratado varias veces a lo largo de la historia del cultivo de anteras (Shariatpanahi et al., 2006). Uno de los metales que mejor ha sido estudiado es el litio (Zonia & Tupý, 1995), su papel parece estar más relacionado con impedir el desarrollo normal del gametofito. Los estudios han demostrado que el litio interactúa con algunos de los reguladores del calcio, esto provoca que este no se pueda distribuir de forma desigual a lo largo de la membrana como lo haría en una división tipo del gametofito. Otros metales como el cadmio también han sido utilizados con éxito (Shariatpanahi et al., 2006).

- **Inductores químicos**

Una lista de inductores químicos fue estudiada en trigo por Liu et al. (2001) y Zheng et al. (2001). La mayoría de las sustancias probadas mostraron resultados positivos en cuanto al desarrollo de las microsporas, pero de entre ellas solo tres fueron capaces de potenciar la embriogénesis, estas fueron 2-HNA, B-5-CA y VAM. En un nuevo estudio llevado cabo en 2019 (H. M. Wang et al., 2019) la tricostatina A (TSA) fue estudiada con resultados satisfactorios en la producción de embriones.

El uso de componentes químicos se postula como un buen candidato en la inducción a la androgénesis. Aunque parece ser que el papel que va a jugar es el de potenciador, más allá de que en algunos casos también pueda actuar como detonante.

- **Pretratamiento con 2,4-D**

Esta auxina sintética que ha sido utilizada tradicionalmente como herbicida también ha sido testada como agente estresante. Su papel como agente inductor no ha quedado probado todavía, aunque parece actuar como un potenciador de la androgénesis a través de la regulación de la síntesis interna de auxinas (Shariatpanahi et al., 2006). Su papel como agente estresante en cultivos de tejidos si ha quedado probado (Gallo-Meagher & Green, 2002).

3.1.4. Cambios morfológicos en la microspora

La morfología de la microspora embriogénica se caracteriza por la presencia de una gran vacuola central, además de un claro citoplasma. En otros procesos embriogénicos como en la embriogénesis somática, las células que van a dar lugar a los embriones se caracterizan también por tener una gran vacuola aparte de haber aumentado su tamaño. En algunas especies la embriogénesis somática no se desarrolla a partir de estas células sino a partir de una subpoblación de pequeñas células, esto nos indica que aparte del tamaño, deben ajustarse otros parámetros. En el caso de la embriogénesis cigótica, se da un aumento muy rápido de la célula tras la fecundación. El otro marcador característico de las microsporas embriogénicas es el grado de dediferenciación del citoplasma, en estas células se produce la eliminación de algunos orgánulos, un descenso en el número de ribosomas y en el número de gránulos de almidón, siendo éstos últimos de menor tamaño. También se ha observado una capa menor de intina en este tipo de microsporas. La dediferenciación de estas células ha sido estudiada a través de dos rutas, la acción de los lisosomas y la degradación por parte del proteosoma. La acción de estos dos sistemas de degradación parece estar desencadenada por la exposición a alguno de los estreses ya mencionados. La eliminación de los orgánulos es llevada a cabo por los lisosomas, mientras que la eliminación de las moléculas de larga duración o de corta duración en este caso, es llevada a cabo por el proteosoma tras previa ubiquitinación.

Otro evento morfológico importante que tiene lugar es el cambio de patrones en la citocinesis. A diferencia de la división asimétrica que tiene lugar en la microspora cuando sigue el camino normal del gametofito, en las microsporas embrionarias se da una división simétrica. Esta división va acompañada del traslado del núcleo vegetativo a la zona meridional de la microspora junto con la fragmentación de la vacuola, los fragmentos de la vacuola se repartirán de forma radial en la microspora (Figura 6). Esta nueva disposición marcada por la reorganización en los microtúbulos y en los filamentos de actina, permite la división simétrica de la microspora, la cual parece estar relacionada con el desarrollo de organismos multicelulares.

Aunque la disposición radial en la microspora y el traslado del núcleo al centro se postulan como eventos previos y necesarios al desarrollo de la embriogénesis, hay que tener en cuenta que se trata de un proceso muy dinámico, que se puede dar en diferentes estadios de la microspora y bajo la inducción de diferentes tipos de estreses. También hay que tener en cuenta como las diferentes especies van a responder a todos estos factores a la hora de desarrollar la androgénesis.

Toda esta información ha sido recogida en varias revisiones en los últimos años (Maraschin et al., 2005; Pechan & Smykal, 2008; Seguí-Simarro & Nuez, 2008).

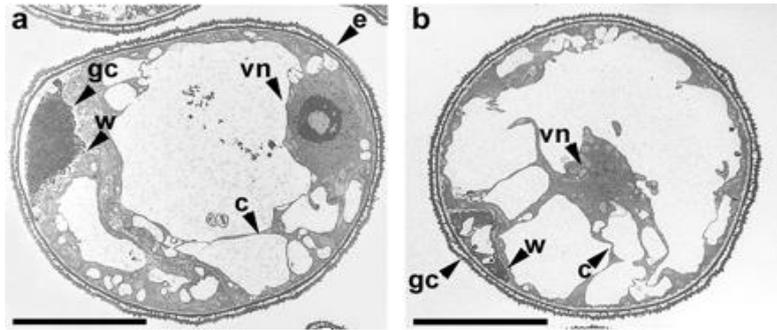


Figura 6. a) División asimétrica en el desarrollo normal la microspora. B) División simétrica de la microspora androgénica, con el núcleo centrado y la vacuola fragmentada en disposición radial. c, cadenas citoplasmáticas; e, capa de exina; gc, célula generativa; vn, núcleos vegetativos; w, membrana celular. Figura tomada de Maraschin et al., 2005.

3.1.5. Modulación y expresión génica durante la inducción a la androgénesis.

Aunque la fase de inducción ha sido bastante estudiada hay pocos estudios que se centren en la expresión génica en esta fase. En estos últimos años han aparecido trabajos muy interesantes al respecto (Joosen et al., 2007; Malik et al., 2007). Estos trabajos han conseguido identificar un gran número de genes involucrados en la inducción de la androgénesis. Muchos de ellos ya encontrados se han ratificado, otros han sido descritos y otros se mantienen como desconocidos, dando pie a nuevas investigaciones. También han sido capaces de establecer un número de genes marcadores de forma inequívoca en las células con potencial androgénico.

Antes de entrar en detalle sobre los genes que intervienen en cada evento hay que hacer referencia al ABA, ya que se ha mostrado como el principal regulador de la expresión génica, aunque parece estar claro que más reguladores estarían entrando en juego.

- **Papel del ABA**

El ácido abscísico se encuentra en concentraciones muy altas en las células vegetales tras la aplicación de algunos de los estreses visto como inductores de la androgénesis (Zeevaart & Creelman, 1988). Picos de esta hormona también han sido detectados en varias especies horas después de la aplicación de algún tipo de estrés (Reynolds & Crawford, 1996; van Bergen et al., 1999). Hoekstra en 1997 y Rajasekaran en 1987 (Hoekstra et al., 1997; Rajasekaran et al., 1987), demostraron que interrumpiendo la síntesis de novo del ABA se reducía la eficiencia de la regeneración. Junto al ABA se ha detectado la presencia de varias proteínas en las primeras horas tras la inducción de la androgénesis. Una de ellas, EcMt, muestra una región sensible a ABA en su promotor (Reynolds & Crawford, 1996), por lo que también podría jugar un papel importante en la cascada de señales que da lugar a la inducción a la androgénesis. Genes miembros de la familia alcohol deshidrogenasa (ADH) junto a la proteína NtEPc, han sido encontrados en las primeras horas tras la aplicación del estrés, aunque su papel no ha sido demostrado también parecen estar detrás de señalización hacia la androgénesis

(Maraschin et al., 2005). Teniendo en cuenta estos estudios se puede decir que el ABA parece jugar un papel importante en la supervivencia de las microsporas tras la aplicación del estrés, además de impedir su diferenciación normal en el camino del gametofito.

- **Genes encargados de la citoprotección**

Se ha detectado un aumento en los niveles de transcritos de HSP tras la aplicación de algunos de los estreses que inducen la androgénesis, como el choque térmico, starvation o tratamientos químicos (Cordewener et al., 1994; Pechan et al., 1991; Seguí-Simarro et al., 2003). Al principio se pensó que estas proteínas podían estar relacionadas con la inducción a la androgénesis, pero en trabajos posteriores se ha visto en algunos casos que tras la exposición a un estrés típico que desencadena una respuesta de HSP (choque térmico), no se produce un aumento en el nivel de HSP, aunque si se produce el proceso de androgénesis. Por estas razones las HSP han sido propuestas como las encargadas de proporcionar la tolerancia al estrés (Maraschin et al., 2005; Seguí-Simarro & Nuez, 2008). Otra familia de genes que parece jugar un papel importante son las GST (Glutación-S-transferasa) (Maraschin et al., 2005). El principal papel de estas proteínas en el proceso de androgénesis sería evitar los daños por especies reactivas de oxígeno o ROS (Reactive Oxygen Species). Estas moléculas se producen como consecuencia a la exposición a un estrés, actuando mediante la señalización de hormonas y genes encargados de dar la respuesta.

- **Genes proteolíticos**

Parece claro que para poder parar el desarrollo normal del gametofito debe haber una reducción y desactivación de un gran número de proteínas. Modificaciones tales como fosforilaciones o glicosilación de proteínas han sido recogidas en varios trabajos (Pechan et al., 1991; Řihová et al., 1996; Kyo & Harada, 1990a). El papel más importante en este apartado es llevado a cabo por el proteosoma, por lo que los genes que envuelven tanto al proteosoma como a su regulación se expresan en mayores niveles. Este interviene además en ciclo de reciclaje del nitrógeno, paso muy importante cuando se aplica estrés por starvation (Beers et al., 2004; Smalle & Vierstra, 2004). Otra familia de proteínas importante son las CDK (Quinasas dependientes de ciclinas), estos complejos están regulados por ciclinas que en última instancia son las encargadas de regular el ciclo celular (Criqui & Genschik, 2002). La interacción que van a mantener estas proteínas con el proteosoma son muy importantes, ya que el ciclo celular en el desarrollo de la embriogénesis varía en comparación con desarrollo normal del grano de polen (Touraev et al., 1996).

- **Genes expresados en la iniciación de androgénesis**

Hasta ahora los genes mencionados han estado relacionados con el proceso de desactivación del transcurso normal del grano de polen y la iniciación de la cascada de

señales. Estos genes abarcan desde la detección del estrés hasta la protección de la célula, pasando por un proceso proteolítico necesario para parar el desarrollo del polen. A estos eventos habría que añadir los genes encargados de la biosíntesis de almidón, evento que parece necesario interrumpir para alcanzar la androgénesis (Maraschin et al., 2005).

Con respecto a los genes encargados de inducir la androgénesis, en los últimos años se ha afianzado la idea de que el proceso de embriogénesis que se da en la androgénesis no puede estar muy alejado del proceso normal de embriogénesis cigótica. A lo largo de los años se han ido aislando genes que intervienen en el proceso de embriogénesis, como es el caso de *BABY BOOM (BBM)* (Boutilier et al., 2002). Este sea quizás el más interesante, ya que se ha demostrado expresión ectópica de este gen es capaz de inducir la embriogénesis en células de tejidos vegetales jóvenes. Otros genes con características parecidas fueron descritos por Harada en 2001 (Harada, 2001), estos fueron genes de la familia *LEAFY COTYLEDON (LEC1, LEC2, FUS3)*. A estos trabajos se podrían añadir otros recogidos por Maraschin y colaboradores en 2005 y Dunwell en 2010 (Dunwell, 2010; Maraschin et al., 2005).

En los últimos años se ha conseguido describir algunos genes que solo intervienen en la inducción a la androgénesis, por lo que han sido propuestos como genes marcadores de la androgénesis, es el caso de los genes *ECA1* y *HvPG1*, descritos en avena (Pulido et al., 2009). Otro trabajo muy interesante fue el llevado a cabo por Malik et al. en 2007 sobre *B. napus* (Malik et al., 2007). En este último trabajo fueron capaces de describir 16 genes específicos de las microsporas que van a dar lugar a la embriogénesis, es decir, estos genes no se expresan en el desarrollo normal del grano de polen, ni en las microsporas en cultivo que no han sufrido todavía ningún estrés. Los 16 genes descritos los clasificaron en tres grupos, en el primer grupo pusieron genes que solo se expresan en la inducción y en el desarrollo del embrión a partir de la microspora pero que también se expresan en el desarrollo cigótico del embrión. En el segundo grupo introdujeron los genes con características idénticas a las del primer grupo pero que además se expresaban en algún tejido de la planta. Y por último en el tercer grupo incluyeron genes que podemos encontrar tanto en el desarrollo embriológico como en tejidos del esporofito, pero se mostraron de forma fiable como marcadores de la androgénesis. Dentro de estos grupos se clasificaron algunos de los genes mencionados anteriormente.

3.2. Androgénesis a partir de meiocitos

En esta tercera ruta (Figura 4), los meiocitos son inducidos a la formación de callos una vez ha tenido lugar la recombinación genética. Tras la formación del callo, los embriones pueden ser obtenidos por embriogénesis u organogénesis. Aunque esta tercera ruta ha sido utilizada con éxito en la obtención de haploides en varias especies, su uso y el conocimiento sobre ella es mucho menor en comparación con el cultivo de anteras. Los

avances que se han logrado en esta ruta se han debido en parte al intento de obtener individuos haploides en especies que se han mostrado recalcitrantes. Este cultivo ha sido principalmente el tomate, aunque también se han realizado trabajos en los que ha respondido al cultivo de anteras (Seguí-Simarro & Nuez, 2007). Toda información relevante sobre este apartado ha sido muy bien recogida por Seguí-Simarro (Seguí-Simarro, 2010).

Al igual que en el caso de la androgénesis derivada de microsporas, los dos factores más importantes a tener en cuenta a la hora de inducir la androgénesis son el genotipo y el estadio del meiocito. El estadio óptimo ha estado en discusión en varios trabajos, pero todo parece indicar que sería una vez pasada la profase 1 de la meiosis y antes de que se formen las membranas celulares de la tétrada que darán lugar a las jóvenes microsporas. Hay que tener en cuenta que para obtener individuos haploides la inducción debe producirse al final de la telofase 2.

El resultado que vamos a obtener tras la inducción presenta tres escenarios diferentes, el primero se da a partir de las células de la tétrada con dotación cromosómica haploide. El segundo se da tras la duplicación cromosómica espontánea en una de las células del escenario uno, dando lugar a un callo diploide del que se obtendría verdaderos doble haploides. Y el tercer escenario se daría por la fusión de dos de los núcleos de la tétrada, dando lugar a organismos diploides heterocigotos. Esta es una de las razones por la que la androgénesis a partir de meiocitos no podría emplearse en la producción de doble haploides. Además, habría que añadir la sensibilidad de la fase, es decir, todos los eventos tendrían lugar en la meiosis. En la cual una pequeña interrupción o alteración puede dar lugar a un resultado totalmente diferente al esperado. También ha resultado muy difícil el cultivo de meiocitos in vitro. Estas razones han hecho que la mayoría de los estudios se centren en el cultivo de anteras.

Aunque este método parece no tener sitio en la obtención de individuos haploides, hay que tener en cuenta que se trata de una fase desdiferenciada de la planta y que si se sigue investigando se pueden obtener resultados muy interesantes en la obtención de doble haploides.

4. ANDROGENESIS EN PIMIENTO

4.1. Historia e importancia del cultivo de pimiento

El género *Capsicum* originario de la parte tropical de Sudamérica, se ha extendido a lo largo de todo el mundo en nuestros días (Pickersgill, 1997). El nombre que recibe varía en función de la región, así como la variedad predominante en la zona e incluso la forma en la que se conservan o consumen estos frutos. Estas características podríamos decir que se dan en la mayoría de las especies de la familia de las solanáceas, como son el tomate, la patata, la berenjena o el tabaco.

De las más de 20 especies que podemos encontrar dentro del género *Capsicum* solo cinco fueron domesticadas: *C. annum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, y *C. pubescens* (Pickersgill, 1997). Gracias a los programas de mejora, hoy en día podemos encontrar un gran número de variedades diferentes con características muy concretas. La selección artificial que se ha producido de forma tradicional en algunas regiones también ha aportado una gran diversificación de las diferentes especies, aunque actualmente como ocurre en la mayoría de los cultivos, las poblaciones son muy homogéneas debido a la producción de semillas por las empresas en este sector. En nuestros días toda la producción de pimiento se da a partir de las semillas de casas comerciales. Esta producción según los datos de FAOSTAT en 2018 fue de 36.771.482 toneladas en una superficie de 1.990.423 hectáreas, situándose en el puesto número 32 en producción dentro de la lista de los cultivos primarios propuesta por FAOSTAT. El mayor productor de pimiento es con diferencia China con unas 18.184.711 toneladas en el año 2018, a este país le siguen México, Turquía, Indonesia y España (1.275.457 toneladas). Cuando se trata de la producción de pimiento seco el gran productor es India con 1.808.011 toneladas (Figura 7).

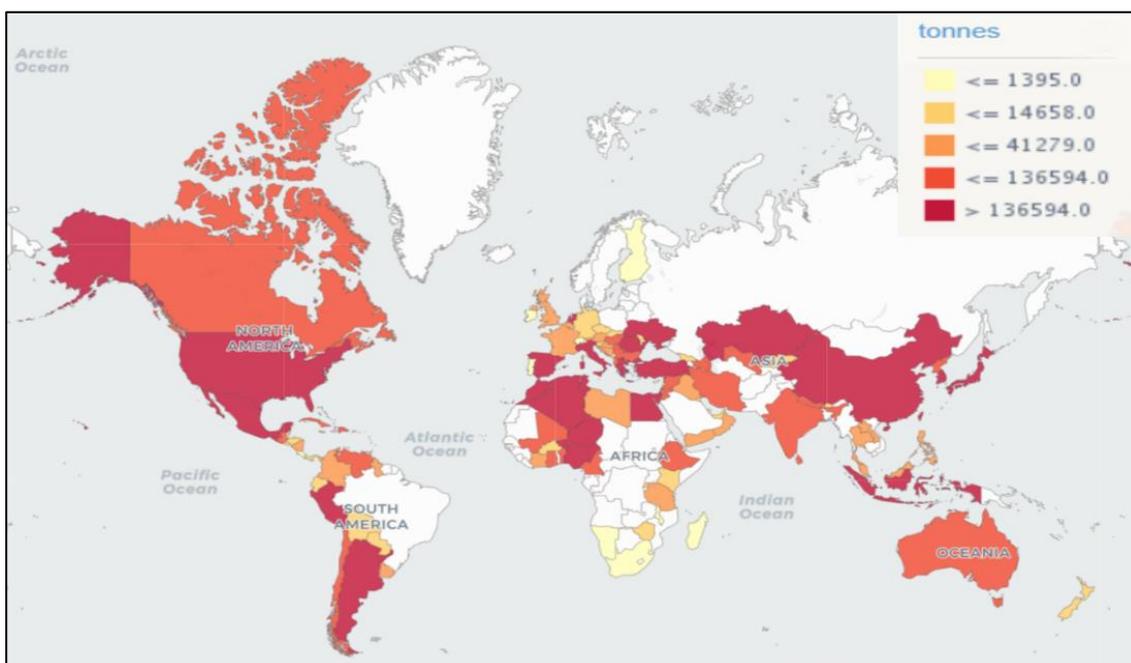


Figura 7. Representación de los principales productores de pimiento en valores de toneladas. Mapa cogido de <https://faostat.fao.org>.

4.2. Revisión de protocolos para la obtención de doble haploides en pimiento

Con los datos visto anteriormente, el desarrollo de protocolos de androgénesis en pimiento está más que justificado. Es por esto que tanto equipos de investigación como empresas privadas han trabajado y están trabajando en su desarrollo. Sus aplicaciones ya vistas con anterioridad son una herramienta muy importante en muchos campos, pero donde más terreno han ganado y se han asentado como imprescindibles es en los

programas de mejora genética. Actualmente todos los protocolos que se desarrollan en pimiento parten de 4 protocolos principales que se han desarrollado con éxito. Estos protocolos son: el método de Dumas de Vault, el método bifásico de Dolcet-Sanjuan (Dolcet-Sanjuan et al., 1997), a través de la eliminación del tejido de la antera (Supena et al., 2006) y a partir de microsporas aisladas (Maluszynski et al., 2003).

4.2.1. Método de Dumas Vault

El método de Dumas Vault se basa en la modificación de los primeros protocolos de androgénesis en pimiento que aparecieron en 1973 en el continente asiático (George & Narayanaswamy, 1973; Kuo et al., 1973; Wang et al., 1973). Estos protocolos sencillos consistían en la recogida de los botones florales en estados óptimos (diferentes en función del artículo, aunque todos dentro del rango óptimo de inducción a la androgénesis), desinfección de los botones florales, colocación en un medio de inducción y posterior sometimiento a un tratamiento térmico. Tanto la composición de los medios como el posterior tratamiento térmico variaba entre los diferentes protocolos. La producción de individuos haploides en estos protocolos era muy baja de forma directa, es decir, en la mayoría de los casos para conseguir embriones haploides era necesaria su inducción a partir de la formación de callos. La obtención de embriones haploides de forma directa variaba entre 1%-28% dependiendo del protocolo, obteniendo incluso en la misma antera la formación de callos y embriones (Figura 8).

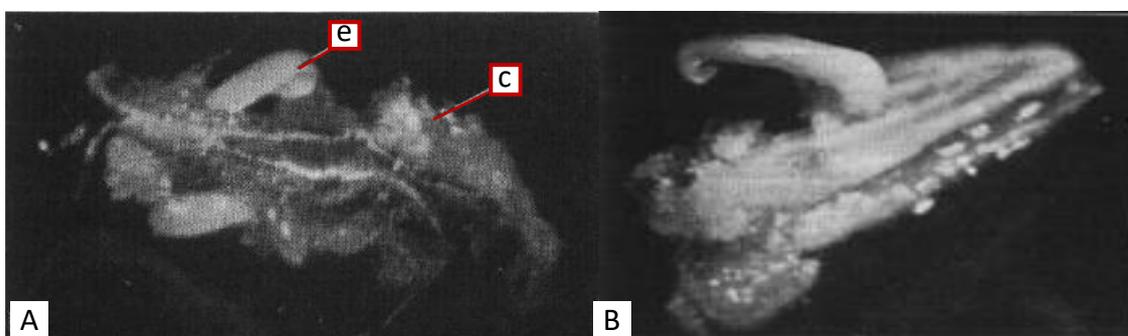


Figura 8. A) Formación de un embrión (e) y un callo (c) en la misma antera. B) Desarrollo de un embrión en estado más avanzado. Figura tomada de Wang et al., 1973.

El grupo de Dumas Vault consiguió la obtención de embriones sin pasar por la fase de callo. Para lograrlo establecieron la composición de dos medios de cultivo consecutivos que hoy en día son los más utilizados junto al medio MS (Murashige & Skoog, 1962). El protocolo consistía en un tratamiento sobre el cultivo de anteras a alta temperatura (35°C) durante 8 días, en condiciones de oscuridad. Seguido a este tratamiento transfirieron las anteras a un nuevo medio de cultivo de regeneración durante 4 días, a 25°C y con fotoperiodo de 12 horas. Este protocolo ha sido desarrollado en más especies y ha sido estudiado a fondo por muchos otros autores. Por ejemplo, en un trabajo llevado a cabo por Parra-Vega y colaboradores estudiaron la respuesta de varias

variedades comerciales de pimiento frente a diferentes días bajo este tratamiento térmico (Parra-Vega et al., 2013). El acceso a los trabajos de Dumas Vaulx no ha sido posible por lo que toda la información proviene de otros trabajos (Irikova et al., 2011; Seguí-Simarro, 2016).

4.2.2. Método bifásico de Dolcet-Sanjuan

En este protocolo se propone la utilización de dos medios de cultivos diferentes, uno semisólido en el que se extiende una capa líquida sobre una capa sólida y un segundo medio de cultivo sólido con carbono activado. Otros dos factores importantes en este protocolo son la creación de una atmósfera enriquecida en CO₂ y la sustitución de la sacarosa por maltosa como fuente de carbono (Dolcet-Sanjuan et al., 1997).

Para desarrollar este protocolo utilizaron 14 híbridos proporcionados por una casa de semillas. Las plantas donadoras se cultivaron en invernadero a una temperatura siempre mayor de 18°C, y con un fotoperiodo de 12 horas suplementado con luz artificial. Los botones florales fueron recolectados cuando la mayoría de sus microsporas se encontraban en el estadio de “microspora vacuolada”, encontrando solo alrededor de un 10% de células binucleadas. Para establecer el tamaño óptimo de los botones florales realizaron una tinción sobre las anteras con mitramicina A.

Una vez los botones florales han sido desinfectados y las anteras han sido extraídas, estas fueron puestas en placas de Petri sobre la capa sólida del medio de cultivo. Una vez puestas sobre esta, añadieron la parte líquida del medio de cultivo. La composición de las dos capas del medio de cultivo está basada en el medio de cultivo de Nitsch y Nitsch (Nitsch & Nitsch, 1969), aunque con mayores concentraciones de quelato de hierro y maltosa. La única diferencia que se da entre las dos fases es que la fase sólida contiene carbono activado y gelificante Gelrite. Los cultivos fueron incubados en oscuridad a 7°C por una semana y después a 28°C durante 8 semanas. Los embriones formados en esta primera parte del cultivo fueron trasladados a un nuevo medio de cultivo de regeneración que llamaron PR1. Este medio es parecido a la fase sólida del medio de doble-capa, pero sin carbono activado, además la sustancia gelificante es diferente (Bacto agar). Estos embriones son pasados a un nuevo medio de cultivo PR2 tras unas 3 o 4 semanas de cultivo en el medio PR1, la diferencia que existe entre estos dos medios de cultivo de regeneración es que PR2 contiene sacarosa en vez de maltosa. Durante el desarrollo de las plántulas los cultivos se mantuvieron a 28°C con un fotoperiodo de 16 horas (Figura 9).

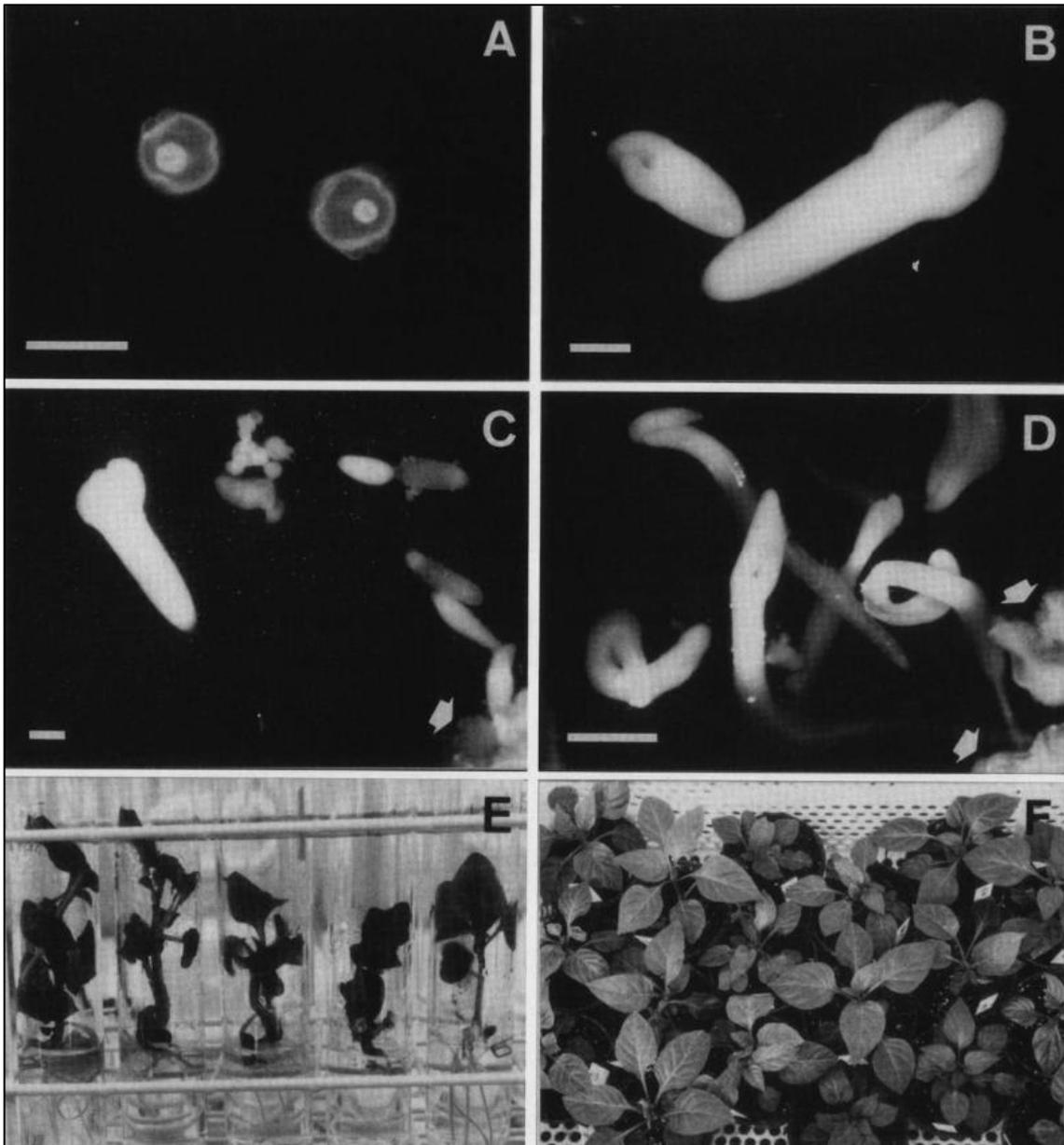


Figura 9. A) células mononucleadas teñidas con mitramicina A (escala = 20 μm), B) embriones androgénicos con desarrollo de los cotiledones (escala = 1 mm), C) mismo embrión rodeado de embriones en diferentes estadios tras dejar la antera (flecha) a las 8 semanas de cultivo (escala = 1 mm), D) embriones a punto de germinar (escala = 5 mm), E) desarrollo de las plántulas en tubos y F) plantas adultas tras la aclimatación. Figura tomada de Dolcet-Sanjuan et al., 1997.

4.2.3. Método de Supena y colaboradores

El protocolo que Supena y colaboradores proponen surge de una revisión experimental de los protocolos conocidos hasta la fecha (Supena et al., 2006). En ese trabajo comparan la eficiencia de 4 protocolos ya establecidos por otros autores, dos de ellos se corresponden con los protocolos de Dumas Vaultx y Dolcet-Sanjuan. Además, estudian como el cambio de las diferentes variables en los diferentes protocolos puede afectar a la eficiencia de estos. Tras analizar como 10 genotipos diferentes de pimiento picante indonesio respondían a los diferentes protocolos, decidieron profundizar en el protocolo

de Dolcet-Sanjuan. Una de las características que define este protocolo es el paso en el que se eliminan los tejidos de las anteras.

Para desarrollar el protocolo emplearon dos variedades de pimiento picante indonesio, las plantas donadoras fueron cultivadas en invernadero de cristal sobre soporte de lana de roca. La temperatura durante el desarrollo de las plantas fue siempre superior a 21°C por el día y superior a 19°C por la noche, además la temperatura nunca superó los 30°C en los meses más calurosos del cultivo. Las plantas fueron guiadas en dos tallos principales, los primeros frutos fueron eliminados de las plantas y además se realizaron podas para favorecer la formación de botones florales. La aplicación de luz artificial fue necesaria en los días de fotoperiodo más corto.

Los botones con el tamaño deseado (pétalos ligeramente más largos que sépalos) fueron recolectados por la mañana y se les aplicó un pretratamiento de 1 día a 4°C. Tras el pretratamiento desinfectaron los botones florales durante 10 minutos en solución compuesta por un 2% de hipoclorito sódico y un 0,05% de Tween-20, seguido a este paso enjuagaron tres veces seguidas los botones florales en agua esterilizada. El tamaño ideal de la flor fue estudiado con anterioridad, asegurándose que más del 50% de las microsporas se encontraban en la fase tardía de la microspora unicelular.

El primer medio de cultivo en el que se van a cultivar las anteras pretratadas responde a las características descritas por Dolcet-Sanjuan (Dolcet-Sanjuan et al., 1997). Aunque difieren un poco en los materiales utilizados, hay que tener en cuenta que este protocolo se ha desarrollado casi diez años más tarde. El medio se compone de una primera fase sólida basada en los componentes del medio de Nitsch (Nitsch & Nitsch, 1969), añadiéndole un 2% de maltosa, entre un 0.5%-1% de carbono activado (Duchefa) y un 0.6% de agar como gelificante (Duchefa). La parte líquida del medio de cultivo también estaba basada en la fórmula de Nitsch, además de un 2% de maltosa. Una vez formado el cultivo de anteras, este es sometido a una temperatura de 9°C durante una semana antes de pasar a su incubación a 28°C durante unas 7 semanas, todo este periodo se da en condiciones de oscuridad. A partir de la segunda y la tercera empieza a ser visible una dehiscencia natural de las anteras (Figura 10), resultando estas en las mayores productoras de embriones haploides. Después de 7 semanas de cultivo, los embriones con un desarrollo normal y con uno o dos cotiledones visibles son traspasados a medio de germinación basado en el medio MS (Murashige & Skoog, 1962). A este medio hay que añadirle un 2% de sacarosa y 0.1µM de 6-Bencilaminopurina, además del agente gelificante al 0.6% (Agar Duchefa). Los embriones fueron mantenidos a una temperatura de 25 °C con un fotoperiodo de 16 horas. A las 3 o 4 semanas bajo estas condiciones las plántulas ya comienzan a mostrar las primeras hojas verdaderas.

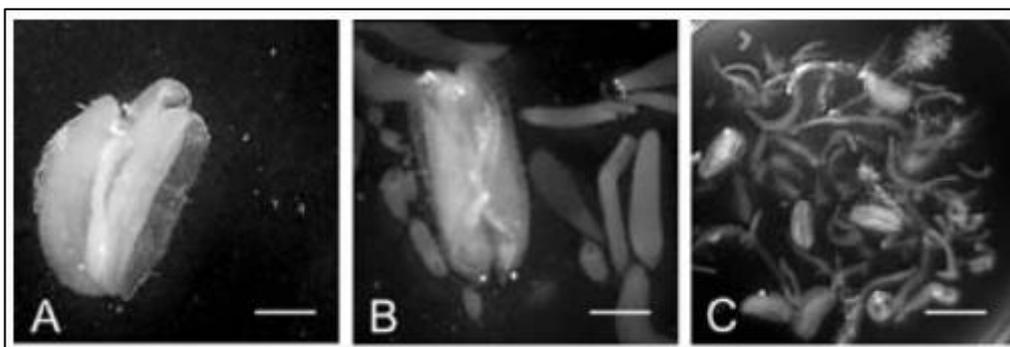


Figura 10. A) antera dehiscente tras 3 semanas de cultivo con proembriones (escala = 1 mm), B) (escala = 1 mm) y C) embriones tras 5 y 6 semanas de cultivo respectivamente (escala = 4 mm). Figura tomada de Supena et al., 2006.

4.2.4. Método a partir de microsporas aisladas

El desarrollo de protocolos en los cuales las microsporas se encuentran aisladas permitiría una mayor eficiencia, ya que todas las células serían candidatas al desarrollo de individuos haploides. Además, se evitaría los posibles efectos del tapetum de la antera, evitando también la formación de callos o embriones por parte de estas células. Por estas razones el cultivo de microsporas aisladas ha sido objeto de estudio de varios autores. En el manual publicado por Maluszynski y colaboradores (Maluszynski et al., 2003) para la producción de doble haploides se recogen protocolos para la obtención de individuos doble haploides en varias especies, entre ellas el pimiento. Estos protocolos han sido menos abordados ya que se trata de protocolos más laboriosos y difíciles como veremos a continuación. Uno de los trabajos más relevantes llevado a cabo en este tipo de protocolos ha sido el realizado por Kim y colaboradores (Kim et al., 2004, 2008, 2013). En este trabajo han conseguido la optimización de este protocolo a lo largo de una serie de años sobre un cultivar de pimiento picante.

Las plantas donadoras fueron sembradas en maceteros de plástico, dos semanas después de la germinación fueron trasladadas a maceteros de mayor tamaño con tierra de cultivo (Bio-media Co. Ltd, Korea) y abono en bajas concentraciones (8g (N:P:K/10:5:10)). Las plantas fueron llevadas al estado adulto en fitotrones a una temperatura de 25/20°C (día/noche), con un fotoperiodo de 16 horas.

El tamaño de los botones florales fue estimado para obtener las microsporas en el estadio óptimo, en este caso en microsporas vacuoladas tardías o microsporas binucleadas tempranas (Kim et al., 2004). Los botones florales fueron esterilizados durante 10 en una solución de hipoclorito sódico al 2 %, y enjuagados 3 veces seguidas en agua estéril destilada. Inmediatamente después unos 30-35 botones florales fueron mezclados con 10ml del medio de pretratamiento (lo veremos más adelante) y puestos en una microlicuadora (Eberbach Corporation, USA) durante 10 segundos a alta velocidad. La mezcla fue transferida a tubos de centrifuga de 50ml, pasados por un Vortex Genie 2 (Scientific Industries, USA) durante 20 segundos a alta velocidad y esta

mezcla fue filtrada (75/38 μ m) antes de pasar a la centrifuga, durante 7 minutos a 700 rpm y 15°C. El sobrenadante fue eliminado, el contenido restante fue resuspendido en 30ml del medio de pretratamiento y se volvió a centrifugar. Por último, se hicieron dos enjuagues con el medio de pretratamiento.

Una vez aisladas las microsporas (Figura 11), se realizó un pretratamiento en el que las microsporas estuvieron 3 días a 30°C en oscuridad. El medio de pretratamiento estaba basado en el medio NLNS pero sin sacarosa y suplementado con 0.37 M de manitol.

Después del pretratamiento, la suspensión de microsporas fue centrifugada a 500rpm durante 5 minutos. Las microsporas aisladas fueron resuspendidas en un medio de cultivo NLNS, este medio es una modificación del medio de Swanson (Swanson, 1990). En este trabajo estudiaron la diferencia entre varios métodos de cultivo: un solo cultivo en fase líquida, un solo cultivo en un cultivo de doble capa (líquida/sólida) y un cultivo en dos fases. De todos ellos el que mayor número de embriones generó y se propuso como medio de cultivo para el protocolo fue el cultivo de doble capa. Este cultivo de doble capa fue estudiado con diferentes capas sólidas (suplementadas todas con un 2% de sacarosa y 0.4 % Phytigel (Sigma, USA)), entre todas ellas la que mostró mejores resultados fue la basada en NLNS pero a mitad de concentración. La capa líquida fue la misma en todos los casos, correspondiéndose con el medio de cultivo donde estaban suspendidas las microsporas. Las condiciones para el medio de cultivo fueron 25°C durante 4 semanas en oscuridad.

Tras las 4 semanas de cultivo los embriones que presentaban ya mostrados los dos cotiledones y se encontraban en buen estado fueron trasplantados a un medio de regeneración (Figura 11). Este medio estaba basado en el medio B5 (Gamborg, 1970), suplementado con un 2% de sacarosa y 0.35% de Phytigel. El cultivo se desarrolló a 25°C bajo un fotoperiodo de 16 horas. A las 8 semanas las plántulas comenzaron a mostrar entre 2 y 5 hojas verdaderas, estas fueron trasplantadas en las mismas condiciones que las plantas donadoras.

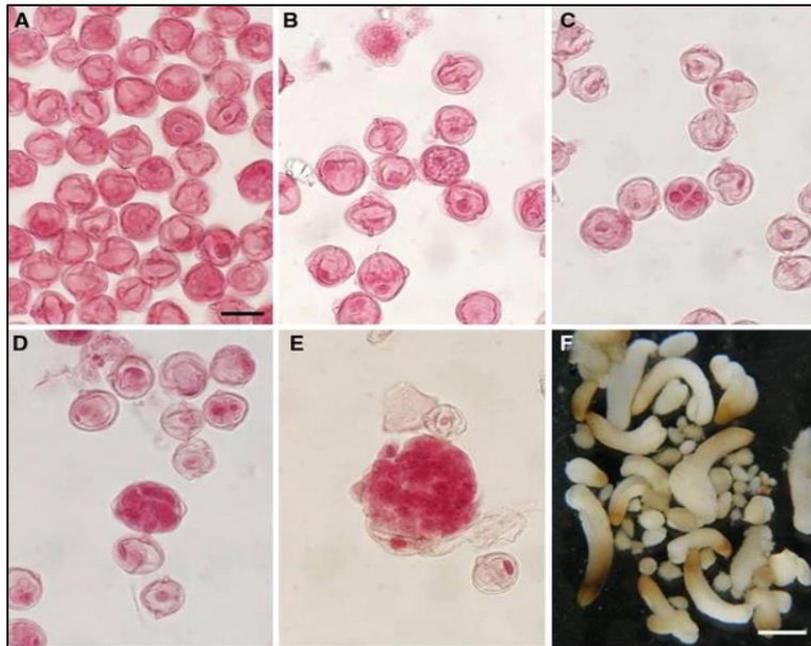


Figura 11. A) microsporas aisladas junto con granos de polen en los primeros estadíos, B) microsporas embriogénicas con pequeñas vacuolas tras 3 días de cultivo, C) microspora multinucleadas tras 4 días de cultivo, D) embrión multicelular tras 7 días de cultivo, E) embrión multicelular tras 9 días de cultivo justo después de romper la capa de exina y F) embriones tras 4 semanas de cultivo (escala A-E = 25 μ m, escala F = 1 mm). Figura tomada de Kim et al., 2008.

5. DISCUSIÓN DE LOS PROTOCOLOS

El cultivo de anteras o de microsporas aisladas se ha establecido como el sistema para la obtención de individuos doble haploides. Como hemos podido ver son muchos los protocolos que se han desarrollado para el pimiento (*Capsicum annuum*). Las diferencias entre estos las podemos encontrar en todos los niveles. Y es que como ya hemos venido hablando a lo largo de este trabajo, el factor más importante a la hora de desarrollar un protocolo es el genotipo de las plantas donadoras, por lo que la idea de desarrollar un protocolo general nunca ha sido realmente abordada. Podríamos decir que los protocolos serían genotípicamente dependientes, teniendo que desarrollarlos a niveles de variedad o incluso inferiores. Esto conllevaría al desarrollo empírico de todos los protocolos, teniendo como base los protocolos aquí mencionados. Este desarrollo empírico puede llegar a ser muy tedioso ya que son muchos los factores que se pueden ajustar en un protocolo, pero entre todos ellos podríamos destacar en vista de los protocolos estudiados que el paso de la inducción sería uno de los más importantes. En estos protocolos el tipo de estrés aplicado siempre ha sido en relación con la temperatura, pasando de los 35°C de Dumas Vaulx, a los 4°C de Supena y colaboradores. Como hemos visto en el apartado de agentes inductores estos pueden ser muy variados y muchos de ellos han sido aplicados con éxito en diversos protocolos. Quizás el hecho de que el desarrollo de protocolos de doble haploides esté asociado estrechamente con los programas de mejora genética, hace que el desarrollo de estos esté orientado a una producción más industrial, es decir, se intentan establecer protocolos que pueden

abarcar un gran número de microsporas o anteras y que pueden ser manejadas en cadena fácilmente. Como podría ser por ejemplo la inducción dentro de una cámara térmica.

Otro punto importante y en el que puede que haya el mayor margen de mejora en los protocolos es en la determinación de las microsporas desdiferenciadas. Aunque la mayoría de las microsporas abortan el desarrollo del grano de polen, no todas llegan a recorrer el camino hacia el embrión haploide/doble haploide. En este caso el papel más importante lo juegan los medios de cultivo y las condiciones de cultivo, como hemos visto estos medios de cultivo utilizan como base medios generales con algunas modificaciones no habiendo muchas diferencias incluso entre protocolos. Esto puede deberse a que el conocimiento sobre como las microsporas toman el camino hacia la embriogénesis es bastante desconocido todavía. En este trabajo hemos visto como han sido identificados algunos genes marcadores de la embriogénesis a partir de microsporas, pero el conocimiento sobre sus rutas de actuación o activación son desconocidas para casi todos ellos. Por lo que los componentes y las condiciones de cultivo no están orientadas a un ambiente específico para el desarrollo de embriones, sino que se basan en ensayos empíricos para establecer las condiciones.

Un buen elemento para comparar los protocolos visto en esta revisión sería la observación de la productividad de estos. Uno de los problemas que encontramos es que los resultados no son presentados de la misma manera en todo ellos. En el método de Dumas Vaulx el objetivo del estudio no era en sí mismo la producción, sino la obtención de un protocolo eficiente en pimiento. Sus resultados fueron expresados como plantas doble haploides aclimatadas en relación con el número de flores recolectadas. El resultado obtenido por Dumas Vaulx fue de 0,8 plantas por cada 100 flores recolectadas. En el método de Dolcet-Sanjuan el resultado fue expresado de la misma manera obteniendo 1,3 plantas por cada 100 flores recolectadas, aunque el análisis estadístico no mostró diferencias con los resultados obtenido por Dumas Vaulx. Donde sí obtuvieron una diferencia significativa fue en la obtención de embriones por número de flores recolectadas, en este caso los datos fueron de 1,6 para el método de Dumas Vaulx y 9,2 para el método de Dolcet-Sanjuan. Esta producción aumenta considerablemente con los protocolos más modernos, en caso de Supena y colaboradores los resultados fueron mostrados como número de plantas doble haploides llevadas a estado adulto provenientes de un solo botón floral. Este resultado fue de 0,1, es decir, se necesitan 10 botones florales para obtener una planta adulta. Este resultado fue mejorado por los trabajos llevados a cabo por Kim y colaboradores, quienes consiguieron obtener 14 plantas por botón floral, ambos trabajos se realizaron sobre variedades de pimiento picante. Este último resultado supera con diferencia al resto de protocolos, pero no podemos perder de vista la importancia del genotipo, por esta razón este protocolo podría obtener resultados muy diferentes en otras variedades o especies de pimiento.

6. CONCLUSIONES

La aplicación de la tecnología doble haploide a través de la androgénesis puede ser una herramienta muy potente en algunas especies. Sin embargo, hemos visto que existe una gran dificultad a la hora de hacer protocolos generales, por lo que es necesario trabajar con protocolos genotípicamente dependientes. En el caso del pimiento, podemos decir que es una especie que responde bien al proceso de androgénesis, en la que se han desarrollado bastante protocolos. El desarrollo de estos ha variado en el propósito y en los resultados, pero de forma general podemos decir que el gran reto que se presenta es conseguir aumentar el número de embriones a partir de microsporas las cuales han paralizado su desarrollo hacia el grano de polen. El conocimiento de esta fase en la que se debe producir la diferenciación hacia el embrión es escaso. Aunque se han conseguido resultados satisfactorios, el conocimiento sobre los genes implicados y sus papeles está todavía por determinar. Por lo que a medida que se vayan conociendo estos procesos se podrían producir protocolos más eficientes.

En la revisión de protocolos de pimiento hemos visto que el mejor resultado obtenido hasta la fecha ha sido el de Kim y colaboradores, a través de microsporas aisladas. A pesar de las ventajas que esta técnica ofrece, como son el material de partida y la eliminación de los tejidos de la antera, se trata del protocolo más tedioso. Por lo que por ahora queda fuera del principal campo de actuación de los doble haploides, la mejora genética. En este campo el desarrollo de doble haploides está pasando a ser una herramienta rutinaria, por lo que no sería de extrañar que se hayan desarrollado investigaciones más profundas y protocolos más eficientes de los que hemos mencionado en este trabajo.

7. BIBLIOGRAFÍA.

- Ahmadi, B., & Ebrahimzadeh, H. (2020). In vitro androgenesis: Spontaneous vs. artificial genome doubling and characterization of regenerants. *Plant Cell Reports*, 39(3), 299-316.
- Amssa, M., Buysse, J. de, & Henry, Y. (1980). Origin of the diploid plants obtained by in vitro anther culture of bread wheat (*Triticum aestivum* L.): Effect of cold pretreatment and of in vitro culture on doubling. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences*, III, 290(15), 1095-1097.
- Bajaj, Y. P. S. (1983). In vitro production of haploids. *Handbook of Plant Cell Culture (USA)*.
- Bárány, I., González-Melendi, P., Fadón, B., Mitykó, J., Risueño, M. C., & Testillano, P. S. (2005). Microspore-derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.): Subcellular rearrangements through development. *Biology of the Cell*, 97(9), 709-722.
- Barinova, I., Clément, C., Martiny, L., Baillieul, F., Soukupova, H., Heberle-Bors, E., & Touraev, A. (2004). Regulation of developmental pathways in cultured microspores of tobacco and snapdragon by medium pH. *Planta*, 219(1), 141-146.
- Beers, E. P., Jones, A. M., & Dickerman, A. W. (2004). The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in Arabidopsis. *Phytochemistry*, 65(1), 43-58.
- Binarova, P., Hause, G., Cenklová, V., Cordewener, J. H. G., & Campagne, M. M. L. (1997). A short severe heat shock is required to induce embryogenesis in late bicellular pollen of *Brassica napus* L. *Sexual Plant Reproduction*, 10(4), 200-208.
- Blakeslee, A. F., Belling, J., Farnham, M. E., & Bergner, A. D. (1922). A Haploid Mutant in the Jimson Weed, «*Datura Stramonium*». *Science*, 55(1433), 646-647.
- Bohanec, B. (2009). Doubled Haploids *via* Gynogenesis. *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, 35-46.
- Boutilier, K., Offringa, R., Sharma, V. K., Kieft, H., Ouellet, T., Zhang, L., Hattori, J., Liu, C.-M., Lammeren, A. A. M. van, Miki, B. L. A., Custers, J. B. M., & Campagne, M. M. van L. (2002). Ectopic Expression of *BABY BOOM* Triggers a Conversion from Vegetative to Embryonic Growth. *The Plant Cell*, 14(8), 1737-1749.
- Cordewener, J. H. G., Busink, R., Traas, J. A., Custers, J. B. M., Dons, H. J. M., & Van Lookeren Campagne, M. M. (1994). Induction of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. is accompanied by specific changes in protein synthesis. *Planta*, 195(1), 50-56.
- Criqui, M. C., & Genschik, P. (2002). Mitosis in plants: How far we have come at the molecular level? *Current Opinion in Plant Biology*, 5(6), 487-493.
- Datta SK. (2005) Androgenic haploids: factors controlling development and its application in crop improvement. *Current Science* 89:1870–1878.

- Dolcet-Sanjuan, R., Claveria, E., & Huerta, A. (1997). Androgenesis in *Capsicum annuum* L.—Effects of Carbohydrate and Carbon Dioxide Enrichment. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 122(4), 468-475.
- Duncan, E. J., & Heberle, E. (1976). Effect of temperature shock on nuclear phenomena in microspores of *Nicotiana tabacum* and consequently on plantlet production. *Protoplasma*, 90(1), 173-17
- Dunwell, J. M. (2010). Haploids in flowering plants: Origins and exploitation. *Plant Biotechnology Journal*, 8(4), 377-424.
- Dwivedi, S. L., Britt, A. B., Tripathi, L., Sharma, S., Upadhyaya, H. D., & Ortiz, R. (2015). Haploids: Constraints and opportunities in plant breeding. *Biotechnology Advances*, 33(6, Part 1), 812-829.
- Ercan, N., Sensoy, F. A., & Sirri Sensoy, A. (2006). Influence of growing season and donor plant age on anther culture response of some pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.). *Scientia Horticulturae*, 110(1), 16-20.
- FAOSTAT. (s. f.-a). Recuperado 27 de octubre de 2020, de <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
- Forster, B. P., Heberle-Bors, E., Kasha, K. J., & Touraev, A. (2007). The resurgence of haploids in higher plants. *Trends in Plant Science*, 12(8), 368-375.
- Gallo-Meagher, M., & Green, J. (2002). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of saw palmetto, an important landscape and medicinal plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68(3), 253-256.
- Gamborg, O. L. (1970). The Effects of Amino Acids and Ammonium on the Growth of Plant Cells in Suspension Culture. *Plant Physiology*, 45(4), 372-375.
- Garrido, D., Eller, N., Heberle-Bors, E., & Vicente, O. (1993). De novo transcription of specific mRNAs during the induction of tobacco pollen embryogenesis. *Sexual Plant Reproduction*, 6(1), 40-45.
- George, L., & Narayanaswamy, S. (1973). Haploid *Capsicum* through experimental androgenesis. *Protoplasma*, 78(4), 467-470.
- Germanà, M. A. (2006). Doubled haploid production in fruit crops. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(2), 131.
- Germanà, M. A. (2011). Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 104(3), 283-300.
- Guha, S., & Maheshwari, S. C. (1964). In vitro Production of Embryos from Anthers of *Datura*. *Nature*, 204(4957), 497-497.
- Harada, J. J. (2001). Role of *Arabidopsis* *LEAFY* *COTYLEDON* genes in seed development. *Journal of Plant Physiology*, 158(4), 405-409.

- Heberle-Bors, E. (1985). In vitro haploid formation from pollen: A critical review. *Theoretical and Applied Genetics*, 71(3), 361-374.
- Hoekstra, S., van Bergen, S., van Brouwershaven, I. R., Schilperoort, R. A., & Wang, M. (1997). Androgenesis in *Hordeum vulgare* L.: Effects of mannitol, calcium and abscisic acid on anther pretreatment. *Plant Science*, 126(2), 211-218.
- Honys, D., & Twell, D. (2004). Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Genome Biology*, 5(11), R85.
- Irikova, T., Grozeva, S., & Rodeva, V. (2011). Anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.) in vitro. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(5), 1559-1570.
- Jensen, C. J. (1974). Chromosome Doubling Techniques in Haploids. *Haploids in Higher Plants: Advances and Potential, Proceedings*, 151-190.
- Jia, Y., Zhang, Q.-X., Pan, H.-T., Wang, S.-Q., Liu, Q.-L., & Sun, L.-X. (2014). Callus induction and haploid plant regeneration from baby primrose (*Primula forbesii* Franch.) anther culture. *Scientia Horticulturae*, 176, 273-281.
- Joosen, R., Cordewener, J., Supena, E. D. J., Vorst, O., Lammers, M., Maliepaard, C., Zeilmaker, T., Miki, B., America, T., Custers, J., & Boutilier, K. (2007). Combined Transcriptome and Proteome Analysis Identifies Pathways and Markers Associated with the Establishment of Rapeseed Microspore-Derived Embryo Development. *Plant Physiology*, 144(1), 155-172.
- Kanniah Rajasekaran, Mich B. Hein, Indra K. Vasil. (1987). Endogenous Abscisic Acid and Indole-3-Acetic Acid and Somatic Embryogenesis in Cultured Leaf Explants of *Pennisetum purpureum* Schum. *Plant Physiology*, 84 (1) 47-51
- Kasha, K. J., & Kao, K. N. (1970). High Frequency Haploid Production in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Nature*, 225(5235), 874-876.
- Kim, M., Jang, I.-C., Kim, J.-A., Park, E.-J., Yoon, M., & Lee, Y. (2008). Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Reports*, 27(3), 425-434.
- Kim, M., Kim, J., Yoon, M., Choi, D.-I., & Lee, K.-M. (2004). Origin of Multicellular Pollen and Pollen Embryos in Cultured Anthers of Pepper (*Capsicum Annuum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77(1), 63-72.
- Kim, M., Park, E.-J., An, D., & Lee, Y. (2013). High-quality embryo production and plant regeneration using a two-step culture system in isolated microspore cultures of hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 112(2), 191-201.
- Kuo John-shang, Wang Yu-ying, Chien Nan-fan, Ku Shu-jong, Kung Ming-liang and Hsu Hui-chun.(1973). Investigations on the Anther Culture in Vitro of *Nicotiana tabacum* L. and *Capsicum Annuum* L. *Journal of Integrative Plant Biology*, 15(1).

- Kyo, M., & Harada, H. (1990a). Specific phosphoproteins in the initial period of tobacco pollen embryogenesis. *Planta*, 182(1), 58-63.
- Kyo, M., & Harada, H. (1990b). Phosphorylation of Proteins Associated with Embryogenic Dedifferentiation of Immature Pollen Grains of *Nicotiana rustica*. *Journal of Plant Physiology*, 136(6), 716-722.
- Lantos, C., Juhász, A. G., Somogyi, G., Ötvös, K., Vági, P., Mihály, R., Kristóf, Z., Somogyi, N., & Pauk, J. (2009). Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 97(3), 285-293.
- Lemonnier-Le Penhuizic, C., Chatelet, C., Kloareg, B., & Potin, P. (2001). Carrageenan oligosaccharides enhance stress-induced microspore embryogenesis in *Brassica oleracea* var. *Italica*. *Plant Science*, 160(6), 1211-1220.
- Maheshwari, S. C., Rashid, A., & Tyagi, A. K. (1982). Special Paper: Haploids from Pollen Grains—Retrospect and Prospect. *American Journal of Botany*, 69(5), 865-879.
- Malik, M. R., Wang, F., Dirpaul, J. M., Zhou, N., Polowick, P. L., Ferrie, A. M. R., & Krochko, J. E. (2007a). Transcript Profiling and Identification of Molecular Markers for Early Microspore Embryogenesis in *Brassica napus*. *Plant Physiology*, 144(1), 134-154.
- Maluszynski, M., Kasha, K. J., & Szarejko, I. (2003). Published doubled haploid protocols in plant species. *Doubled Haploid Production in Crop Plants*, 309-335.
- Maraschin, S. F., de Priester, W., Spaink, H. P., & Wang, M. (2005). Androgenic switch: An example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *Journal of Experimental Botany*, 56(417), 1711-1726.
- McKone, M. J., & Halpern, S. L. (2003). The Evolution of Androgenesis. *The American Naturalist*, 161(4), 641-656.
- Mitykó, J., Andrásfalvy, A., Csilléry, G., & Fári, M. (1995). Anther-culture response in different genotypes and F1 hybrids of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Breeding*, 114(1), 78-80.
- Murashige T & Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-97, 1962. (s. f.). 1.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Nitsch, J. P., & Nitsch, C. (1969). Haploid Plants from Pollen Grains. *Science*, 163(3862), 85-87.
- Palmer, C. E. D., Keller, W. A., Keller, W. A., Kasha, K. J., & Kasha, K. (2005). Haploids in Crop Improvement II. Springer Science & Business Media.
- Parra-Vega, V., Renau-Morata, B., Sifres, A., & Seguí-Simarro, J. M. (2013a). Stress treatments and in vitro culture conditions influence microspore embryogenesis and

- growth of callus from anther walls of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 112(3), 353-360.
- Pechan, P. M., Bartels, D., Brown, D. C., & Schell, J. (1991). Messenger-RNA and protein changes associated with induction of *Brassica* microspore embryogenesis. *Planta*, 184(2), 161-165.
 - Pechan, Paul M., & Smykal, P. (2008). Androgenesis: Affecting the fate of the male gametophyte. *Physiologia Plantarum*, 111(1), 1-8.
 - Petolino, J. F., & Thompson, S. A. (1987). Genetic analysis of anther culture response in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 74(2), 284-286.
 - Pickersgill, B. (1997). Genetic resources and breeding of *Capsicum spp.* *Euphytica*, 96(1), 129-133.
 - Powell, W. (1990). Environmental and Genetical Aspects of Pollen Embryogenesis. *Haploids in Crop Improvement I*, 45-65.
 - Pulido, A., Bakos, F., Devic, M., Barnabás, B., & Olmedilla, A. (2009). *HvPG1 and ECA1: Two genes activated transcriptionally in the transition of barley microspores from the gametophytic to the embryogenic pathway.* *Plant Cell Reports*, 28(4), 551-559.
 - Rahman, M., & Michalak de Jiménez, M. (2016). Behind the scenes of microspore-based double haploid development in *Brassica napus*: A review. *Journal of Plant Science and Molecular Breeding*, 5(1), 1.
 - Rajasekaran, K., Hein, M. B., & Vasil, I. K. (1987). Endogenous Abscisic Acid and Indole-3-Acetic Acid and Somatic Embryogenesis in Cultured Leaf Explants of *Pennisetum purpureum* Schum.: Effects in Vivo and in Vitro of Glyphosate, Fluridone, and Paclobutrazol. *Plant Physiology*, 84(1), 47-51.
 - Razdan, M. K. (2003). *Introduction to Plant Tissue Culture.* Science Publishers.
 - Reynolds, T. L. (North C. U., & Crawford, R. L. (1996). Changes in abundance of an abscisic acid-responsive, early cysteine-labeled metallothionein transcript during pollen embryogenesis in bread wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Molecular Biology (Netherlands)*.
 - Rieger, R., Michaelis, A., & Green, M. M. (2012). *Glossary of Genetics and Cytogenetics: Classical and Molecular.* Springer Science & Business Media.
 - Řihová, L., Čapková, V., & Tupý, J. (1996). Changes in Glycoprotein Patterns Associated with Male Gametophyte Development and with Induction of Pollen Embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Physiology*, 147(5), 573-581.
 - Rudolf, K., Bohanec, B., & Hansen, M. (1999). Microspore culture of white cabbage, *Brassica oleracea var. capitata* L.: Genetic improvement of non-responsive cultivars and effect of genome doubling agents. *Plant Breeding*, 118(3), 237-241.

- Seguí-Simarro, J. M., & Nuez, F. (2008). How microspores transform into haploid embryos: Changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 134(1), 1-12.
- Seguí-Simarro, José M. (2010). Androgenesis Revisited. *The Botanical Review*, 76(3), 377-404.
- Seguí-Simarro, Jose M. (2016). Androgenesis in *Solanaceae*. *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants*, 209-244.
- Seguí-Simarro, José M., & Nuez, F. (2007). Embryogenesis induction, callogenesis, and plant regeneration by in vitro culture of tomato isolated microspores and whole anthers. *Journal of Experimental Botany*, 58(5), 1119-1132.
- Seguí-Simarro, J. M., Testillano, P. S., & Risueño, M. C. (2003). Hsp70 and Hsp90 change their expression and subcellular localization after microspore embryogenesis induction in *Brassica napus L.* *Journal of Structural Biology*, 142(3), 379-391.
- Shariatpanahi, M. E., Bal, U., Heberle-Bors, E., & Touraev, A. (2006). Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 127(4), 519-534.
- Sharma, A., & Sharma, A. (2014). *Chromosome Techniques: Theory and Practice*. Butterworth-Heinemann.
- Smalle, J., & Vierstra, R. D. (2004). The Ubiquitin 26s Proteasome Proteolytic Pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 555-590.
- Sonnino, A., Ancora, G., & Locardi, C. (1986). In vitro mutation breeding of potato.
- Sunderland, N., N, S., & JM, D. (1977). Anther and pollen culture.
- Sunderland, N., & Roberts, M. (1979). Cold-pretreatment of Excised Flower Buds in Float Culture of Tobacco Anthers. *Annals of Botany*, 43(4), 405-414.
- Supena, E. D. J., Suharsono, S., Jacobsen, E., & Custers, J. B. M. (2006). Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum L.*). *Plant Cell Reports*, 25(1), 1-10.
- Swanson, E. B. (1990). Microspore Culture in Brassica. *Plant Cell and Tissue Culture*, 159-169.
- Thomas, W. T. B., Forster, B. P., & Gertsson, B. (2003). Doubled haploids in breeding. *Doubled Haploid Production in Crop Plants*, 337-349.
- Touraev, A., Pfosser, M., Vicente, O., & Heberle-Bors, E. (1996). Stress as the major signal controlling the developmental fate of tobacco microspores: Towards a unified model of induction of microspore/pollen embryogenesis. *Planta*, 200(1), 144-152.
- Touraev, Alisher, Forster, B. P., & Jain, S. M. (Eds.). (2009). *Advances in haploid production in higher plants*. Springer.

- Touraev, Alisher, Ilham, A., Vicente, O., & Heberle-Bors, E. (1996). Stress-induced microspore embryogenesis in tobacco: An optimized system for molecular studies. *Plant Cell Reports*, 15(8), 561-565.
- Touraev, Alisher, Pfosser, M., & Heberle-Bors, E. (2001). The microspore: A haploid multipurpose cell. En *Advances in Botanical Research* (Vol. 35, pp. 53-109). Academic Press.
- Van Bergen, S., Kottenhagen, M. J., van der Meulen, R. M., & Wang, M. (1999). The Role of Abscisic Acid in Induction of Androgenesis: A Comparative Study Between *Hordeum vulgare* L. Cvs. *Igri* and Digger. *Journal of Plant Growth Regulation*, 18(3), 135-143.
- Wang, H. M., Enns, J. L., Nelson, K. L., Brost, J. M., Orr, T. D., & Ferrie, A. M. R. (2019). Improving the efficiency of wheat microspore culture methodology: Evaluation of pretreatments, gradients, and epigenetic chemicals. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 139(3), 589-599.
- Wang, Mei, Bergen, S. van, & Duijn, B. V. (2000). Insights into a Key Developmental Switch and Its Importance for Efficient Plant Breeding. *Plant Physiology*, 124(2), 523-530.
- Wang Y-Y, Sun C-S, Wang C-C, Chien N-F (1973) The induction of the pollen plantlets of triticale and *Capsicum annuum* from anther culture. *Scientia Sinica* 16:147–151.
- Wędzony, M., Forster, B. P., Żur, I., Golemić, E., Szechyńska-Hebda, M., Dubas, E., Gotębiowska, G., & Wędzony, M. (2009). Progress in Doubled Haploid Technology in Higher Plants. *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, 1-33.
- Yang, H. Y., & Zhou, C. (1982). In vitro induction of haploid plants from unpollinated ovaries and ovules. *Theoretical and Applied Genetics*, 63(2), 97-104.
- Zeevaart, J. A. D., & Creelman, R. A. (1988). Metabolism and Physiology of Abscisic Acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39(1), 439-473.
- Zhao, J., & Simmonds, D. H. (1995). Application of trifluralin to embryogenic microspore cultures to generate doubled haploid plants in *Brassica napus*. *Physiologia Plantarum*, 95(2), 304-309.
- Zhao, J., Simmonds, D. H., & Newcomb, W. (1996a). High frequency production of doubled haploid plants of *Brassica napus* cv. *Topas* derived from colchicine-induced microspore embryogenesis without heat shock. *Plant Cell Reports*, 15(9), 668-671.
- Zhao, J.-P., Simmonds, D. H., & Newcomb, W. (1996b). Induction of embryogenesis with colchicine instead of heat in microspores of *Brassica napus* L. cv. *Topas*. *Planta*, 198(3), 433-439.
- Zonia, L. E., & Tupý, J. (1995). Lithium treatment of *Nicotiana tabacum* microspores blocks polar nuclear migration, disrupts the partitioning of membrane-associated Ca²⁺, and induces symmetrical mitosis. *Sexual Plant Reproduction*, 8(3), 152-160.