



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

**GENERACIÓN DE DOBLE HAPLOIDES MEDIANTE GINOGÉNESIS, UNA
ESTRATEGIA BIOTECNOLÓGICA PARA LA MEJORA GENÉTICA DE
MELÓN (*CUCUMIS MELO*) Y PEPINO (*CUCUMIS SATIVUS*)**

TRABAJO FIN DE MÁSTER
MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL Y AGROALIMENTARIA

Rojas Casado, María del Carmen

Tutor: Yuste Lisbona, Fernando Juan

Departamento de Biología y Geología
Área de Genética

Noviembre, 2020

Índice general

Índice de Figuras.....	4
Índice de Tablas.....	5
Resumen.....	6
Palabras clave.....	6
Abstract.....	7
Keywords.....	7
Objetivos.....	8
1. Cucurbitáceas.....	9
1.1. Importancia del cultivo de cucurbitáceas.....	10
1.2. <i>Cucumis melo</i>	11
1.2.1. Taxonomía <i>Cucumis melo</i>	11
1.2.2. Características morfológicas de <i>Cucumis melo</i>	12
1.2.3. Origen de <i>Cucumis melo</i>	13
1.3. <i>Cucumis sativus</i>	14
1.3.1. Taxonomía <i>Cucumis sativus</i>	14
1.3.2. Características morfológicas de <i>Cucumis sativus</i>	14
1.3.3. Origen de <i>Cucumis sativus</i>	16
1.4. Doble haploides como herramienta biotecnológica para la mejora de cucurbitáceas.....	17
2. Ginogénesis.....	20
2.1. Ginogénesis <i>in situ</i>	21
2.2. Ginogénesis <i>in vitro</i>	22
2.3. Ventajas e inconvenientes de la ginogénesis.....	22
2.4. Ginogénesis vs. androgénesis en cucurbitáceas.....	23

3. Ginogénesis en melón	25
3.1. Cultivo <i>in vitro</i> de óvulos.....	26
3.1.1 Modificaciones del protocolo de cultivo <i>in vitro</i> de óvulos en <i>C. melo</i>	27
3.2. Cultivo de <i>in vitro</i> ovarios.....	28
3.2.1 Comparación de los protocolos de cultivo <i>in vitro</i> de ovarios en <i>C. melo</i>	29
3.3 Ginogénesis <i>in situ</i> con polen irradiado.....	30
3.4. Eficiencia de la obtención/producción de doble haploides en melón.....	32
4. Ginogénesis en pepino.....	33
4.1. Cultivo <i>in vitro</i> de óvulos	34
4.1.1 Singularidades del protocolo de cultivo <i>in vitro</i> de óvulos en <i>C. sativus</i>	37
4.2. Cultivo <i>in vitro</i> de ovarios.....	38
4.2.1 Comparación de los protocolos de cultivo <i>in vitro</i> de ovarios en <i>C. sativus</i>	42
4.3. Eficiencia de la obtención/producción de doble haploides en pepino..	43
Conclusiones.....	45
Bibliografía.....	46

Índice de Figuras

Figura 1. Relación filogenética orden Cucurbitales.....	9
Figura 2. Página 1011 de Species Plantarum (1753), por Carlos Linneo.....	11
Figura 3. Ilustración de la morfología de <i>C. melo</i>	13
Figura 4. Página 1012 de Species Plantarum (1753), por Carlos Linneo.....	15
Figura 5. Ilustración de la morfología de <i>C. sativus</i>	16
Figura 6. Representación de ovario de angiosperma.....	20
Figura 7. Comparación general entre los procesos de androgénesis y ginogénesis.....	24
Figura 8. Cultivo <i>in vitro</i> en medio MS de un óvulo de <i>C. melo</i>	27
Figura 9. Planta regenerada de <i>C. melo</i>	27
Figura 10. Embriogénesis y regeneración de plantas a partir del cultivo de ovario no fecundado de melón (<i>C. melo L.</i>) (A) Rodajas de ovario en medio de inducción; (B) Embriones germinando; (C) Organogénesis de la raíz; (D) Planta regenerada.....	29
Figura 11. Embrión haploide extraído de la semilla 3 semanas después de la polinización.....	32
Figura 12. Crecimiento de las partes del ovario de pepino y óvulos extraídos en el medio de nutrición en placa de Petri (10 cm.) después de 14 días.....	35
Figura 13. Inducción ginogénica después de 4 semanas de cultivo en el medio IMC.....	35
Figura 14. Óvulos con ginogénesis inducida en medio de regeneración CBM...36	
Figura 15. A. Formación de raíces en el medio de la MS; B. Adaptación de plantas regeneradas a condiciones in vivo; C. Plantas regeneradas.....	37
Figura 16. Diferentes estadios florales de <i>C. sativus</i>	39
Figura 17. Procedimiento de corte de ovario de <i>C. sativus</i>	40

Figura 18. Diagrama de flujo de regeneración vegetal a través de cultivo de ovario por ginogénesis *in vitro* en pepino.....41

Índice de Tablas

Tabla 1. Taxonomía de *C. melo*.....11

Tabla 2. Taxonomía de *C. sativus*.....15

Tabla 3. Diferentes cultivos de óvulos y ovarios.....22

Tabla 4. Diferentes medios CBM.....42

Resumen

La obtención de doble haploides mediante ginogénesis es una novedosa técnica que se utiliza dentro del campo de la mejora vegetal, la cual se basa en la producción de embriones haploides a partir de células del gametofito femenino, siempre y cuando no haya ocurrido el proceso de fecundación. Una vez obtenidas las plantas haploides, se obtienen individuos doble haploides por un proceso de duplicación cromosómica que puede ser espontáneo o inducido y que da lugar a plantas homocigotas para todos sus *loci*. En este trabajo, se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica sobre las diferentes técnicas de ginogénesis que se utilizan en *Cucumis melo* y *Cucumis sativus*, dos de los cultivos más importantes dentro de la familia. La metodología comúnmente más empleada en *C. melo* para la obtención de plantas haploides es la técnica de ginogénesis *in situ* inducida por polen irradiado, a pesar del inconveniente que representan la adquisición del aparataje para la irradiación del polen. En el caso de *C. sativus*, la técnica más utilizada es la de ginogénesis *in vitro* basada en el cultivo de ovarios, por ser la más eficiente y requerir de una metodología más sencilla. En ambas especies, debido a los bajos porcentajes de generación espontánea de plantas doble haploides obtenidos, estas técnicas de ginogénesis suelen estar acompañadas de un tratamiento con colchicina como agente inductor de duplicación cromosómica que da lugar a plantas doble haploides que podrán ser utilizadas directamente como un nuevo cultivar, o como parentales para la obtención de híbridos comerciales.

Palabras clave

Cucurbitáceas, Haploide, Cultivo de ovarios, Cultivo de óvulos.

Abstrac

Obtaining double haploids by gynogenesis is a innovative technique used within the field of plant improvement, which is based on the production of haploid embryos from the cells of the female gametophyte if the fertilization process has not occurred. Once haploid plants are obtained, double haploid individuals are obtained by a chromosomal duplication process which can be spontaneous or induced giving rise to homozygous plants for all its loci. In this work, a bibliographic review has been carried out on the different techniques of gynogenesis used in *Cucumis melo* and *Cucumis sativus*, two of the most important crops within the family of Cucurbits. The most used methodology in *C. melo* for obtaining haploid plants is the technique of *in situ* gynogenesis induced by irradiated pollen, despite the inconvenience of acquiring the equipment for pollen irradiation. In the case of *C. sativus*, the most used technique is *in vitro* gynogenesis which is based on the cultivation of ovaries, being the most efficient and requiring a simpler methodology. In both species, due to the low percentages of spontaneous generation of double haploid plants obtained, these gynogenesis techniques are usually accompanied by a colchicine treatment as a chromosomal duplication inducing agent which results in double haploid plants that can be used directly as a new cultivar, or as parents for obtaining commercial hybrids.

Keywords

Cucurbits, Haploid, Ovary culture, Ovule culture.

Objetivos

El desarrollo de técnicas biotecnológicas que permitan optimizar la agricultura y la producción de alimentos contribuye a mejorar los cultivos y a fomentar mejores prácticas agrícolas para una agricultura sostenible. Una de estas técnicas es la obtención de doble haploides, los cuales están facilitando la mejora de las especies cultivadas acelerando el proceso de obtención de nuevos cultivares para explotación comercial. El presente Trabajo Fin de Máster tiene como principal objetivo la revisión de las diferentes técnicas de ginogénesis empleadas para la obtención de haploides y doble haploides en melón (*Cucumis melo*) y en pepino (*C. sativus*). Para ello, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Definir las características morfológicas y taxonómicas de ambas especies, *C. melo* y *C. sativus*, así como justificar la importancia económica y alimentaria de ambos cultivos.
2. Exponer la importancia de la utilización de doble haploides como herramienta biotecnológica para la mejora de cucurbitáceas.
3. Describir el proceso de ginogénesis en todas sus variantes, y comparar este proceso con su análogo, la androgénesis.
4. Revisar las diferentes técnicas de ginogénesis aplicadas a *C. melo* y a *C. sativus* y comparar la eficiencia de cada una de las diferentes técnicas empleadas.

1.1. Importancia del cultivo de cucurbitáceas

El cultivo de cucurbitáceas es muy importante alrededor de todo el mundo debido a las propiedades nutricionales de las especies que integran esta familia. Las cucurbitáceas poseen los elementos nutricionales, vitaminas y minerales esenciales necesarios en la alimentación humana. A su vez poseen un alto contenido en agua, por lo que en países tropicales y subtropicales están muy integrados en su gastronomía (Jamuna *et al.*, 2015). Es por ello por lo que entre las especies que integran esta familia estén algunas de las hortalizas más cultivadas del mundo como *C. melo*, *C. sativus*, *Citrullus lanatus* (sandía) o *Cucurbita maxima* (calabaza) (Schaefer y Renner, 2011).

Pero esta familia no solo es importante por su papel en la industria alimentaria, si no que está presente en otras áreas que generan mucho flujo monetario. A algunas especies de esta familia se le atribuyen propiedades medicinales y farmacológicas, es por ello por lo que también son una fuente de materia prima para la industria cosmética y farmacológica (Salma, 2006). De hecho, muchas especies poseen compuestos extraíbles muy interesantes desde el punto de vista médico. Un ejemplo de ello es *Solena amplexicaulis*, a partir del cual se ha extraído un compuesto químico llamado forskolina, que tiene propiedades antihipertensivas, antiinflamatorias y antidiabéticas. Por otra parte, *Citrullis colocynthis* también tiene componentes con propiedades antiinflamatorias y antidiabéticas, así como, también posee compuestos analgésicos y antiepilépticos.

Otras especies más conocidas en el ámbito alimentario también tienen propiedades farmacológicas, como es el caso de la sandía (*C. lanatus*) la cual posee efecto antidiurético. También se destaca el caso del pepino (*C. sativus*) con efectos diuréticos y vermífugos. Por el uso multidisciplinar de esta familia, se hace notable la importancia de su cultivo y de la mejora de los individuos, para obtener de este modo, una mayor rentabilidad y eficiencia (Jamuna *et al.*, 2015).

Una idea aproximada de la cantidad que se produce de estos productos la recoge <http://faostat.fao.org> en su base de datos. Según esta organización se produjeron tan solo en el año 2018 en España 664353 toneladas de *C. melo* (Garcia-Mas *et al.*, 2012) y 663661 toneladas de *C. sativa* (FAOSTAT, 2020).

Con estas cifras es difícil imaginarse hasta que magnitudes llegan las producciones de estos productos.

1.2. *Cucumis melo*

1.2.1. Taxonomía *C. melo*

C. melo es una especie vegetal perteneciente a la división *Magnoliophyta*, grupo antiguamente conocido como *Angiospermae*, denominado por Linneo en 1735 y reclasificado por Cronquist *et al.*, en 1966. Perteneciente a la Familia de las Cucurbitáceas y al género *Cucumis* al que también pertenecen especies tan conocidas como *C. sativus*, *Cucumis metuliferus* o *Cucumis anguria*. En la Tabla 1 se resume la taxonomía de *C. melo* (CONABIO, 2005).

Esta especie fue descrita por primera vez por Carlos Linneo en 1753 y publicada en *Species Plantarum 2: 1011*. El extracto de la página citada se muestra en la Figura 2.

Tabla 1. Taxonomía de *C. melo*.

Fuente: CONABIO, 2005.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Cucurbitales
Familia	Cucurbitaceae
Género	<i>Cucumis</i> L., 1753
Especie	<i>C. melo</i> L., 1753

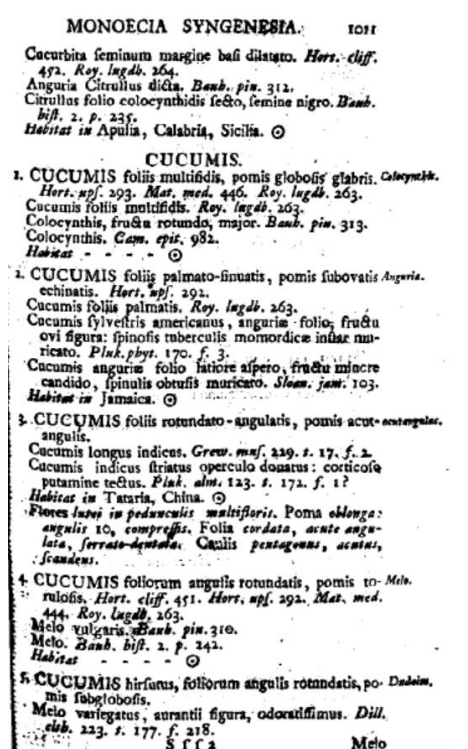


Figura 2. Página 1011 de *Species Plantarum* (1753), por Carlos Linneo. Figura extraída de <http://www.botanicus.org>.

1.2.2. Características morfológicas de *C. melo*

C. melo L.; Sp. PL:1011 (1753) es una planta monoica diploide eucotiledonea con 24 cromosomas. Como ya se ha mencionado anteriormente pertenece a la familia de las cucurbitáceas. Posee tallo de tamaño variable, pudiendo superar los dos metros de longitud, muy ramificado e hirsuto. Sus hojas poseen peciolo de tamaño variable. Las flores masculinas pueden disponerse solitarias o en fascículos de 2 a 5. El receptáculo con tubo presenta una forma acampanada, y en la mayoría de las ocasiones es muy viloso. La corola con lóbulos tiene color amarillento. Las flores femeninas, en cambio se disponen de forma solitaria poseyendo un pedicelo grueso de unos 8 mm, el periantio es semejante al de las flores masculinas. El ovario viloso.

El fruto presenta una gran variedad de tamaños según estemos hablando de las formas silvestres o cultivadas, siendo la diferencia de peso entre uno y otro de más de 9 kilogramos. La forma silvestre suele llegar a pesar alrededor de 10 gramos, y la forma cultivada puede llegar a los 9 kilogramos. La variabilidad en la morfología del fruto también es muy amplia, cambiando la forma desde piriforme, ovoide, elipsoide ..., así como el color desde amarillo, verde, naranja, blanquecino o con franjas.

Las semillas adquieren un mayor tamaño en las formas cultivadas, pero todas presentan tonos amarillos-blanquecinos y forma oblongada, agudas en la base de la semilla y obtusas en el ápice de esta (Fernandes, 2020).

En la Figura 3 se muestra una ilustración de la morfología de *C. melo*, donde se pueden apreciar las diferentes partes de la planta en diversos estadios.

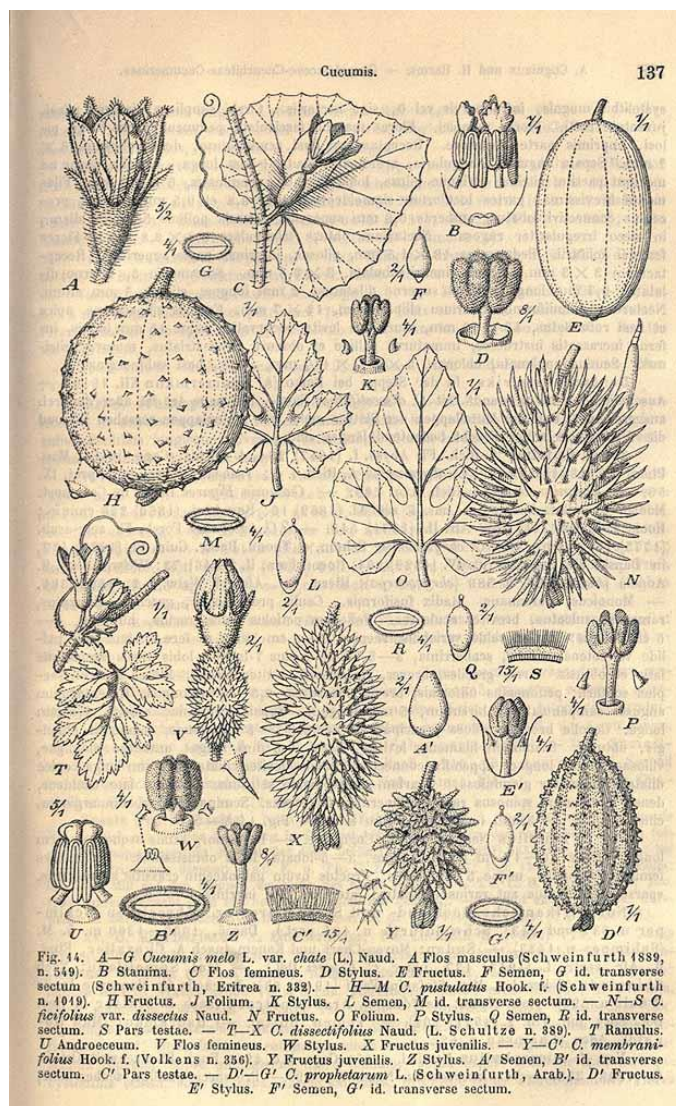


Figura 3. Ilustración de la morfología de *C. melo*. Figura extraída de Engler (1924).

1.2.3. Origen y domesticación de *C. melo*

El origen geográfico del melón tiene hipótesis contradictorias debido a la aparición continua de parientes silvestres desconocidos en diferentes localizaciones. En unos inicios se pensaba que el origen de esta especie se situaba en África, aunque datos recientes determinan que su origen podría estar situado en el continente asiático. Se han descrito parientes silvestres de *C. melo* en África, Asia y Australia, y se encuentra en debate la posible existencia de otros en Madagascar y América del Norte. No obstante, los resultados filogenéticos realizados por Sebastián *et al.* en 2010 sugieren que el ancestro silvestre del melón domesticado está en Asia. A su vez, esta hipótesis se hace más firme debido al alto porcentaje de razas diferentes de melón que existen en

India y en Asia Oriental, lo cual refuerza la idea de que la domesticación del melón se produjo en el continente asiático (Endl *et al.*, 2018).

También se ha intentado dilucidar el origen geográfico del melón mediante registros históricos. Los registros más antiguos que se conocen sobre esta especie están situados en pinturas egipcias, aunque también son mencionados en escritos chinos de unos 2000 a.C.; mientras que en Europa no aparecieron hasta alrededor del siglo XIII (Stepansky *et al.*, 1999).

Esta especie tiene una gran variación morfológica, de hecho, es una de las más diversas dentro de su género. Naudin en 1859 fue el primero en sugerir que los melones domesticados pueden ser el resultado de más de un evento de domesticación, hipótesis que cobra cada vez más entre los investigadores (Endl *et al.*, 2018).

1.3. *Cucumis sativus*

1.3.1. Taxonomía *C. sativus*

Al igual que *C. melo*, *C. sativus* es una especie perteneciente a la división *Magnoliophyta* del Reino Plantae. Esta especie fue también descrita por Carlos Linneo en *Species Plantarum 2: 1012*, como se muestra en la Figura 4. Respecto a su información taxonómica completa se resume en la Tabla 2 (CONABIO, 2005).

1.3.2. Características morfológicas de *C. sativus*

C. sativus L.; *Sp. PL: 1012 (1753)*, por su parte también es una planta monoica diploide, siendo $2n=14$. Esta especie es anual. Su tallo es ramificado y postrado. Sus hojas poseen peciolo hispido y fino, de una longitud de entre 8 y 20 centímetros.

Posee flores masculinas, las cuales forman pequeños fascículos. Los pedicelos suelen tener una longitud de entre 0,5 y 2 centímetros y en su mayoría presentan una textura hispida. Tiene receptáculo con tubo con forma acampanada o subcilíndrica, a su vez, tiene textura vilosa y llega a alcanzar una longitud de unos 8-10 milímetros. La corola tiene una extensión de entre 2 y 3 centímetros de diámetro, con lóbulos oblongo-lanceolados. Las flores femeninas, pueden ser

solitarias o fasciculadas, teniendo un pedicelo de hasta de 2 centímetros de longitud. El ovario es fusiforme cubierto de pelos dilatados en la base.

Tabla 2. Taxonomía de *C. sativus*.

Fuente: CONABIO, 2005.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Cucurbitales
Familia	Cucurbitaceae
Género	<i>Cucumis</i> L., 1753
Especie	<i>C. sativus</i> L., 1753

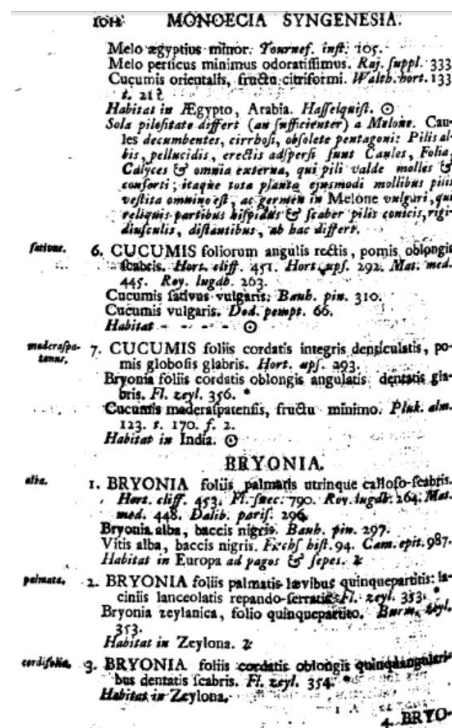


Figura 4. Página 1012 de *Species Plantarum* (1753), por Carlos Linneo.

Figura extraída de <http://www.botanicus.org>.

El fruto resultante presenta una gran variabilidad morfológica, aunque de manera general se describe como oblongo. En las etapas inmaduras presenta color verde, pero tras la maduración, presenta un color más amarillo verdoso y una textura mucho más lisa que en las etapas inmaduras.

Por último, las semillas suelen presentar un color blanquecino y una forma oblongada, de unos 3-5 milímetros de longitud (Fernandes, 2020). En la Figura 5 se muestra una ilustración de la morfología de *C. sativus*.



Figura 5. Ilustración de la morfología de *C. sativus*. Figura extraída de Thomé (1895).

1.3.3. Origen y domesticación de *C. sativus*

El origen de esta especie se data en el continente asiático, más concretamente en la India. Diversa literatura sugiere que su origen se centra en el sur del Himalaya, de hecho, el supuesto ancestro del *C. sativus* que conocemos y usamos actualmente, *C. sativus* var. *Hardwickii*, se puede encontrar aun por esta zona (Prota, 2020). La diversificación de esta especie ocurrió en un primer momento hacia Grecia e Italia (CONABIO, 2005), y más tarde a China, donde se lleva cultivando cerca de 2000 años. En el continente americano fue introducido a través de los primeros colonizadores europeos (Prota, 2020). Actualmente esta especie se encuentra distribuida por todo el mundo ya que, tal como otras especies de su misma familia es muy utilizada en alimentación por su gran aporte en vitaminas, pero sobre todo su alto contenido en agua hace a su fruto un gran atractivo en países donde se alcanzan altas temperaturas (CONABIO, 2005).

1.4. Doble haploides como herramienta biotecnológica para la mejora de cucurbitáceas

La aplicación de los conocimientos biotecnológicos en el campo de la agricultura y la alimentación son una potente herramienta para el avance y el desarrollo de la sostenibilidad y competitividad de los cultivos futuros. Una de las herramientas biotecnológicas que han revolucionado el panorama en los últimos años ha sido la utilización de doble haploides.

Un doble haploide (DH) es un genotipo que se forma cuando las células (n) de un individuo haploide experimentan un proceso, pudiendo ser este espontáneo o inducido, en el cual se produce una duplicación cromosómica en el individuo (Prasanna *et al.*, 2013). Por tanto, los doble haploides son individuos totalmente homocigotos para todos sus *loci* debido a que provienen de la duplicación, inducida o no, del número de cromosomas gaméticos de un individuo haploide, originado a partir de un único núcleo gametofítico.

Las técnicas de obtención DHs significan un gran avance en el sector privado para la obtención de semilla, ya que acorta considerablemente los tiempos de desarrollo de líneas puras homocigotas, las cuales podrán ser utilizadas directamente como un nuevo cultivar, o como parentales para la obtención de híbridos comerciales. Con esta tecnología es posible obtener líneas totalmente homocigotas en 2 generaciones, mientras que utilizando el proceso tradicional de líneas endogámicas se tarda en alcanzar este objetivo entre 6 u 8 generaciones, y no siempre se garantiza un 100% de homocigosis (Prasanna *et al.*, 2013). Por tanto, esta técnica acorta el tiempo de producción de nuevas líneas, así como lleva consigo una reducción significativa del coste del proceso.

Otra de las ventajas que nos ofrece el uso de DHs en la mejora de cultivos es que facilitan y agilizan el establecimiento de asociaciones entre un marcador y un carácter observable, debido a que las combinaciones de marcadores se mantienen en homocigosis, evitando así los efectos enmascarados que pueden presentar los individuos heterocigotos. Este tipo de poblaciones son también útiles para estudios de ligamiento y estimación de fracciones de recombinación. Así, por ejemplo, Gonzalo *et al.* (2005) usó líneas doble haploides homocigotas para construir el primer mapa genético de referencia de *C. melo*, y que sirvió

como punto de anclaje para la comparación de mapas entre diferentes especies de la familia Cucurbitaceae. Además, el hecho de que estas líneas DHs puedan autoperpetuarse por autofecundación las convierten en un material de enorme valor para la detección de *quantitative trait loci* (QTL) en estudios de caracteres complejos o cuantitativos, posibilitando analizar los mismos genotipos en distintos ambientes (Prasanna *et al.*, 2013).

Los DHs son también herramientas muy útiles en la identificación de mutaciones recesivas, tanto espontáneas como inducidas, que pueden estar ocultas en los individuos heterocigotos (Forster *et al.*, 2007). A la hora de generar una colección de mutantes, es importante que éstos deriven de una línea pura, como es un DH, para evitar la detección de falsos positivos causados por la variación genética del material de partida. Así, el procedimiento consistirá primero en aplicar el tratamiento mutagénico y posteriormente la inducción para la obtención de DHs, creando así una población de líneas mutantes homocigotas, descartando los posibles efectos de quimerismo y heterocigosidad que podrían enmascarar la detección de individuos con fenotipos mutantes (Dunwell, 2010).

En la actualidad se conocen varios métodos de obtención de DHs, los cuales no sirven siempre para todas las especies. Existen tres métodos principales: la androgénesis, la ginogénesis o partenogénesis y la hibridación interespecífica.

El proceso de androgénesis se define como el proceso de obtención de individuos haploides o doble haploides a partir de la regeneración *in vitro* de plantas a partir de un proceso de embriogénesis o callogénesis inducida. Todo este proceso se realiza a partir de la microspora, que es el precursor del gametofito masculino (Wedzony *et al.*, 2009). En los inicios, se pensaba que el proceso androgénico ocurría en base a que un embrión con carga genética “n”, haploide, había surgido a partir de un óvulo fecundado donde se perdía el núcleo femenino (Seguí-Simarro, 2010). El proceso de androgénesis está más ampliamente estudiado que el proceso de ginogénesis.

La ginogénesis o partenogénesis es una técnica de obtención de DHs la cual se basa en la producción de embriones a partir de las células del gametofito femenino, siempre y cuando no haya ocurrido el proceso de fecundación, por lo

que debe activarse la ruta embriogénica estimulando a las células del gametofito femenino sin fecundar al ovulo (Forster *et al.*, 2007).

Como último método de obtención de DHs está la hibridación interespecífica. En esta técnica se usa el polen de otras especies sexualmente incompatibles con nuestra especie de interés para obtener embriones haploides. En ocasiones tiene lugar una doble fecundación normal que da lugar al cigoto y al endospermo. Después, debido a barreras de incompatibilidad post-cigótica, tiene lugar un proceso de eliminación cromosómica selectiva de la parte masculina, de forma que finalmente queda un embrión haploide con el fondo genético del parental femenino (Dunwell, 2010).

Una vez obtenidas las plantas haploides, éstas son cultivadas en un medio apropiado, y la duplicación cromosómica es inducida externamente, por ejemplo, con colchicina (Polci *et al.*, 2005).

La inducción *in vitro* de haploides fue descrita por primera vez en 1966 por Guha y Maheswari, empleando para ello el cultivo de anteras. Debido a que esta técnica resultó la más sencilla y eficiente para la mayoría de las especies de interés agronómico, el estudio de la inducción de haploides mediante ginogénesis fue postergado por más de una década (Yang y Zhou, 1982). Pasado este tiempo, en aquellos cultivos en los cuales la androgénesis o la hibridación interespecífica no son del todo efectivas o presentan algún tipo de problemas, se empezó a trabajar en la inducción de haploides mediante ginogénesis, aunque esta técnica fuese menos efectiva (Bohanec, 2009).

En 1985, Chambonnet y Dumas de Vaultx fueron los que por primera vez obtuvieron embriones de plantas haploides en cucurbitáceas a través del cultivo *in vitro* de óvulos de calabaza no fecundados mediante ginogénesis. Este estudio fue el primero en demostrar la posibilidad de obtener plantas haploides del género cucurbitáceas a partir de células del gametofito femenino (Dong *et al.*, 2016). El punto crítico de esta técnica se sitúa en el paso de transformación de haploide a doble haploide, ya que la mayor parte de las veces el porcentaje de conversión es inferior al deseado (Gałązka y Niemirowicz-Szczytt, 2013). Posteriormente, Lofti *et al.* (2003) generaron haploides y DHs mediante ginogénesis a partir de líneas de melón resistentes a enfermedades para obtener

híbridos más resistentes frente a varios tipos de virus. En el mismo año, Kuzuya *et al.* (2003) aplicaron esta misma técnica para poder conseguir plantas de melón resistentes al mildiú causado por *Sphaerotheca fuliginea*.

2. Ginogénesis

En Angiospermas, una megáspora viable sufre tres cariocinesis, para formar un saco embrionario con ocho núcleos haploides, luego se produce la citocinesis dando lugar al megagametófito o gametófito femenino que consta de 7 células, a saber: la oóspfera, dos células sinérgidas, una célula media con dos núcleos polares y tres antípodas (Figura 6). El proceso de ginogénesis se define como: una técnica en la cual se genera un individuo haploide, a partir del cultivo de un gametofito femenino no fecundado.

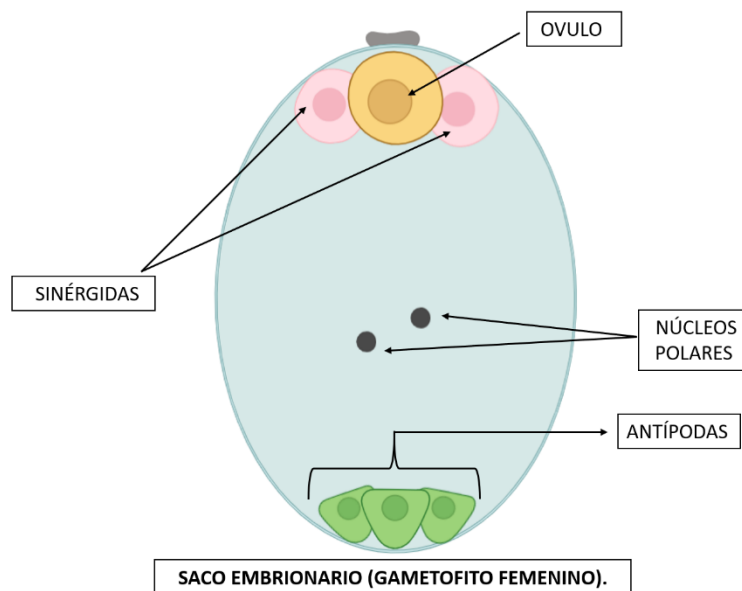


Figura 6. Representación de ovario de angiosperma.

La técnica de ginogénesis, a modo general, se basa en el desarrollo de un embrión haploide en el saco embrionario después de que las células del gametofito femenino sean estimuladas para desarrollar un embrión (Forster *et al.*, 2007). Generalmente, el embrión deriva de la célula huevo, aunque en algunas especies se origina a partir de las células antípodas o sinérgidas. Mediante ginogénesis no se lleva a cabo el proceso de fecundación, por tanto, es necesario activar la ruta embriogénica sin llegar a fecundar el ovulo. Para activar dicha ruta, los ovarios u óvulos no fecundados son cultivados *in vitro* para

completar la maduración del saco embrionario, lugar donde se desarrolla el embrión haploide, mediante la adición de diferentes compuestos químicos. Otra metodología empleada para activar la ruta embriogénica es utilizar polen irradiado para fecundar los óvulos. Una vez el polen ha sido irradiado pierde su viabilidad, y por lo tanto la capacidad de fecundación. Con este polen “estéril” se polinizan los óvulos del individuo parental del cual se quieren conseguir los embriones haploides.

En cuanto a la inducción de ginogénesis existen dos vías por las cuales se pueden obtener plantas haploides o DHs: *in situ* e *in vitro*. A continuación, se detallan cada una de estas vías.

2.1. Ginogénesis *in situ*

La obtención de plantas haploides o DHs mediante la técnica de ginogénesis *in situ* se lleva a cabo a través de la inducción *in situ* de embriones haploides mediante polinización irregular, los cuales tiene que ser rescatados *in vitro* para garantizar su supervivencia y completar su desarrollo. Esta técnica presenta tres variantes en función del origen y el tipo de polen utilizado:

1. Polen de la especie en estudio. El polen seleccionado debe tener un genotipo concreto que active la ginogénesis en el gametofito femenino de la planta el cual provoca un aumento en el porcentaje de embriones haploides, aunque no solo afecta el genotipo, sino que también se ha visto que las condiciones externas o una polinización tardía puede afectar a esta predisposición genética. Descrito en maíz por Lashermes y Beckert (1988).
2. Polen de otras especies diferentes a la especie en estudio. Usualmente se utilizan especies silvestres emparentadas. Con esto se pretende que se estimulen a los ovarios sin que se llegue a producir una fecundación satisfactoria. Descrito en trigo por Laurie y Bennett (1988) y en patata por Hougas *et al.* (1964).
3. Polen irradiado de la especie en estudio. Esta vía es una de las más usadas en cucurbitáceas, existen numerosos casos descritos en la bibliografía, un ejemplo de ello sería el descrito por Sauton y Dumas de Vaulx (1987) en *C. melo*.

2.2. Ginogénesis *in vitro*

La técnica de ginogénesis *in vitro* se basa en el cultivo de órganos femeninos (óvulos u ovarios) no polinizados. Al no realizar polinización no se obtiene embrión zigótico. A su vez existe la posibilidad de que los embriones se desarrollen a partir de tejido no esporofítico. La inducción de la embriogénesis viene dada por un paso de subcultivo, donde se estimula al tejido a que se produzca la embriogénesis. Para que se produzca una correcta inducción y se genere un embrión viable, hay elementos dentro del proceso que tienen un papel importante, los que tienen una mayor relevancia son los componentes del medio donde se sitúa el ovario. Por otra parte, un factor significativo dentro del proceso de desarrollo, o no, del embrión es el genotipo de cada individuo (García Fortea, 2017).

Según la especie con la que se trabaje se deberá utilizar un tejido u otro, ya que no todos los tejidos de todas las especies responden igual a esta técnica. En la Tabla 3 aparecen algunos ejemplos:

Tabla 3. Diferentes cultivos de óvulos y ovarios. Fuente: Bhojwani y Thomas (2001).

<i>Especies</i>	<i>Explantes</i>	<i>Modo de regeneración</i>	<i>Nivel de ploídía</i>
<i>Brassica oleracea</i>	Ovulo	Embrión	Haploide
<i>Coix lachryma-jobi</i>	Ovario	Embrión	Haploide
<i>Cucumis melo</i>	Ovulo	Embrión	Haploide/Diploide
<i>Cucurbita pepo</i>	Ovario	Embrión	Haploide/Diploide
<i>Gerbera jamesonii</i>	Ovulo	Callo	Haploide

2.3. Ventajas e inconvenientes de la ginogénesis

La obtención de haploides mediante ginogénesis no ha sido puesta a punto en la mayoría de las especies de interés agronómico debido a que su eficiencia es muy baja, en comparación con otras técnicas como la androgénesis. Es por lo que las técnicas de ginogénesis sólo se utilizan en aquellas especies en las que la androgénesis o la hibridación interespecífica no resultan efectivas. Es importante destacar que siempre que se generen individuos haploides mediante ginogénesis es necesario comprobar la ploídía mediante citometría de flujo, puesto que los tejidos que se cultivan presentan tanto células gaméticas como células somáticas, siendo estas últimas de naturaleza diploide.

Además, otra desventaja que presenta esta técnica es que solo un pequeño porcentaje de los individuos que son generados duplican de forma espontánea su material cromosómico, por lo que para obtener individuos DHs es necesario recurrir en la mayoría de los casos a sustancias que inducen la duplicación cromosómica, como es la colchicina.

Pese a todo lo anterior, la ginogénesis puede ser la única vía para obtener individuos haploides en ciertas especies de interés agronómico, convirtiéndose en el único recurso viable para obtener líneas puras DHs que sirvan como parentales para obtener híbridos de valor comercial. Por otro lado, esta técnica también presenta un amplio abanico de ventajas. En primer lugar, acentuar que en la ginogénesis no es necesario que la floración de los parentales esté sincronizada. También hay que destacar que en la mayoría de las especies donde la ginogénesis ha resultado satisfactoria, la ruta predominante para el desarrollo de la planta haploide es la embriogénesis gamética, dejando la formación de callos y el desarrollo de embriones somáticos en una posición anecdótica (García Fortea, 2017).

2.4. Ginogénesis vs. androgénesis en cucurbitáceas

Tanto la androgénesis como la ginogénesis (Figura 7) son herramientas de gran potencial en la mejora genética de plantas, ya que como se ha citado en apartados anteriores la generación de DHs por estos métodos reduce tiempo y costes en los procesos de generación de nuevas variedades, en comparación con el método tradicional. Es por ello por lo que ambas metodologías son de gran interés para los mejoradores vegetales; puesto que a partir de una única planta heterocigota se pueden producir individuos haploides genéticamente variables, que pasarán a ser diploides homocigotos con una duplicación cromosómica (Portemer *et al.*, 2015). El problema radica en que no todas las especies responden igual a ambos procesos, diferenciándose estas en la capacidad para la producción de haploides mediante androgénesis o ginogénesis (Bohanec, 2002).

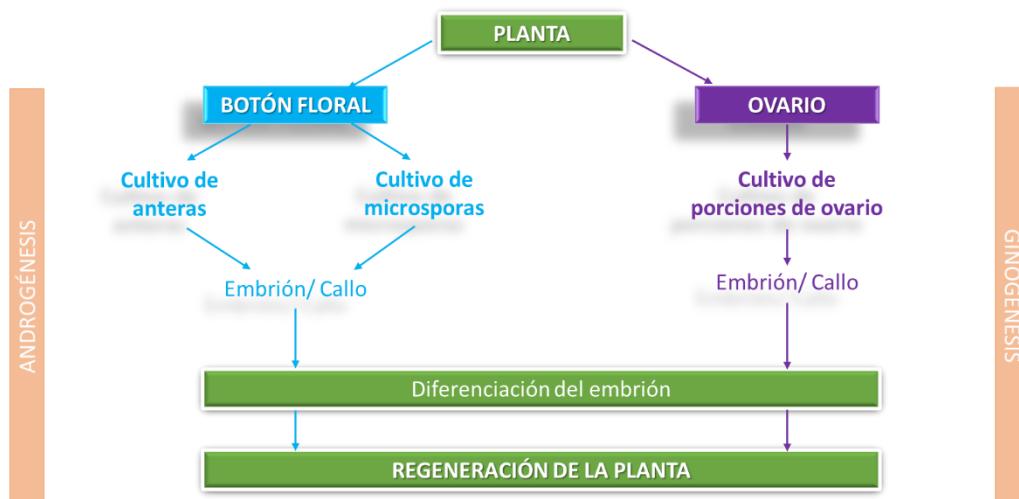


Figura 7. Comparación general entre los procesos de androgénesis y ginogénesis.
Fuente: Dong et al. (2016).

De hecho, la producción de doble haploides a través del proceso de ginogénesis es una solución para especies donde la androgénesis no es aplicable, o donde su aplicación presenta diversos problemas. En algunas especies donde se intentan generar DHs por androgénesis surgen un alto porcentaje de plantas albinas, también aumenta el nivel de esterilidad masculina en los individuos regenerados, por lo que la ginogénesis se convierte en la única opción viable.

Actualmente, la generación de individuos por ginogénesis *in vitro* es aplicable a muy pocas especies, 25 según Bhojwani y Dantu (2013). Entre las especies que admiten la generación de haploides y, por ende, DHs, encontramos a algunas cucurbitáceas, como pueden ser *C. melo*, *C. sativus* o *C. maxima* (Sorntip et al., 2017).

Dentro la familia de las cucurbitáceas hay diversidad en las especies que han reaccionado de forma diferente a estos tratamientos, y a otros similares. Por ejemplo, en *C. melo* se ha descrito que un método que con el que se han obtenido muy buenos resultados ha sido el de ginogénesis inducida *in situ* por polinización con polen irradiado descrito por Sauton y Dumas de Vaulx (1987), pero se ha comprobado que también pueden obtenerse embriones haploides de forma eficaz por ginogénesis *in vitro* (Ficcadenti et al., 1999; Beharav y Cohen, 1995).

Por otra parte, en *C. sativus* se ha visto que el método con mayor éxito para la producción de haploides y doble haploides es la ginogénesis *in vitro* (Sorntip *et al.*, 2017). La androgénesis en este cultivo es aplicable, pero los resultados satisfactorios se producen en una proporción mucho menor que mediante ginogénesis (Song *et al.*, 2007).

En otras cucurbitáceas como pueden ser la sandía (*C. lanatus*) o el calabacín (*Cucurbita pepo*) también se han obtenido de forma eficaz haploides mediante ginogénesis (Sari *et al.*, 1994; Gémesné Juhász *et al.*, 1997). En estos mismos cultivos se ha visto también una generación satisfactoria por androgénesis, aunque con un porcentaje menor de embriones viables que por ginogénesis (Dong *et al.*, 2016).

3. Ginogénesis en *C. melo*

Los primeros ensayos para la producción de individuos haploides de *C. melo* por cultivo de anteras o por cultivo de óvulos no resultaron satisfactorios. El primer resultado positivo en *C. melo* se logró mediante ginogénesis a través de la polinización con polen irradiado con rayos gamma.

Esta técnica, aunque efectiva, es poco reproducible debido a la falta de equipos de radiación gamma en los laboratorios donde se realizan estos ensayos, es por ello por lo que el cultivo de ovarios no fertilizados de melón es el método más útil gracias a la sencillez de equipos que se requieren para la realización de esta técnica.

La ginogénesis es un proceso muy dependiente del genotipo, por ello requiere poner a punto las condiciones de cultivo para la recuperación exitosa de haploides y DHs, por ejemplo, la temperatura, los reguladores del crecimiento u otros componentes de los medios de cultivo para la inducción (Malik *et al.*, 2011). Por otra parte, Ficcadenti *et al.* (1999) indicaron que en *C. melo* tras la ginogénesis puede darse un proceso de diploidización espontánea en individuos previamente haploides durante la formación del embrión. La duplicación espontánea genoma es un proceso aleatorio sin ninguna relación con el genotipo y actualmente no se puede evaluar el momento en el que se produce el evento duplicación (Malik *et al.*, 2011).

3.1. Cultivo *in vitro* de óvulos

Una de las técnicas de ginogénesis que pueden aplicarse para la obtención de haploides y DHs en *C. melo* es el cultivo de óvulos. Esta técnica ha sido menos estudiada que otras, debido a que por el momento es compleja y se obtienen resultados menos eficientes que con otras técnicas que requieren metodologías más sencillas en el proceso de obtención de haploides. El estudio más satisfactorio sobre esta técnica se ha llevado a cabo por parte de Koli y Murthy (2013). La técnica se describe a continuación.

El protocolo del cultivo de óvulos mediante ginogénesis consta de los siguientes pasos:

- **Recolección y selección de los ovarios no polinizados**

Los ovarios no polinizados se recolectan un día antes de la antítesis.

- **Desinfección de los ovarios**

El proceso de desinfección se inicia con un primer enjuague con etanol al 70% durante 3 minutos, tras esto se realiza un segundo enjuague con cloruro de mercurio al 0,1% durante 2 minutos. Para finalizar, las muestras se lavan cuatro veces con agua destilada estéril.

- **Cultivo de óvulos**

En esta parte del proceso los óvulos deben separarse del ovario, para ello los óvulos individuales se aíslan de los ovarios con ayuda de un microscopio estereoscópico y se cultivan en medio semisólido MS (Murashige y Skoog, 1962) (Figura 8) complementado con sacarosa al 3% y reguladores del crecimiento de plantas. En cada tubo de cultivo con 20 mL de medio deben cultivarse máximo seis óvulos.

Los tubos con los óvulos se incuban en una cámara a 25°C con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.



Figura 8. Cultivo *in vitro* en medio MS de un óvulo de *C. melo*. Figura extraída de Koli y Murthy (2013).

- **Análisis de ploía**

Para determinar la naturaleza haploide o diploide de cada individuo desarrollado (Figura 9) se realiza una prueba de citometría de flujo a partir de muestras de hojas jóvenes (Lotfi *et al.*, 2003). Con los resultados obtenidos puede calcularse la eficiencia de generación de doble haploides con este método.



Figura 9. Planta regenerada de *C. melo*. Figura extraída de Koli y Murthy (2013).

3.1.1. [Modificaciones del protocolo de cultivo *in vitro* de óvulos en *C. melo*](#)

En este protocolo se utilizaron variantes del medio MS, cada una de ellas complementada con un tipo de regulador del crecimiento diferente, o combinaciones de estos. Los óvulos cultivados en el medio MS complementado con reguladores de crecimiento individuales no mostraron ninguna respuesta incluso después de ocho semanas de cultivo. Mientras que, los óvulos cultivados en medio MS complementado con combinaciones de BAP/TDZ/KN (1,0, 2,0 y 5,0 μ M) con 2, 4-D/NAA/IBA (1.0, 2.0 y 5.0 μ M) indujeron embriogénesis y calogénesis a partir del óvulo tras de seis semanas de cultivo.

Las combinaciones de BAP (1.0 y 5.0 μM) con NAA (1.0 y 2.0 μM), 2.0 μM KN+ 5.0 μM NAA y 2.0 μM TDZ +2.0 μM 2, 4-D dieron los mejores resultados dentro del resto de combinaciones probadas. Demostrando que estas combinaciones en las proporciones citadas inducen en mayor proporción el desarrollo de plántulas viables a partir del cultivo del óvulo. Por tanto, los resultados indican que la producción de haploides y DHs *in vitro* depende de reguladores de crecimiento y de la concentración idónea de cada uno de ellos.

3.2. Cultivo *in vitro* de ovarios

Otra técnica ginogenética que puede aplicarse para la obtención de haploides y DHs en *C. melo* es el cultivo de ovarios. Esta técnica está más estudiada que la anterior descrita, quizá porque tiene una metodología más simple, para unos resultados similares o incluso más ventajosos. Se destacan dos estudios que describen esta técnica, el realizado en 2003 por Lotfi *et al.* y el elaborado en 2011 por Malik *et al.* Ambos protocolos tienen resultados positivos en la obtención de haploides y DHs, las diferencias de ambos radican en los procesos de desinfección y el análisis de la ploídía, los cuales serán discutidos tras la exposición del protocolo base.

- **Recolección y Selección**

Ambos estudios aseguran que el momento idóneo para la recolección de los ovarios no polinizados procedentes de los parentales femeninos es el día de la apertura floral, en antítesis.

- **Desinfección**

Una vez obtenidos los ovarios, se procede a su desinfección. Para ello, se lleva a cabo un enjuague de los ovarios en etanol al 70% (v/v) durante 30 segundos seguido de un segundo enjuague con cloruro de mercurio al 0.1% (p/v) durante 5 min, tras este paso se realizan varios lavados con agua destilada estéril. Por último, se quita el exceso de humedad de los ovarios desinfectados.

- **Medios**

Tras el proceso de desinfección, cada ovario se corta en 6-10 secciones transversales y se coloca en una placa de Petri con medio MS (Figura 10 A). El medio MS (Murashige y Skoog 1962) es el primer medio en el que se cultivan los ovarios, a este medio se le añaden 0,4 mg/l de tiamina, 100 mg/l de myo-inositol,

40 g/l de sacarosa y 0,02 mg/l (0,09 μ M) Thidiazurón (TDZ), solidificado con 0,8% de Phytagar. Tras 4-5 días se realiza un proceso de subcultivo en el cual las porciones de ovario son transferidas al mismo medio, pero en este caso complementado con 0,05 mg/l de ácido 1-naftalenacético (NAA) (0,27 μ M) y 0,2 mg/l de 6-Bencilaminopurina (BA) (0,88 μ M) en lugar de TDZ.

- **Condiciones de cultivo**

Las placas se sellan con Parafilm y se cultivan en una cámara a 25°C de temperatura y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (\sim 50 mmol/m/s).

Los embriones que muestran un crecimiento satisfactorio (Figura 10 B) se transfieren a medio sólido E20A. Las plantas enraizadas (Figuras 10 C y D) se trasplantan a suelo (mezcla de musgo de turba y vermiculita).

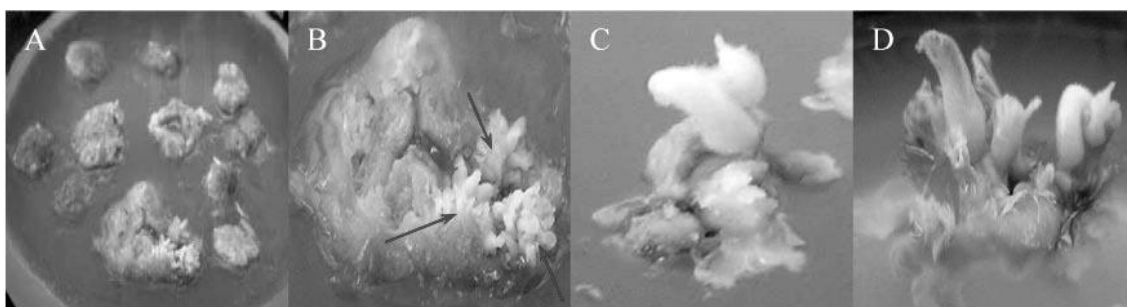


Figura 10. Embriogénesis y regeneración de plantas a partir del cultivo de ovario no fecundado de melón (*C. melo* L.) (A) Rodajas de ovario en medio de inducción; (B) Embriones germinando; (C) Organogénesis de la raíz; (D) Plan regenerada. Figura extraída de Malik *et al.* (2011).

- **Análisis de ploidía**

Para la medición de la ploídía de cada individuo se realiza una prueba de citometría de flujo a partir de muestras de hojas jóvenes (de 1 a 2 cm de largo).

3.2.1. Comparación de los protocolos de cultivo *in vitro* de ovarios en *C. melo*

En ambos estudios se han obtenido resultados satisfactorios, pese a que ambos tienen pequeñas diferencias en sus protocolos, las cuales se detallan a continuación.

En el proceso de desinfección Lotfi *et al.* (2003) propone otras sustancias para llevar a cabo la desinfección de los ovarios. En este estudio se sumergen los

ovarios primeramente en una solución de Tween 20, y tras esto se enjuagan en agua destilada estéril durante dos minutos. Tras este paso se esteriliza en Clorox 100% durante 15 minutos, por último, se hacen tres enjuagues en en agua destilada estéril. Ambos protocolos, tanto el descrito por Lotfi *et al.* (2003) como el descrito por Malik *et al.* (2011) son útiles y satisfactorios para desinfectar la superficie del ovario, y evitar contaminaciones en el cultivo de estos. Se podría llevar a cabo uno u otro dependiendo del material disponible, ya que la eficacia de ambos es equivalente.

Malik *et al.* (2011), por otra parte, también quisieron demostrar el papel que tiene el TDZ en la estimulación de la embriogénesis. Para ello realizaron medios con diferentes proporciones de este regulador del crecimiento. Finalmente se dieron cuenta que la adicción de este compuesto en el medio de cultivo, pero en una proporción pequeña (0,02 y 0,04 mg/l) efectivamente estimula la embriogénesis en *C. melo*. Cuando se superan estas proporciones, se ha visto que la embriogénesis se ve afectada, siendo prácticamente nula en la mayoría de los casos. El porcentaje de embriogénesis producido en las proporciones de 0,02 y 0,04 mg/l fue de 65,83% y 46,6% respectivamente.

En cuanto al análisis de ploídia, Malik *et al.* (2011) propone que para dicho análisis las muestras deben ser previamente enjuaguadas con agua para eliminar los restos de medio y que sean tratados en 8-hidroxiquinolina al 0,02% a 4°C durante 3 horas. Es una diferencia mínima que consiste en un lavado de las muestras para mejorar la calidad del análisis, en comparación con la metodología propuesta por Lotfi *et al.* (2003). Con ambos protocolos se consigue una medida fiable y exacta de la ploidía de los individuos, a través de la cual se puede averiguar la eficacia de cada método en razón a la generación de DHs.

3.3. Ginogénesis *in situ* con polen irradiado

Esta técnica es bastante usada, debido a su fácil metodología. El único inconveniente es el aparataje para la irradiación del polen, ya que es un material caro y requiere de personal cualificado para su uso. El protocolo más popular y citado dentro de esta técnica es el de Sauton y Dumas de Vaulx (1987).

- **Emasculación, irradiación y polinización**

Las flores hermafroditas se emasculan y se embolsan 24 horas antes de que se abran los pétalos y se produzca la antítesis.

Los cogollos de flores macho se retiran 24 horas antes de que se produzca la antítesis. Se retiran los sépalos y los pétalos y después se tratan con rayos γ.

Al día siguiente de la castración, cada flor femenina es polinizada con 2-4 cogollos cuyo polen ha sido irradiado. Tras este paso el ovario se trata con una solución de 2-(1-Naftil) acetamida (1% del producto comercial procarpil-tomate © RHODIAGRI). Finalmente, las flores se embolsan de nuevo.

- **Desinfección**

Los ovarios seleccionados son retirados entre 5 y 9 días después de que se produzca el proceso de polinización. Tras este paso, los ovarios aislados se enjuagan durante 5 minutos con una solución de hipoclorito de calcio al 10% mezclado con unas gotas de Tween 20. Por último, se enjuagan 3 veces con agua estéril.

- **Medio y cultivo de óvulos**

Los óvulos se extraen y se cultivan en placas de Petri, aunque durante el desarrollo del protocolo se dieron cuenta de que la extracción de óvulos era un trabajo demasiado tedioso, y es por ello por lo que los frutos se dejan crecer durante 6 semanas y se extraen los embriones formados.

Los embriones (Figura 11), extraídos de frutos previamente desinfectados, se abren bajo una lupa binocular; los embriones se extraen y se cultivan en medio E20A (Dumas de Vaultx *et al.*, 1981). Las muestras se cultivan en una cámara con un fotoperiodo de 12 horas y a una temperatura constante de 25°C. Las plántulas resultantes se transfieren a tubos de ensayo con el mismo medio.

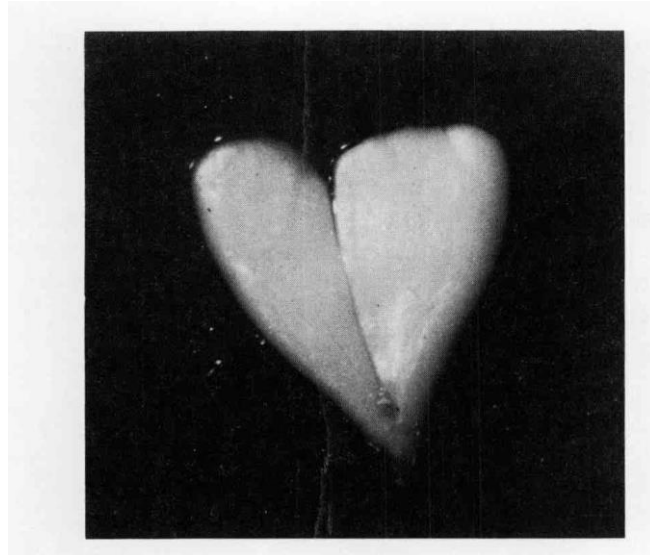


Figura 11. Embrión haploide extraído de la semilla 3 semanas después de la polinización. Figura extraída de Sauton y Dumas de Vaulx (1987).

- **Análisis de ploidía**

El análisis de la ploidía se realiza a partir de muestras caulinares analizadas mediante citometría de flujo.

3.4. Eficiencia de la obtención/producción de haploides en melón

Dentro de las primeras dos técnicas anteriormente descritas, tanto el cultivo de óvulos como de ovarios tienen unos resultados satisfactorios, pero la técnica de cultivo de ovarios es más fácil de llevar a cabo, ya que se ahorra el paso de aislamiento de los óvulos, procedimiento que puede llegar a ser complejo. Por lo tanto, la técnica de cultivo de ovarios puede decirse que es más eficiente que la del cultivo de óvulos, ya que con un esfuerzo y complejidad menor se llega a un mismo resultado, así mismo esta técnica ha sido más estudiada gracias a su sencillez técnica por lo que se me invertido más tiempo en su mejora que en la técnica del cultivo de óvulos.

Los resultados obtenidos por Lotfi *et al.* (2003) sugieren que las técnicas de ginogénesis *in vitro* para la generación de plantas haploides y DHs en *C. melo* son una de las técnicas menos eficientes para obtener estos individuos, si las comparamos con otros procedimientos que persiguen el mismo fin como puede ser la partenogénesis *in situ* con polen irradiado (Sauton y Dumas de Vaulx,

1987). Esta última técnica es la más utilizada actualmente, ya que es la técnica desarrollada más eficiente.

Respecto a cultivar óvulos o embriones con la técnica de partenogénesis con polen irradiado, la eficiencia es semejante, tan solo se diferencia en la dificultad de extraer los óvulos del ovario. Aun así, en el estudio de Sauton y Dumas de Vaulx (1987) se determinó que la frecuencia media de la técnica de cultivo de óvulos era de 1 embrión por cada 100 óvulos.

Cualquiera de las técnicas empleadas para generar plantas haploides mediante ginogénesis presenta el problema del bajo porcentaje de plantas DHs obtenidas. Por ello, un procedimiento adicional que se puede emplear en estas técnicas son los tratamientos con colchicina, los cuales sirven para aumentar el número de individuos diploides. Esta técnica ayuda a la conversión de los individuos haploides en doble haploides.

Para llevar a cabo la duplicación del genoma de las plántulas haploides identificadas tras el primer análisis de ploidía, éstas se ponen en contacto con una disolución de colchicina durante 3 o 6 horas. Tras este periodo de tiempo, los brotes se enjuagan tres veces con agua estéril y se secan para quitar el exceso de humedad. Las plántulas tratadas se trasplantan a un medio de enraizamiento y se cultivan durante 4 semanas. Trascurrido este tiempo se realiza un segundo análisis de ploidía mediante citometría de flujo (Lotfi *et al.*, 2003).

4. Ginogénesis en *C. sativus*

En *C. sativus* el método más usual para la inducción de haploides ha sido el cultivo *in vitro* de óvulos u ovarios. Aun así, hay muchos expertos que mantienen que estos métodos presentan un inconveniente debido a su baja frecuencia en la inducción de embriones viables. Pese a esto, este método sigue siendo hoy en día el más popular para la regeneración de cultivos haploides en *C. sativus*. Por ello, se sigue investigando en la mejora de esta técnica, ya que se ha visto que existen determinados factores que pueden llegar a afectar a la ginogénesis *in vitro* en este cultivo, como pueden ser las plantas donantes, los pretratamientos a los que se han visto expuestas, los componentes de los medios de cultivo y las condiciones de cultivo (Ozsan *et al.*, 2017).

4.1. Cultivo *in vitro* de óvulos

El cultivo de óvulos mediante ginogénesis es una de las posibles técnicas para la obtención de haploides y DHs en *C. sativus*. Esta técnica presenta resultados viables para la regeneración de plantas a partir del cultivo del ovulo, pero es menos llamativa que sus homologas debido a la complejidad que presenta el aislamiento de óvulos. El protocolo explicado a continuación viene propuesto por parte de Domblides *et al.* (2019).

- **Material vegetal**

Las plantas donantes pueden ser cultivadas tanto en invernadero como en fitotrón, pero siempre bajo condiciones controladas. Lo ideal según Domblides *et al.* (2019) es cultivar las plantas en fitotrón a 23°C y con un fotoperiodo de 16 horas de día y 8 horas de noche.

- **Recolección y selección**

Las flores femeninas se seleccionan el día previo a que se produzca la apertura completa de la flor (antítesis). Por la noche se aíslan usando un pergamino que rodee todo el órgano floral. A la mañana siguiente se cortan las flores seleccionadas previamente junto con el ovario.

- **Desinfección**

Para la esterilización de los explantes se separa previamente el ovario del resto de la flor, y éste se lava con una mezcla de agua y de detergente comercial "AOC" durante 5 minutos. Posteriormente, se lleva a cabo la esterilización de la parte externa de los ovarios, para ello se realiza un enjuague con etanol al 96% durante 30 segundos, después se lava durante 15 minutos en una solución acuosa al 50% de la preparación comercial "Belizna" con la adición de Tween 20 (1 gota por 100 ml). Por último, se realizan 3 lavados con agua destilada estéril durante 10 minutos.

- **Medios**

Tras la esterilización, los ovarios son colocados sobre papel de filtro estéril y un poco humedecido; y se almacenan en condiciones estériles en placas de Petri de vidrio. Tras este paso se cortan los ovarios con ayuda de un bisturí, dentro de una cabina de flujo horizontal. Los óvulos se aíslan (Figura 12) usando agujas de disección bajo un estereomicroscopio con un aumento de x10.

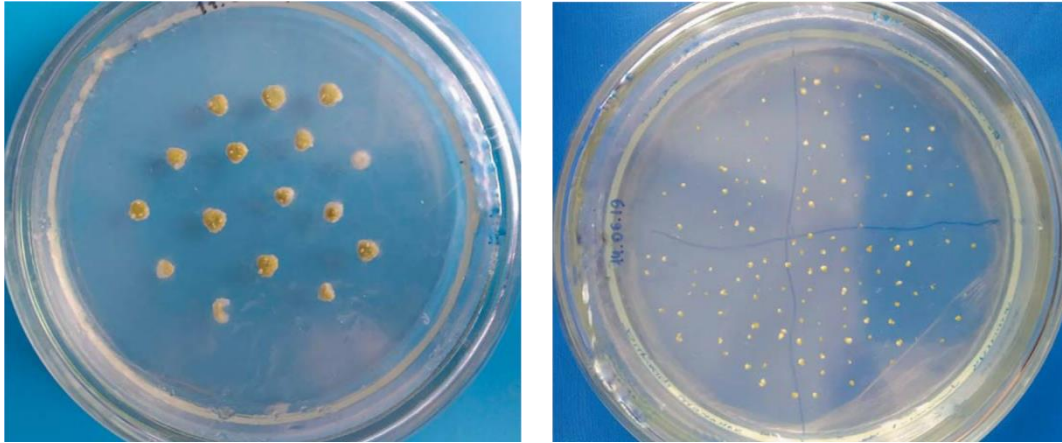


Figura 12. Crecimiento de las partes del ovario de pepino y óvulos extraídos en el medio de nutrición en placa de Petri (10 cm.) después de 14 días. Extraído de Domblides *et al.* (2019).

Para la inducción de la ginogénesis se utilizó un medio nutritivo IMC (Medio de inducción para Cucurbitaceae - desarrollado en el laboratorio de biotecnología de la Institución Científica Presupuestaria del Estado Federal FNTSO (VNISSOK)) con base mineral de MSM (Matsuda *et al.*, 1981) con la adición de aminoácidos (100 mg/l prolina, 100 mg/l serina, 800 mg/l glutamina) y vitaminas, además de 30 g/l sacarosa, 7 g/l agar, 200 mg/l de ampicilina y 0,2 mg/l de TDZ (Figura 13).



Figura 13. Inducción ginogénica después de 4 semanas de cultivo en el medio IMC. Extraído de Domblides *et al.* (2019).

- **Condiciones de cultivo**

El cultivo de los óvulos debe realizarse en cámaras con lámparas fluorescentes a 25°C y con un fotoperiodo de 16 horas día / 8 horas noche. Los embriones que se desarrollan normalmente se traspasan a medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con 2% sacarosa y 3 g/l de fitogel. Por otra parte, los embriones con crecimiento irregular se transfieren al medio regenerativo de CBM (Gemés-

Juhasz *et al.*, 2002), complementado con una fuente de hierro ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 27,8 mg/L y $\text{Na}_2 \text{EDTA} \times 2 \text{H}_2\text{O}$ - 37,3 mg/L), con 2% de sacarosa, 3 g/l fitogel, 0,05 mg/l NAA y 0,2 mg/l BAP (Figura 14). Tras 5-6 semanas, si se comienza a originar desarrollo embriogénico normal, estos embriones se trasplantan a medio MS con 2% sacarosa y 3 g/l de fitogel. El cultivo de los embriones se realiza en cámaras con lámparas fluorescentes a 25°C y un fotoperiodo de 16 horas día / 8 horas noche.

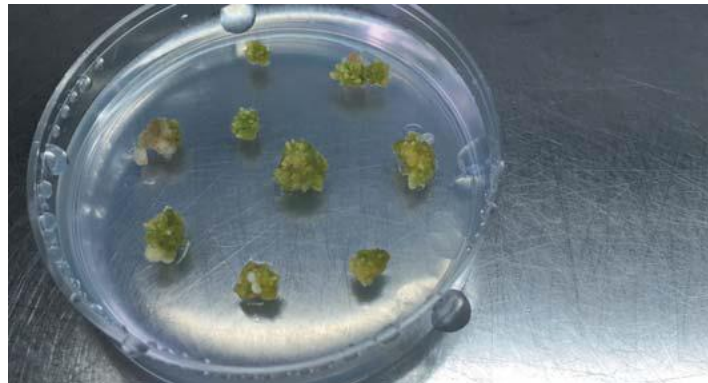


Figura 14. Óvulos con ginogénesis inducida en medio de regeneración CBM. Extraído de Domblides et al. (2019).

Una vez que los embriones se han desarrollado y se han diferenciado los tejidos de las plántulas, se seleccionan las plantas que no presentan alteraciones en el desarrollo de las hojas y el sistema radicular (Figura 15 a) y se transfieren a recipientes rellenos con una mezcla de turba y perlita (7:3). Se cubren con vasos de plástico perforados para adaptar las plantas a las condiciones *in vivo* (Figura 15 b). Las plantas regeneradas (Figura 15 c) se cultivan en un fitotrón a 25°C durante todo el ciclo, y con un fotoperiodo de 16 horas de día / 8 horas de noche.



Figura 15. a. Formación de raíces en el medio de la MS; b. Adaptación de plantas regeneradas a condiciones in vivo; c. Plantas regeneradas. Extraído de Domblides et al. (2019).

- **Análisis de ploidía**

Para el análisis de ploídia de los individuos de interés Gemes-Juhasz *et al.* (2002) recomiendan la realización de un análisis de citometría de flujo.

4.1.1. Singularidades del protocolo de cultivo *in vitro* de óvulos en *C. sativus*

En este estudio se afirma que uno de los factores más importantes en relación con la producción de doble haploides es el genotipo de partida. Ya que se obtuvieron diferentes resultados según el genotipo de los individuos, los cuales estuvieron sometidos a las mismas condiciones durante todo el protocolo. El mayor porcentaje de embriogénesis que se obtuvo fue del 63,1%. Aun así, se afirma que, con esta técnica aún en proceso de mejora, se consigue una baja capacidad de regeneración. Además, es bastante común observar la formación de brotes vitrificados. El porcentaje de obtención de doble haploides es aún menor, siendo su máximo del 7,7% (Domblides *et al.*, 2019).

Desde un punto de vista práctico, la realidad de estos resultados es que son bastante prometedores debido a la prematura edad de esta técnica. El hecho de que se hayan conseguido resultados satisfactorios aun siendo en pequeña

proporción abre un nuevo campo de obtención de DHs en *C. sativus* siempre y cuando se logre mejorar la técnica para aumentar su eficiencia.

4.2. Cultivo *in vitro* de ovarios

La técnica por excelencia para la regeneración de haploides y DHs en *C. sativus* por ginogénesis es el cultivo de ovarios. Es una técnica más sencilla que el cultivo de óvulos, y presenta mejores resultados. Esta técnica se emplea actualmente en muchas empresas biotecnológicas para la producción de doble haploides dentro del campo de la mejora vegetal. La patente del protocolo más utilizado de esta metodología corresponde a Dirks (1996), aunque existen otros autores que han cambiado partes del proceso con el objetivo de mejorar la eficiencia de la técnica. Esto se debe a que, aunque esta técnica tiene resultados satisfactorios, el gran inconveniente sigue siendo el bajo porcentaje de generación de doble haploides de manera espontánea. Entre estos autores, se encuentran Gemes-Juhasz *et al.* (2002); Ozsan *et al.* (2017); Karakan y Arpaci (2018) y Deng *et al.* (2020).

- **Material vegetal**

En todos los estudios citados las plantas donantes de ovarios se cultivaron en condiciones de invernadero. Aunque también pueden obtenerse de plantas cultivadas en campo o en cultivo hidropónico.

- **Recolección**

La mayoría de los investigadores proponen que el momento idóneo para la extirpación del ovario es un día antes de que se produzca la antítesis, es decir, un día antes de que se produzca la apertura de la flor.

- **Selección**

La selección de los ovarios ideales se realiza según la morfogénesis floral. En la Figura 16 se pueden observar los diferentes estadios, siendo el señalado el estadio ideal para la recolección. Tras la selección, se eliminan las partes florales del gametofito femenino.



Figura 16. Diferentes estadios florales de *C. sativus*. Figura extraída de Liseed.org

- **Desinfección**

Para evitar crecimiento de organismos no deseados en los medios donde se hará el cultivo se deben desinfectar los ovarios, para ello se pelan previamente los ovarios, tras esto se enjuagan con agua destilada. El siguiente paso sería la esterilización superficial con etanol al 70% durante 1 minuto, seguido de la esterilización con hipoclorito de sodio al 1% durante 20 minutos. Para finalizar se enjuagan con agua destilada estéril, de este último paso se realizan cuatro repeticiones.

- **Medio de cultivo**

Se propone como medio básico para el cultivo *in vitro* de ovarios no fecundados de *C. sativus* el medio CBM (*Cucumber Basal Media*) al cual se le añade además sacarosa al 3% (p/v).

Para poner los ovarios en el medio de cultivo se realizan previamente cortes longitudinales para cortar el ovario en cuatro mitades iguales bajo condiciones estériles como se muestra en la Figura 17.



Figura 17. Procedimiento de corte de ovario de *C. sativus*. Figura extraída de Ozsan *et al.* (2017).

- **Condiciones de cultivo**

Los explantes cultivados se mantienen en condiciones de oscuridad a 35°C durante 72 horas (Figura 18 b), y después durante 48 horas más se varió la temperatura a 25°C.

Tras estos pretratamientos, los explantes cultivados se pasan a condiciones de luz en un fotoperiodo de 16/8 horas (luz/oscuridad) durante 9 días (Figura 18 c). Dichos explantes se subcultivan en medio CBM con 0,05 mg/L NAA + 0,2 mg/L de benzylaminopurina (BAP). Tras 14 días, se mantienen las condiciones de incubación a 25°C bajo un fotoperiodo de 16/8 horas (luz/oscuridad) para su posterior desarrollo.

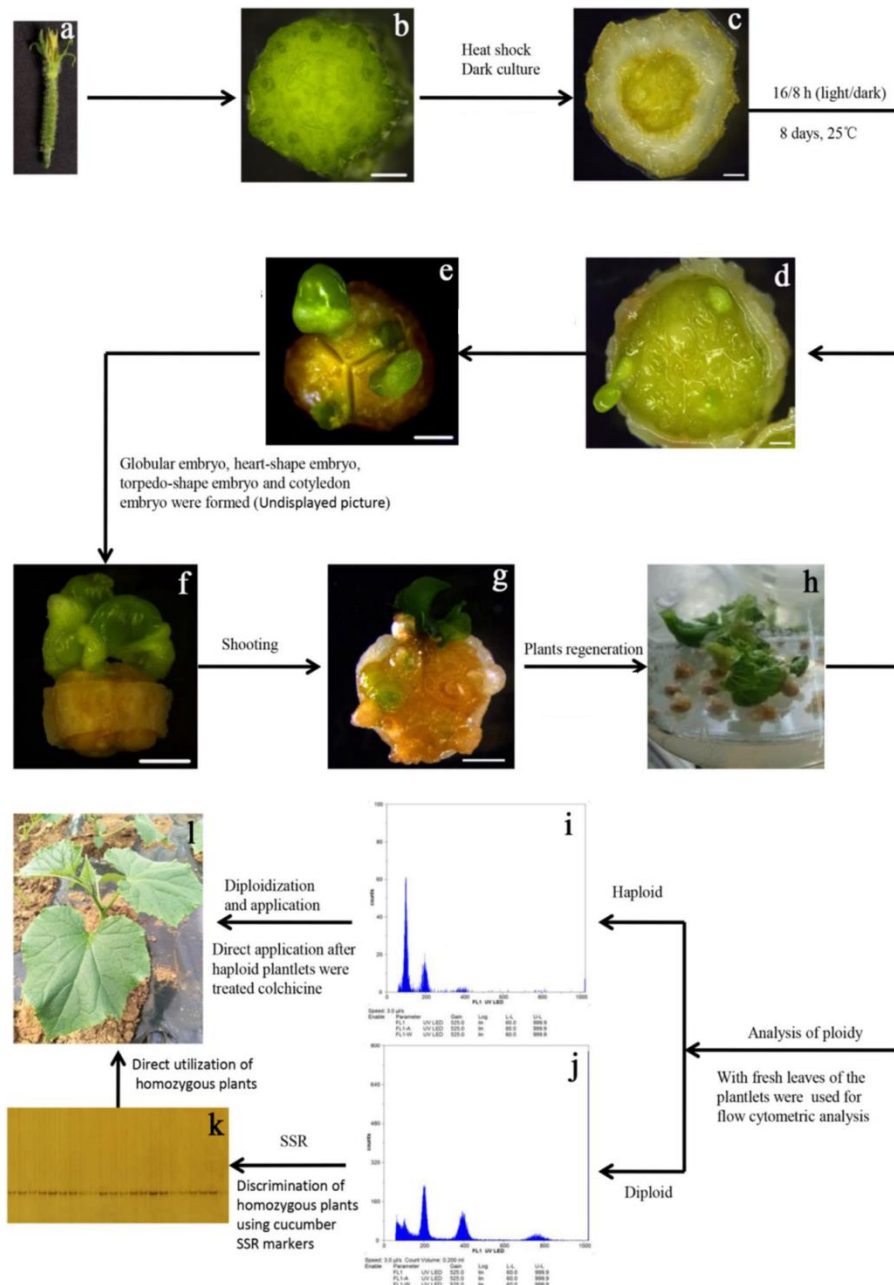


Figura 18. Diagrama de flujo de regeneración vegetal a través de cultivo de ovario por ginogénesis *in vitro* en pepino. Extraído de Deng *et al.* (2020).

- **Análisis de ploídia**

Para medir la ploídia de las muestras se propone la realización de un análisis de citometría de flujo (Figura 18 i y j).

4.2.1. Comparación de los protocolos de cultivo *in vitro* de ovarios en *C. sativus*

Dentro de los protocolos anteriormente citados, todos ellos siguen una estructura común, como la anteriormente descrita. Tan solo se diferencian en pequeñas peculiaridades, con las cuales se pretende la mejora del método.

Por ejemplo, según Ozsan *et al.* (2017) el momento idóneo para la recolección de ovarios es una vez pasadas las 2-3 primeras semanas después de la aparición de las primeras flores femeninas en las plantas. Gemes-Juhasz *et al.* (2002) amplían este tiempo de recolección de ovarios hasta las 3-4 semanas después de la aparición de la primera flor femenina. Aunque sí coinciden con los anteriores en el momento de extirpación del ovario. En la patente de Dirks (1996) se afirma que el momento exacto de la recolección debe situarse entre 1 y 3 días antes de la apertura de la flor.

En cuanto a los medios utilizados, Ozsan *et al.* (2017) proponen como medio el CBM, aunque utilizaron diferentes variantes de este medio, como se aprecia en la Tabla 4, para intentar mejorar la poca regeneración de individuos haploides que genera esta técnica. En todos los medios CBM que utilizaron se añadió además sacarosa l 3% (p/v) y se solidificaron con un 0,8% de agar (p/v). El pH de los medios se ajustó a 5,8 - 6,0. Los mejores resultados obtenidos fueron en los medios en los que se añadió TDZ.

Tabla 4. Diferentes medios CBM. Datos extraídos de Ozsan *et al.* (2017).

Código del medio	Medio de cultivo	Kinetina (mg/L)	2,4-D (mg/L)	TDZ (mg/L)	FeNaEDTA (g/L)
M1	CBM	1.0	0.1	-	-
M2	CBM	-	-	-	0.037
M3	CBM	1.0	0.1	-	0.037
M4	CBM	-	-	0.02	-
M5	CBM	-	-	0.03	-
M6	CBM	-	-	0.04	-
M7	CBM	-	-	0.03	0.037
M8	CBM	-	-	-	-

Por otra parte, Deng *et al.* (2020) proponen otro medio, con el cual aseguran una mayor regeneración de doble haploides que los anteriores mencionados. El medio propuesto para el cultivo de ovarios en *C. sativus* es el medio MS (Murashige y Skoog, 1962), complementado con sacarosa al 3% y agar al 7%, además de con TDZ (0.06 mg·L⁻¹).

Según Karakan y Arpacı (2018), el factor más común que afecta a la embriogénesis son los tratamientos de estrés. Los pretratamientos térmicos afectan positivamente a la embriogénesis, más concretamente los choques de calor previos al subcultivo, obteniéndose los mejores resultados con temperaturas entorno a los 35°C. Los tratamientos de choque de frío o de calor se utilizan de forma usual para inducir condiciones de estrés en los pretratamientos estimulantes del desarrollo esporofítico de los gametofitos femeninos.

Los resultados de todas las variantes de los protocolos son satisfactorios, aunque la tasa de producción de embriones depende del tipo sexual de la planta donante y del medio de cultivo (Dirks,1996). El proceso de duplicación cromosómica puede tener lugar espontáneamente o puede ser inducido, siendo posible aplicar métodos como el tratamiento con colchicina (Dirks,1996).

4.3. Eficiencia de la obtención/producción de haploides en pepino

La generación de doble haploides en pepino por ginogénesis tiene el inconveniente del bajo porcentaje de regeneración de DHs que se obtiene. En el estudio realizado por Gemes-Juhasz *et al.* (2002) el porcentaje de plantas doble haploides generado espontáneamente fue del 11,3%, y en el llevado a cabo por Deng *et al.* (2020) su mejor resultado fue del 44,44%, por otra parte, Domblides *et al.* (2019) mediante el cultivo de óvulos tan solo consiguió un 7,7% de DHs.

Por este motivo, el cultivo de ovarios resulta más llamativo que el cultivo de óvulos, ya que con el primero se han obtenido mejores resultados, y requiere de una metodología menos compleja. A diferencia de *C. melo*, la ginogénesis mediante el cultivo de ovarios en *C. sativus* es la vía con la que se han obtenido mejores resultados respecto a la generación de DHs (Sorntip *et al.*, 2017).

En el estudio realizado por Deng *et al.*, 2020 se muestra una mejoría en el porcentaje de regeneración, aunque en este artículo también defienden que un factor muy importante en la regeneración de DHs es el genotipo de la planta donante. A su vez, estos autores han implementado ya la utilización del TDZ, el cual se ha visto que aumenta la embriogénesis, al igual que pasaba en *C. melo*. Al producirse una mayor embriogénesis se aumenta también la posibilidad de obtener DHs. Otros autores como Ozsan *et al.* (2017), también señalan el beneficio de la utilización de TDZ.

Como en el caso de *C. melo*, la regeneración de individuos doble haploides de forma espontánea es pequeña, es por ello por lo que en muchos protocolos se detalla una vía de conversión de los individuos haploides resultantes de la técnica hacia doble haploides a través de un tratamiento con colchicina. Para ello los meristemas apicales de la raíz de los individuos haploides se ponen en contacto con colchicina al 0,1% durante una hora. Tras esto se lavan en tres repeticiones con agua destilada estéril y se inoculan en medio MS. Tras un cultivo de 30 días se analiza la ploidía por citometría de flujo (Figura 18 i-l) (Deng *et al.*, 2020).

Conclusiones

1. En *C. melo* se han descrito protocolos de ginogénesis *in vitro* a partir del cultivo de óvulos y de ovarios, que permiten obtener un porcentaje de plantas haploides menor al obtenido mediante técnicas de partenogénesis con polen irradiado. Esta última técnica es el método comúnmente más usado debido a su sencillez metodológica, a pesar del inconveniente que representan la adquisición del aparataje para la irradiación del polen.
2. En *C. sativus* se obtienen plantas haploides mediante ginogénesis *in vitro*, tanto a partir de óvulos como de ovarios, destacando entre ellos el método basado en el cultivo de ovarios, por ser más eficiente y requerir de una metodología más sencilla.
3. Las diferentes técnicas de ginogénesis empleadas tanto en *C. melo* como *C. sativus* suelen estar acompañadas de un tratamiento con colchicina debido a los bajos porcentajes de generación espontánea de plantas doble haploides obtenidos.

Bibliografía

- Beharav, A., and Cohen, Y. (1995). Effect of kinetin and GA 3 on *in vitro* ovule embryo culture of *Cucumis melo* L. *Plant growth regulation*. 16(3): 267-269.
- Bhojwani, S. S., and Dantu, P. K. (2013). *Plant tissue culture: an introductory text* (Vol. 318). New Delhi, India: Springer.
- Bhojwani, S. S., and Thomas, T. D. (2001). *In vitro* gynogenesis. In *Current trends in the embryology of angiosperms* (pp. 489-507). Springer, Dordrecht.
- Bohanec, B. (2002). Doubled haploid onions. p145-148. In: *Allium crop science: Recent advances*. Rabinowich, H. and Currah, L. (eds.), CABI Publishing House, Wallingford, UK. *Front. Plant Sci.* 6: 147. doi: 10.3389/fpls.2015.00147
- Bohanec, B. (2009). Doubled Haploids via Gynogenesis. In *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, A.F. Touraev, BP Jain, SM, ed (Springer), pp. 35-46.
- Breeding Cucumbers and Seed Saving. Liseed.org. (2007). Retrieved 26 September 2020, from <https://liseed.org/savingcukeseed.html>.
- CONABIO. Conabio.gob.mx. (2005). *Cucumis melo*. Retrieved 23 August 2020, from http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/20912_sg7.pdf
- CONABIO. Conabio.gob.mx. (2005). *Cucumis sativus*. Retrieved 23 August 2020, from http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/21650_sg7.pdf
- Deng, Y., Tang, B., Zhou, X., Fu, W., Tao, L., Zhang, L., and Chen, J. (2020). Direct regeneration of haploid or doubled haploid plantlets in cucumber (*Cucumis sativus* L.) through ovary culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 142(2): 253-268.
- Dirks, R. (1996). *U.S. Patent No. 5,492,827*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Domblides E.A., Shmykova N.A., Belov S.N., Korottseva I.B., and Soldatenko A.V. (2019). DHplant production in culture of unpollinated ovules of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Vegetable crops of Russia*. 6:3-9.
- Dong, Y. Q., Zhao, W. X., Li, X. H., Liu, X. C., Gao, N. N., Huang, J. H. and Tang, Z. H. (2016). Androgenesis, gynogenesis, and parthenogenesis haploids in cucurbit species. *Plant cell reports*. 35(10): 1991-2019.

- Dumas de Vaulx R., Chambonnet D., Pochard E. (1981). Culture in vitro d'anthers de piment (*Capsicum annuum* L.): amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements à + 35 °C. *Agronomie*. 1 (10): 859-864.
- Dunwell, J. M. (2010). Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnology Journal*. 8(4): 377-424.
- Endl, J., E. G. Achigan-Dako, A. K. Pandey, A. J. Monforte, B. Pico, and H. Schaefer. (2018). Repeated domestication of melon (*Cucumis melo*) in Africa and Asia and a new close relative from India. *American Journal of Botany*. 105(10): 1662–1671.
- Engler, H.G.A., (1924). Pflanzenreich. 275: 137. Retrieved 24 August 2020, from http://plantillustrations.org/illustration.php?id_illustration=182007
- FAOSTAT. Fao.org. (2020). Retrieved 11 August 2020, from <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>.
- Fernandes, R. (2020). *Flora Iberica*. Floraiberica.es. Retrieved 23 August 2020, from http://www.floraiberica.es/floraiberica/texto/pdfs/03_069_04_Cucumis.pdf
- Ficcadenti N., Sestili S., Annibali S., Marco M.D., and Schiavi M. (1999). *In vitro* gynogenesis to induce haploid plants in melon (*Cucumis melo* L). *Journal of Genetics and Breeding*. 53: 255–257.
- Ficcadenti, N., Sestili, S., Annibali, S., Di Marco, M., and Schiavi, M. (1999). *In vitro* gynogenesis to induce haploid plants in melon *Cucumis melo* L. *Journal of Genetics and Breeding*. 53: 255-258.
- Forster, B. P., Heberle-Bors, E., Kasha, K. J., and Touraev, A. (2007). The resurgence of haploids in higher plants. *Trends in plant science*. 12(8): 368-375.
- Gałązka, J., and Niemirowicz-Szczytt, K., (2013). Review of research on haploid production in cucumber and other cucurbits. *Folia Horticulturae*. 25(1): 67-78.
- García Fortea, E. (2017). Evaluación de la competencia ginogénica de tres genotipos de cebolla (*Allium cepa*). Trabajo fin de Máster. Universitat Politècnica de València.
- Garcia-Mas, J., Benjak, A., Sanseverino, W., Bourgeois, M., Mir, G., González, V. M., and Alioto, T. (2012). The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(29): 11872-11877.
- Gemes-Juhasz, A., Balogh, P., Ferenczy, A., and Kristóf, Z. (2002). Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on *in vitro* gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Reports*. 21(2): 105-111.

- Gémesné Juhász A., Venczel G., and Balogh P. (1996). Haploid plant inducción in Zucchini (*Cucurbita pepo* L. convar. *giromontiina* Duch) and in cucumber (*Cucumis sativus* L.) lines through *in vitro* gynogenesis. In *III International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding* 447 (pp. 623-626).
- Gonzalo, M. J., Oliver, M., Garcia-Mas, J., Monfort, A., Dolcet-Sanjuan, R., Katzir, N., and Monforte, A. J. (2005). Simple-sequence repeat markers used in merging linkage maps of melon (*Cucumis melo* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 110: 802-811.
- Guha, S. and Maheshwari, S.C. (1966). Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. *Nature*. 1: 97-98.
- Hougas, R.W., Peloquin, S.J. and Gabert, A.C. (1964). Effect of seed parent and pollinator on frequency of haploids in *Solanum tuberosum*. *Crop Science*. 4: 593-595.
- Jamuna, S., Karthika, K., and Paulsamy, S., (2015). Phytochemical and pharmacological properties of certain medicinally important species of Cucurbitaceae family – a review *Journal of Research in Biology*. 5(6): 1835-1849.
- Karakan, F. Y., and Arpacı, B. B. (2018). Cold/heat shock pre-treatments for gynogenic haploid embryo induction in amaryllidaceae and cucurbitaceae: A review. *Scientific bulletin. Series f. Biotechnologies*. 22: 11-14.
- Koli, S. P., and Murthy, H. N. (2013). Haploid plant regeneration from unpollinated ovules of *Cucumis melo* L. var. conomon cv. Mudicode. *Biotechnology Journal International*. 605-613.
- Kuzuya M., Hosoya K., Yashiro K., Tomita K., and Ezura H., (2003). Powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) resistance in melon is selectable at the haploid level. *Journal of Experimental Botany*. 54(384): 1069-1074.
- Lashermes, P., and Beckert, M. (1988). Genetic control of maternal haploidy in maize. *Theoretical and Applied Genetics*. 76: 405-410.
- Laurie, D.A., and Bennett, M.D. (1988). The production of haploid wheat plants from wheat x maize crosses. *Theoretical and Applied Genetics* .76: 303-397.
- Lotfi, M., Alan, A. R., Henning, M. J., Jahn, M. M., and Earle, E. D. (2003). Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. *Plant cell reports*. 21(11): 1121-1128.

- Malik, A. A., Li, C., Shuxia, Z., and Jin-feng, C. (2011). Efficiency of SSR markers for determining the origin of melon plantlets derived through unfertilized ovary culture. *Horticultural Science*, 38(1): 27-34.
- Matsuda K, Kikuta Y, and Okazawa Y.A. (1981). Revision of the Medium for Somatic Embryogenesis in Carrot Suspension Culture. *Journal of the Faculty of Agriculture. University Hokkaido*. 60:183-193.
- Murashige T, and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15:473–497.
- Naudin, C. (1859). Essais d'une monographie des especes et des varietes du genre *Cucumis*. *Annales des Sciences Naturelles; Botanique*. 4: 5–87.
- Ozsan, T., Gozen, V., and Onus, A. (2017). Cucumber Gynogenesis: Effects of 8 Different Media on Embryo and Plant Formation. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*. 6(2): 419-422.
- Patel, S., and Rauf, A., (2017). Edible seeds from Cucurbitaceae family as potential functional foods: Immense promises, few concerns, *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Elsevier. 91: 330-337.
- Polci, P., Conti, V., Humble, G. A., Miranda, R., and Echenique, V. (2005). Obtención de plantas haploides de cultivares argentinos de trigo pan maíz. *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 34(3): 151-176.
- Portemer, V., Renne, C., Guillebaux, A., and Mercier, R., (2015). Large genetic screens for gynogenesis and androgenesis haploid inducers in *Arabidopsis thaliana* failed to identify mutants. *Frontiers in Plant Science*. 6: 147.
- Prasanna, B. M., Chaikam, V., and Mahuku, G. (2013). *Tecnología de dobles haploides en el mejoramiento de maíz: teoría y práctica*. CIMMYT.
- Prota - Plant Resources of Tropical Africa*. Prota.org. Retrieved 24 August 2020, from <https://www.prota.org/>
- Salma, A. (2006). *Las Cucurbitáceas. Importancia económica, bioquímica y medicinal*. Universidad Nacional de Colombia.
- Sari N., Abak K., Pitrat M., Rode J. C., and Dumas de Vaulx R. (1994). Induction of parthenogenetic haploid embryos after pollination by irradiated pollen in watermelon. *HortScience* 29: 1189-1190.

- Sauton, A., and Dumas de Vaulx, R. (1987). Obtention de plantes haploïdes chez melon (*Cucumis melo* L.) par gynogenèse induite par du pollen irradié. *Agronomie*. 7: 141-148.
- Schaefer, H., and Renner, S., (2011). Phylogenetic relationships in the order Cucurbitales and a new classification of the gourd family (Cucurbitaceae). *Taxon*. 60 (1): 122-138.
- Sebastian, P., Schaefer, H., Telford, I. R., and Renner, S. S. (2010). Cucumber (*Cucumis sativus*) and melon (*C. melo*) have numerous wild relatives in Asia and Australia, and the sister species of melon is from Australia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107(32): 14269-14273.
- Seguí-Simarro, J. M. (2010). Androgenesis revisited. *The Botanical Review*. 76(3): 377-404.
- Song, H., Lou, Q. F., Luo, X. D., Wolukau, J. N., Diao, W. P., Qian, C. T., and Chen, J. F. (2007). Regeneration of doubled haploid plants by androgenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant cell, tissue and organ culture*. 90(3): 245-254.
- Sorntip, A., Poolsawat, O., Kativat, C., and Tantasawat, P. A. (2017). Gynogenesis and doubled haploid production from unpollinated ovary culture of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Canadian Journal of Plant Science*. 98(2): 353-361.
- Stepansky, A., Kovalski, I., and Perl-Treves, R. (1999). Intraspecific classification of melons (*Cucumis melo* L.) in view of their phenotypic and molecular variation. *Plant Systematics and Evolution*, 217(3-4), 313-332.
- Thomé, O. (1895). Flora von Deutschland Österreich und der Schweiz. Retrieved 24 August 2020, from https://web.archive.org/web/20090621045447/http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de/~stueber/thome/band4/tafel_089.html
- Wędzony, M., Forster, B. P., Żur, I., Golemić, E., Szechyńska-Hebda, M., Dubas, E., and Gotębiowska, G. (2009). Progress in doubled haploid technology in higher plants. In *Advances in haploid production in higher plants* (pp. 1-33). Springer, Dordrecht.
- Xu, Z., and Chang, L. (2017). Cucurbitaceae. In: *Identification and Control of Common Weeds*. Vol 3. Springer, Singapore.