

## Embriogénesis del polen (embriogénesis gamética)

**Beatriz Pintos López. Luisa Martín Calvarro. Aránzazu Gómez Garay.**

Facultad de Ciencias Biológicas. Dpto. de Biología Vegetal I: Fisiología Vegetal.

C/ José Antonio Novais, 12. 28040 Madrid.

[bpintos@bio.ucm.es](mailto:bpintos@bio.ucm.es)

**Resumen:** La embriogénesis del polen o embriogénesis gamética, es el proceso mediante el cual las microsporas, como resultado de un tratamiento de estrés que puede ser térmico, de ayuno, etc. cambian su programa de desarrollo gametofítico por un programa esporofítico. Se produce un cambio en el proceso de desarrollo del polen, que se reprograma y entra en una nueva ruta denominada embriogénica en la cual la microspora se divide de forma simétrica dando lugar a la formación de embriones haploides que posteriormente se pueden o no diploidizar, regenerándose plantas haploides o doble-haploides respectivamente. Este proceso de embriogénesis puede realizarse mediante el cultivo de anteras o mediante el cultivo de microsporas aisladas. La producción de homocigotos, a partir del cultivo de anteras, puede ser especialmente útil en especies con largas generaciones, como ocurre en la mayoría de las leñosas, donde los métodos tradicionales de mejora genética resultan impracticables.

**Palabras clave:** embriogénesis gamética. Microsporas. Haploides. Doble-haploides. Polen.

### TERMINOLOGÍA E HISTORIA DE LOS HAPLOIDES Y DOBLE-HAPLOIDES

**Haploide**, es en general el término que se utiliza para plantas esporófitas que tienen un número cromosómico gamético ( $n$ ). De este modo, en una especie esporofítica diploide ( $2n$ ), el haploide podría también ser llamado monoploide ( $x$ ), ya que tiene un solo juego de cromosomas. En especies poliploides, los haploides ( $n$ ) tienen más de un juego de cromosomas y son polihaploides. A la planta haploide procedente de un autotetraploide ( $4x$ ) con 4 juegos de cromosomas se la ha llamado dihaploide. La diferencia entre un dihaploide y un Doble Haploide (DH) es que el **doble-haploide (DH)** es aquel haploide cuyo número cromosómico ha sido duplicado, y se ha formado a partir de un monoploide o un alohaploide, por lo que debe ser completamente homocigoto, mientras que el **dihaploide** no es homocigoto, ya que presenta 2 juegos de cromosomas seleccionados a partir de 4 juegos del Autotetraploide. Por lo tanto, **doble-haploide (DH)** es el término que se utiliza para **plantas que poseen dos juegos iguales de cromosomas ( $n$ ) producidos por duplicación espontánea o artificial de un haploide.**

Existen dos tipos de haploides, los que derivan del gameto masculino (haploides androgenéticos) y los que derivan del gameto femenino (haploides ginogenéticos). Los primeros trabajos de haploides en plantas fueron realizados por BLAKESLEE *et al.*, 1922, con la especie *Datura stramonium* L. y los resultados obtenidos de estas investigaciones fueron publicados en la revista *Science*.

## MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN DE PLANTAS HAPLOIDES

Existen diversos métodos a través de los cuales se pueden obtener plantas haploides:

**a. Origen espontáneo:** se han encontrado plantas haploides que surgen de manera espontánea en la naturaleza. Sin embargo en la mayoría de los casos la frecuencia es demasiado baja como para ser utilizado en programas de mejora.

**b. Partenogénesis haploide:** uno de los primeros métodos utilizados para la obtención de plantas haploides para su aplicación en programas de mejora fue la **partenogénesis**, que consiste en la formación de un embrión a partir de un óvulo no fecundado (sin la intervención del gameto masculino). Esta partenogénesis puede ser inducida *in vivo* o *in vitro* mediante la polinización con granos de polen triploides o mediante la polinización con granos de polen irradiados o inactivos por tratamientos físicos o químicos (GERMANÀ y CHIANCONE, 2001). La patata, la remolacha, la cebolla y el pepino, son quizás los mejores ejemplos de cultivos en los cuales la partenogénesis *in vitro* ha proporcionado un método práctico para la obtención de frecuencias relativamente altas de haploides (METWALLY *et al.*, 1998). Las ventajas de esta técnica serían, por un lado, la buena estabilidad genética de los dobles haploides obtenidos y por otro lado, la ausencia de plantas albinas. Sin embargo, aunque en la remolacha hay una gran influencia del genotipo sobre la partenogénesis haploide, en la mayoría de las otras especies los rendimientos son muy bajos. La diploidización de los haploides inducidos es todavía ineficiente, y la técnica está restringida solamente a la producción de doble haploides no pudiéndose utilizar para transformación de plantas. Otro sistema para la formación de plantas haploides es la **semigamia**, que ha sido empleada en el algodón (TURCOTTE y FEASTER, 1974). La semigamia representa un proceso de fertilización anormal, donde el núcleo masculino penetra en el óvulo, pero no se fusiona con el núcleo del óvulo. Los núcleos del gameto masculino y femenino se dividen independientemente, dando lugar a un embrión quimérico que presenta algunos sectores de tejido haploide procedentes del gameto masculino y otros procedentes del gameto femenino. Mediante el uso de marcadores genéticos visibles, estos sectores pueden ser distinguidos y los haploides se pueden aislar (KASHA y MALUSZYNSKI, 2003).

**c. Hibridación distante seguida de eliminación cromosómica:** el camino para conseguir haploides vía eliminación cromosómica está basada en el cruzamiento de dos especies relativamente distantes una de la otra. Los cromosomas de una de ellas son eliminados después de la fertilización y durante la embriogénesis temprana. Esta técnica, está bien desarrollada en cebada y trigo. En cebada, los haploides se consiguieron

mediante la polinización de plantas de *Hordeum vulgare* con *Hordeum bulbosum*, un pariente silvestre que puede propagarse vegetativamente. La fecundación ocurre, pero durante las primeras divisiones del cigoto híbrido los cromosomas de *Hordeum bulbosum* son eliminados, formándose un embrión con sólo cromosomas de *Hordeum vulgare*, en condición haploide. La semilla que se obtiene no tiene endosperma normal, por lo que los embriones haploides deben ser rescatados y puestos en medios nutritivos suplementados con hormonas, para que regeneren plantas haploides. Las plantas haploides así obtenidas son tratadas tempranamente con colchicina para producir tejido doble-haploide, y a partir de éste, semillas haploides duplicadas.

**d. Ginogénesis *in vitro*:** consiste en la formación de embriones que contienen solamente los cromosomas maternos, debido a que no hay una fusión de los núcleos de los gametos masculino y femenino. Este método ha sido muy utilizado para la inducción de haploides en gimnospermas (Fig. 1). Sin embargo, en angiospermas, se ha utilizado como alternativa, en aquellas especies que no responden al cultivo de anteras. La Ginogénesis *in vitro* se puede llevar a cabo mediante el cultivo de sacos embrionarios, ovarios u óvulos no polinizados ó bien óvulos aislados (KELLER y KORZUN, 1996).

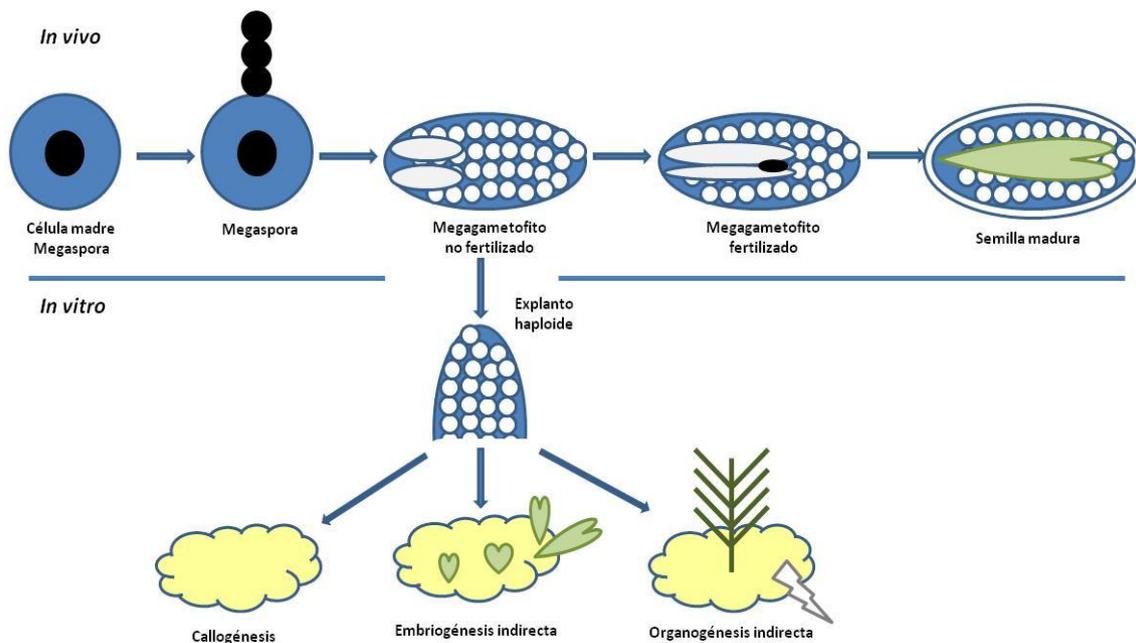


Figura 1. Esquema del desarrollo del megagametofito de coníferas *in vivo* y diferentes rutas del desarrollo de la ginogénesis *in vitro*.

**e. Embriogénesis gamética o embriogénesis del polen *in vitro*:** En plantas superiores, los individuos haploides también pueden obtenerse mediante el cultivo de anteras o de microsporas aisladas, en medios nutritivos donde se estimula la división celular de las microsporas y posteriormente la regeneración de una planta aprovechando la totipotencia de las células vegetales (MALUSZYNSKI *et al.*, 2003). La microspora cultivada *in vitro*, después de ser sometida a un proceso de estrés, abandona su programa de desarrollo gametofítico, para multiplicarse y originar un embrión y,

posteriormente, una planta haploide (Fig. 2). La duplicación cromosómica puede producirse de manera espontánea, o puede ser inducida mediante la aplicación de distintos agentes antimitóticos (colchicina, amiprofos metil, trifluralina, orizalina, pronamida, etc...).

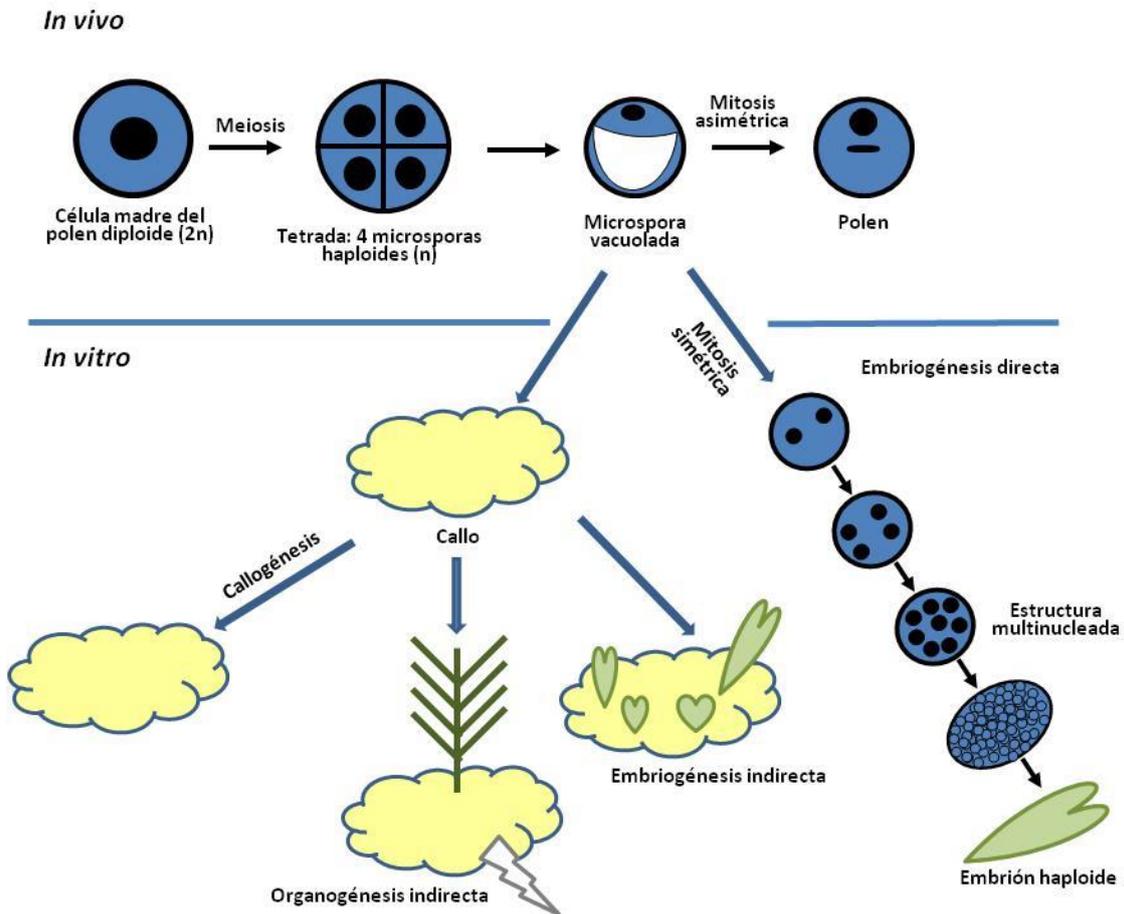


Figura 2. Esquema de la microsporogénesis *in vivo* de las Angiospermas y diferentes rutas del desarrollo de la embriogénesis del polen *in vitro*.

### MICROSPOROGÉNESIS Y MICROGAMETOGÉNESIS

El ciclo de vida de las Angiospermas, se alterna entre una generación dominante diploide (esporofito) y una generación haploide (gametofito). La generación esporofítica es la planta adulta desarrollada a partir de la germinación de la semilla. La fase gametofítica es relativamente corta y tiene lugar en dos fases distintas de desarrollo distintas y sucesivas que conducen a la formación del microgametofito maduro (grano de polen maduro). Estas fases son: la **microsporogénesis** y la **microgametogénesis** (Fig. 3).



espermáticos, sin formar células separadas. Por último, uno de estos gametos se fusiona con la ovocélula haploide dando lugar a un cigoto diploide que desarrollará la próxima generación esporofítica, formando un embrión. El otro gameto masculino se fusiona con los dos núcleos polares haploides localizados en la célula del centro del saco embrionario, produciendo un tejido nutritivo triploide llamado endospermo. El cigoto sufrirá una división desigual en el ápice que dará lugar al embrión y otra en las células basales que dará lugar al suspensor.

### EMBRIOGÉNESIS DEL POLEN (EMBRIOGÉNESIS GAMÉTICA)

Las microsporas, normalmente, se desarrollan y dan lugar a los granos de polen mediante el proceso de **microgametogénesis** (Fig.3), pero como resultado de distintos pretratamientos inductores aplicados al polen cultivado *in vitro* o *ex vitro* (estrés por choque térmico, ayuno, hormonas, vitaminas, sacarosa, rayos  $\gamma$  y  $\beta$  y tratamientos de frío), las microsporas abandonan su programa natural de desarrollo gametofítico, redireccionando su desarrollo hacia una **ruta esporofítica** o **embriogénica** que conlleva la formación de pseudoembriones haploides, comúnmente denominados embrioides, que posteriormente darán lugar a plantas haploides y doble-haploides. Este fenómeno es un excelente ejemplo de la totipotencia celular de las plantas, y se define como **embriogénesis gamética** o **embriogénesis del polen** (Fig. 4).

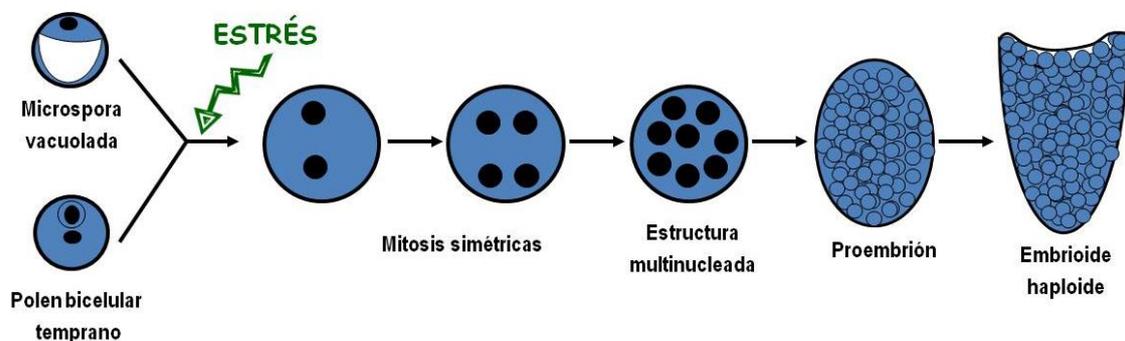


Figura 4. Esquema de la embriogénesis del polen o embriogénesis gamética *in vitro* de las Angiospermas.

La **ruta esporofítica** comienza una vez que los tratamientos de estrés son aplicados a las microsporas. Durante la fase de pretratamiento, las microsporas se hinchan y su citoplasma, vacuola y núcleo, sufren una reorganización estructural y posicional. La vacuola se fragmenta y las microsporas pasan a tener ocho o más vacuolas que forman un círculo en el citosol. El núcleo migra a una posición central y es rodeado por un citoplasma condensado que forma unas ramas citoplásmicas que pasan a través de las pequeñas vacuolas y que conectan el citoplasma perinuclear con el citoplasma subcortical. Estas características pueden observarse en microsporas estresadas, tanto en el estado uninucleado tardío, como en el estado bicelular temprano, independientemente también, del tipo de estrés que se haya aplicado. Las microsporas

que adquieren esta estructura son denominadas microsporas estrelladas (“star-like”), y son consideradas microsporas embriogénicas que tienen todo el potencial para completar el desarrollo esporofítico.

El fenómeno de la embriogénesis del polen fue descrito por primera vez por GUHA y MAHESHWARI (1964), usando la planta solanácea *Datura innoxia*. Estos investigadores vieron que cuando las anteras de *Datura innoxia* se cultivaban en un medio con sales minerales suplementado con hidrolizado de caseína, AIA y kinetina, un gran número de granos de polen llegaban a ser embriogénicos, y transcurridas seis o siete semanas de cultivo, empezaban a emerger de la antera los primeros embrioides. Años más tarde, Nitsch y Norrel (1973), utilizaron un sistema más efectivo que consistía en el aislamiento de microsporas de *Datura innoxia* a las que sometían a un choque térmico que alteraba la división polar de las microsporas en la primera mitosis, dando como resultado la formación de polen embriogénico.

El gran interés en haploides surgió a partir de la organización del “Primer Simposio de Haploides en plantas superiores” en 1974 en Canadá. Desde entonces se han llevado a cabo numerosas investigaciones con el objetivo de establecer técnicas eficientes para la producción de haploides y doble haploides en un gran número de especies. Las recientes innovaciones científicas y tecnológicas, han proporcionado un mayor entendimiento de los mecanismos de control que subyacen que ha hecho resurgir el interés de los haploides en plantas superiores.

Desde los primeros estudios de embriogénesis gamética, la aplicación del cultivo de anteras y microsporas ha sido documentada en más de 200 especies de angiospermas. En la actualidad, *Hordeum vulgare*, *Nicotiana tabacum* y *Brassica napus*, son los tres sistemas mejor estudiados en la inducción de embriogénesis gamética.

La embriogénesis gamética mediante el [cultivo de anteras](#) o de [microsporas aisladas](#) es, hoy en día, uno de los métodos más utilizado y más efectivo para la regeneración de plantas haploides y doble-haploides. (Fig. 5)

El cultivo de microsporas aisladas presenta mayores ventajas respecto al cultivo de anteras, ya que la presencia de las paredes de la antera en el cultivo hace más difícil conocer con exactitud los factores que influyen directamente en la inducción y posterior desarrollo embriogénico del polen. Sin embargo, en el cultivo de microsporas aisladas, los gametos masculinos inmaduros son aislados antes del cultivo, eliminando todo el tejido somático de la antera a partir de diferentes métodos, lo que evita la regeneración de embriones diploides a partir de tejido somático. No obstante, el rango de especies en las que se puede emplear el cultivo de microsporas aisladas es más limitado que el del cultivo de anteras.

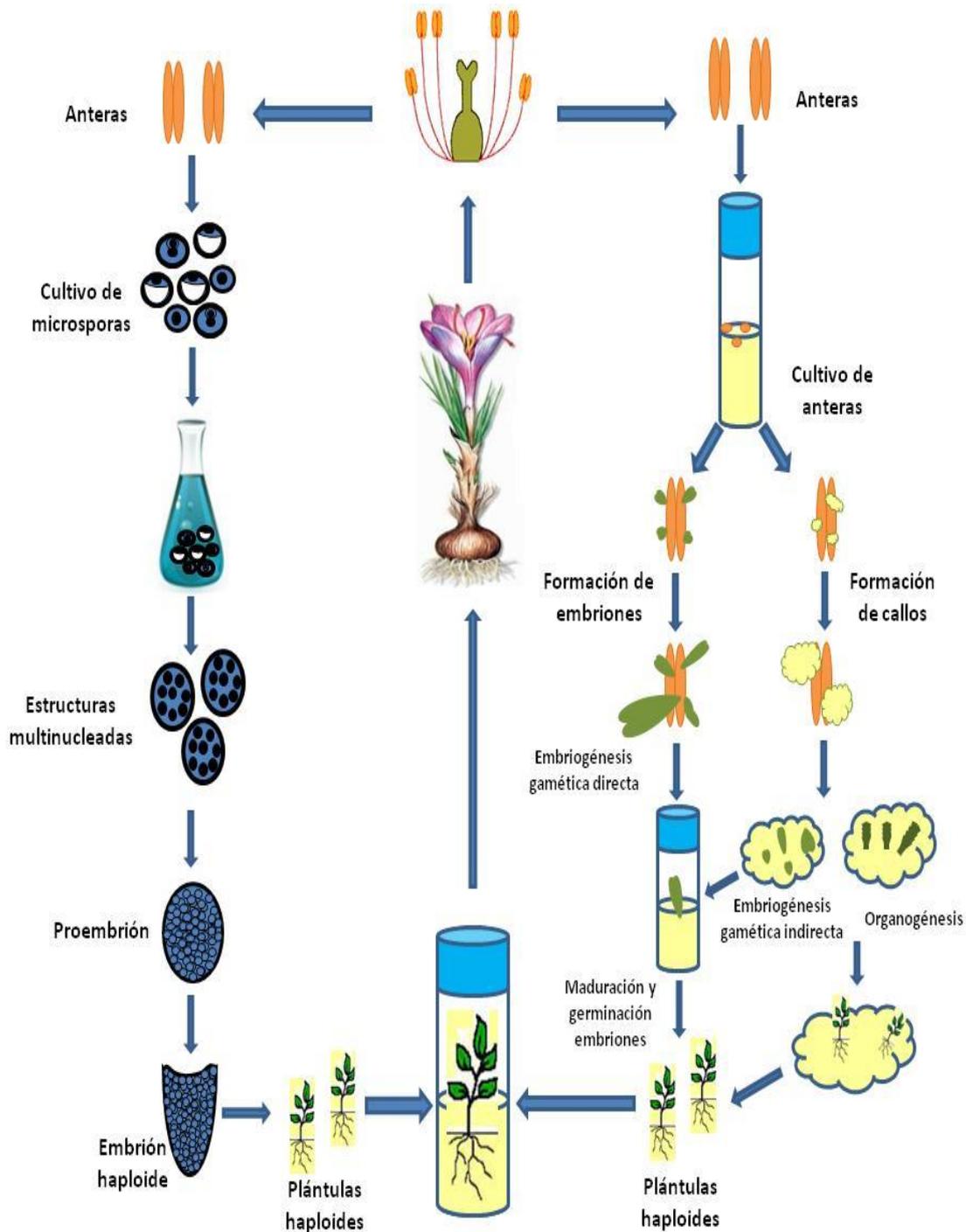


Figura 5. Representación esquemática de la embriogénesis del polen *in vitro* y formación de plantas haploides mediante el cultivo de anteras y microsporas.

### FACTORES QUE AFECTAN A LA EMBRIOGÉNESIS DEL POLEN

La capacidad embriogénica del polen es dependiente de varios factores entre los que destacan los siguientes:

- a. Genotipo de la planta donante.

- b. Estado fisiológico y condiciones de crecimiento de la planta donante.
- c. Estado de desarrollo de la microspora.
- d. Pretratamiento de los botones florales o tratamientos de inducción en las microsporas (choque térmico, ayuno, etc.).
- e. Condiciones del medio de cultivo (composición del medio de cultivo, densidad celular de microsporas, etc.).

**a. Genotipo de la planta donante**

El genotipo de la planta donante es considerado un factor determinante en la respuesta embriogénica de las microsporas tanto de plantas herbáceas como de plantas leñosas. Así, por ejemplo, estudios realizados sobre *Solanum tuberosum* indicaron que la capacidad para desarrollar la embriogénesis del polen está controlada por más de un gen y que estos genes son recesivos (SMÝKAL, 2000). En el caso del maíz y mediante el análisis con marcadores RFLP, se han podido identificar diferentes regiones sobre determinados cromosomas que están ligadas al proceso de embriogénesis gamética (BEAUMONT *et al.*, 1995).

**b. Estado fisiológico y condiciones de crecimiento de la planta donante**

Los resultados del cultivo de anteras y/o microsporas, son altamente dependientes de las condiciones de crecimiento, de la calidad y de la variedad de la planta donante. Las condiciones óptimas para cada especie son muy diferentes. Las condiciones de floración natural (intensidad de la luz, duración del día, régimen de temperatura, humedad, etc...) son normalmente las mejores para producir anteras que den una respuesta altamente embriogénica cuando se utilizan en experimentos de regeneración. Cualquier infección o estrés de la planta donante, conduciría a un bajo éxito en la inducción de embriogénesis gamética (WANG *et al.*, 2000).

Según estudios realizados en coníferas, los factores ambientales tales como [temperaturas bajas](#) o [altas](#), o la [sequía](#), pueden causar graves irregularidades meióticas *in vivo*. Durante los veranos muy cálidos, algunos cultivares de *Hevea brasiliensis* tenían anteras que contenían microsporas estériles y muy poco diferenciadas, por lo que no se obtenían embriones a partir de estas microsporas (CHEN, 1990).

La [edad del material vegetal](#) también tiene una gran influencia en la eficacia del proceso de embriogénesis de las microsporas. Por ejemplo, en cebada, las cinco primeras espigas tienen de un 15% a un 20% más de regeneración que las espigas más tardías. Las inflorescencias más jóvenes muestran una mayor respuesta embriogénica en sus granos de polen que las más viejas (CHUPEAU *et al.*, 1998). Sin embargo, en *Aesculus carnea*, las anteras de los árboles más viejos (a partir de 60 – 100 años) presentan una respuesta androgénica de aproximadamente un 20%, mientras que las anteras de árboles jóvenes (de 20 – 40 años) tienen una respuesta de alrededor del 9% (MARINKOVIC y RADOJEVIC, 1992).

### c. Estado de desarrollo de la microspora

El [estado de desarrollo de las microsporas](#) es otro factor importante a tener en cuenta para que se lleve a cabo con éxito la embriogénesis del polen. Aunque este estado de desarrollo varía de una especie a otra, el estado óptimo para la inducción en la mayoría de las especies estudiadas se encuentra entre el estado uninucleado tardío (microspora vacuolada) y el polen bicelular temprano. Estas microsporas serían potencialmente androgénicas, y al ser estimuladas mediante cualquier tipo de estrés van a ser capaces de parar su desarrollo gametofítico hacia la maduración del polen, para cambiar su desarrollo hacia una ruta esporofítica, que dará lugar a un embrión.

Estudios sobre la ultraestructura de las microsporas, junto con estudios citoquímicos, inmunoquímicos e hibridación *in situ*, han demostrado que la etapa más favorable para la inducción de embriogénesis gamética en *Capsicum annum*, es cuando el núcleo de la microspora muestra rasgos o características de una transcripción activa (TESTILLANO *et al.*, 1995).

### d. Pretratamiento de las microsporas

Algunas especies vegetales presentan anteras con microsporas que tienen de forma natural un potencial embriogénico inherente, sin embargo, las frecuencias de androgénesis natural, sin ningún tratamiento de estrés, son normalmente muy bajas. Por lo tanto, para conseguir una producción eficiente de haploides, se requiere la manipulación artificial de las microsporas, lo que implica una serie de [pretratamientos](#) para que las microsporas cambien desde su proceso natural de desarrollo para formar polen, a un proceso de desarrollo alternativo que les lleve a la formación de embriones, es decir, en lugar de seguir una ruta gametofítica, sigan una ruta esporofítica.

Estos pretratamientos se pueden aplicar tanto *in vivo* como *in vitro* y tanto a los botones florales enteros, como a las anteras o a las microsporas aisladas, y pueden ser [tratamientos físicos, fisiológicos y químicos](#), en forma de [choques térmicos \(de frío o de calor\)](#), [ayuno \(ausencia de azúcar o de nitrógeno en el medio\)](#), o [tratamientos químicos](#) en la escisión de espigas, anteras o microsporas. Independientemente del tipo y del tiempo de aplicación, estos tratamientos pueden actuar como señal o estímulo para desencadenar el programa de desarrollo esporofítico en las microsporas. Existen también otros estímulos externos que pueden actuar desencadenando o aumentando la embriogénesis de las microsporas, como son, por ejemplo, [estrés por falta o exceso de agua](#), [condiciones anaeróbicas](#), [radiación gamma](#) e [inductores químicos](#). Todos estos factores pueden actuar solos o en combinación, para alcanzar una óptima conversión de las microsporas en células embriogénicas.

#### e. Condiciones del medio de cultivo

Después del pretratamiento, las microsporas son cultivadas en un medio de cultivo específico donde se lleva a cabo la división celular y la diferenciación. La [composición de este medio de cultivo](#) es también importante para la embriogénesis de las microsporas.

Para un reducido número de especies, las condiciones inductivas de embriogénesis gamética, permiten el uso de medios de cultivo simples que contienen únicamente macro y micronutrientes, sales, vitaminas, mio-inositol y sacarosa. En los casos de la cebada, patata y trigo, y tanto en el cultivo de anteras como de microsporas, la sacarosa es remplazada por maltosa. Los medios con maltosa como fuente de carbono muestran cambios insignificantes en cuanto a la osmolaridad a lo largo del tiempo, dando lugar a la producción de embrioides de mejor calidad y con un mayor porcentaje de germinación que los formados en los medios con sacarosa. Los efectos positivos de la maltosa sobre el cultivo de microsporas podrían también ser debidos al efecto de ayuno de las microsporas, ya que una baja hidrólisis de maltosa proporciona una insuficiente cantidad de glucosa. El rango de osmolaridad óptimo en el medio de cultivo para prevenir la lisis de las microsporas se sitúa en torno a 300 – 320 mOsmoles. Kg<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O, lo que equivale a 0.3 M de manitol ó 0.25 M de sacarosa.

Sin embargo, en la mayoría de las especies se requiere la [presencia de reguladores de crecimiento](#) (auxina, citoquinina, o la combinación de ambas) en el medio de cultivo para incrementar tanto la calidad como el número de embriones formados a partir de las microsporas. (SMÝKAL, 2000). Aunque no hay un acuerdo respecto a la combinación óptima de los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, un criterio generalizado es que se debe usar la concentración más baja posible para producir embrioides. La inclusión de ABA, 2,4-D y BAP en la fase de pretratamiento es también beneficiosa en algunos casos para que se produzca la inducción embriogénica.

Algunos autores, sugieren que la suplementación de los medios de cultivo con [aminoácidos](#), tales como serina y glutamina y el tripéptido glutation ( $\gamma$ -glutamyl-L-cisteinil-glicina), favorecen la embriogénesis gamética (SMÝKAL, 2000).

Otro aspecto importante para la inducción de embriogénesis de las microsporas, es la [presencia de ovarios en el medio de cultivo](#). Cuando los ovarios son añadidos al medio de cultivo de microsporas de trigo, el número de pre-embrioides, embrioides y plantas regeneradas, se incrementa significativamente (ZHENG *et al.*, 2002). En los cultivos de microsporas desprovistos de ovarios, se paran las divisiones a los 14 días, aproximadamente, por lo que se aborta el desarrollo embriogénico. Estos ovarios, aparentemente proporcionan sustancias esenciales que aceleran y mantienen las divisiones de las microsporas.

En cuanto a la [densidad de microsporas en el medio de cultivo](#), se han publicado diferentes rangos en la bibliografía. Algunos investigadores consideran que una densidad no muy elevada de microsporas en el medio de cultivo (de  $2 \times 10^4$  a  $2 \times 10^5$  microsporas por mililitro) resulta efectiva para que se produzca la inducción de embriones, ya que facilita la competición por los nutrientes, oxígeno y espacio para las divisiones celulares y por lo tanto la formación de embrioides. El rango óptimo de densidad de microsporas en el medio de cultivo sería de  $5 \times 10^3$  a  $2 \times 10^4$  microsporas por mililitro (ZHENG *et al.*, 2003).

### IMPORTANCIA DE LAS PLANTAS DOBLE-HAPLOIDES EN LA MEJORA GENÉTICA

La [embriogénesis gamética](#) y la [tecnología haploide](#) resulta prometedora para contribuir a la mejora vegetal, dirigida al incremento de la productividad en los cultivos y de la calidad de los productos alimentarios, sobre todo en países en desarrollo, pudiendo contribuir a paliar el hambre y a reducir la cantidad de población afectada por enfermedades debido a la malnutrición en todo el mundo. Por tanto, sería conveniente la inversión en investigación agrícola encaminada a la efectiva utilización de la embriogénesis gamética y la tecnología haploide en la mejora de todas las especies (GERMANÀ, 2011)

La producción de plantas haploides y sobre todo, doble-haploides a través de la embriogénesis gamética es el método más empleado hoy día para obtener plantas completamente homocigotas en una sola generación, ya que permite en un único paso el desarrollo de líneas homocigotas completas, a partir de parentales heterocigotos, con las que abordar otras estrategias como la selección *in vitro* de caracteres de interés (tolerancia a situaciones de estrés, patógenos, etc.) o la creación de nuevas variedades, además se pueden producir cientos (potencialmente miles) de individuos a partir de un solo donante. Es una herramienta fundamental en la mejora vegetal ya que permite acortar el plazo requerido para la obtención de nuevas variedades, siendo un buen complemento en los programas de mejora tradicionales y sobre todo, es especialmente útil en especies con largo ciclo reproductivo con una fase juvenil de varios años, una fuerte tendencia a la alogamia y alto grado de heterocigosidad, como ocurre en la mayoría de las leñosas donde los métodos tradicionales de mejora genética resultan impracticables.

Si se produce duplicación cromosómica en alguna etapa durante la embriogénesis, las plantas regeneradas a partir de las microsporas son completamente homocigotas (doble haploides), es decir, son individuos homocigotos fértiles.

Estas plantas doble-haploides obtenidas a partir de embriogénesis gamética, proporcionan un excelente material para:

- **Investigación básica relacionada con la embriogénesis y la biología del desarrollo de las plantas**, ya que los doble-haploides pueden ser utilizados como

sistema modelo para estudios de desarrollo *in vitro* de embriones sin la interferencia de tejido materno, debido a la gran similitud que presentan los embriones derivados de microsporas con la embriogénesis cigótica,

- **Mejora genética de plantas.**
- **Reducir el tiempo y el costo para desarrollar nuevas variedades.**
- **Estudios genéticos** (herencia de caracteres cualitativos y cuantitativos, detección de ligamientos genéticos, determinación de valores de recombinación génica, detección de posibles interacciones genéticas y eliminación del componente dominante, lo cual permite la expresión diferencial de caracteres de naturaleza recesiva, hibridación *in situ*, transformación genética, mapas genéticos, marcadores ligados a genes, clonación de genes de interés). Los doble-haploides se utilizan en transgénesis para evitar la formación de hemicigotos y de esta manera ahorrar tiempo y recursos en la producción plantas transformadas con el transgen de interés en los dos cromosomas homólogos,
- **Estudios de mutagénesis**, ya que los doble-haploides son una herramienta muy útil para la selección genética y “screening” de mutantes recesivos, al no estar afectado el fenotipo de las plantas resultantes por los efectos de dominancia, por lo que la detección y selección de genes recesivos puede realizarse fácilmente.

## BIBLIOGRAFÍA

- Beaumont, V. H.; Rocheford, T. R. y Widholm J. M. 1995. Mapping the anther culture response genes in maize (*Zea mays* L.). *Genome*, 38: 968-975.
- Blakeslee, A. F.; Belling, J.; Farnham, M. E. y Bergner, A. D. 1922. A haploid mutant in the Jimson weed, *Datura stramonium*. *Science*, 55: 646-647.
- Chen, Z. 1990. Rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.): *in vitro* production of haploids. pp: 215-236. En: Bajaj Y.P.S. (Ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Haploids in Crop Improvement I.*, Vol. 12. Springer-Verlag. Berlin.
- Chupeau, Y.; Caboche, M. y Henry, Y. 1998. *Androgenesis and haploid plants*. Springer-Verlag, Berlin.
- Germanà, M. A. 2011. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Reports*, 30, 839-857.
- Germanà, M. A. y Chiancone, B. 2001. Gynogenetic haploids of Citrus after *in vitro* pollination with triploid pollen grains of a triploid cultivar. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 66: 59-66

- Guha, S. y Maheshwari, S. C. 1964. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, 204: 497
- Kasha, K. J. y Maluszynski, M. 2003. Production of doubled haploids in crop plants. An introduction. pp: 5-14. En: Maluszynski, M., Kasha, K. J., Forster, B. P., Szarejko, I. (Eds.). *Doubled Haploid Production in Crop Plants. A manual*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Keller, E. R. J. y Korzun, L. 1996. Ovary and ovule culture for haploid production. pp: 217-236. En: Mohan Jain, S., Sopory, S. K. y Veilleux, R. E. (Eds.). *In vitro Haploid Production in Higher Plants*. Vol. 1. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- Maluszynski, M.; Kasha, K. J.; Forster, B. P. y Szarejko, I. 2003. En: Maluszynski, M., Kasha, K. J., Forste, B. P. y Szarejko, I. (Eds.). *Doubled Haploid Production in Crop Plants, A Manual*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Marinkovic, N. y Radojevic, L. 1992. The influence of bud length, age of the tree and culture media on androgenesis induction in *Aesculus carnea* Hayne anther culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 31: 51-59.
- Metwally, E. I.; Moustafa, S. A.; El-Sawy, B. I.; Haroun, S. A. y Shalaby, T. A. 1998. Production of haploid plants from *in vitro* culture of unpollinated ovules of *Cucurbita pepo*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 52: 117-121.
- Smýkal, P. 2000. Pollen embryogenesis - the stress mediated switch from gametophytic to sporophytic development. Current status and future prospects. *Biologia Plantarum*, 43 (4): 481-489.
- Testillano, P. S.; González-Melendi, P.; Ahmadian, P.; Fadón, B. y Risueño, M. C. 1995. The immunolocalization of nuclear antigens during the pollen developmental program and the induction of pollen embryogenesis. *Exp. Cell Res.*, 221: 41-54.
- Turcotte, E. L. y Feaste, C. V. 1974. Methods of producing haploids: semigametic production of cotton haploids. pp: 53-64. En: Kasha, K. J. (Ed.). *Haploids in Higher Plants-Advances and Potential*. The University of Guelph. Guelph.
- Wang, M.; Van Bergen, S. y Van Duijn, B. 2000. Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding. *Plant Physiology*, 124: 523-530.
- Zheng, M. Y.; Weng, Y.; Liu, W. y Konzak, C. F. 2002. The effect of ovary conditioned medium on microspore embryogenesis in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*, 20: 802-807.
- Zheng, M. Y.; Liu, W.; Weng, Y.; Polle, E. y Konzak, C. F. 2003. Production of doubled haploids in wheat (*Triticum aestivum* L.) through microspore embryogenesis triggered by inducer chemicals. pp: 83-94. En: Maluszynski, M., Kasha, K. J., Forster,

B. P. y Szarejko, I (Eds.). *Doubled Haploid Production in Crop Plants, A Manual*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.

Recibido: 20 de febrero 2014.

Aceptado: 10 de diciembre 2014.