



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**OBTENCIÓN DE DOBLES HAPLOIDES EN TOMATE MEDIANTE
GINOGÉNESIS Y RESCATE *IN VITRO* DE EMBRIONES**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Presenta:

IVAN MARYN MARIN MONTES

Bajo la supervisión de:

Dr. Jaime Sahagún Castellanos



APROBADA



Chapingo, Estado de México. Diciembre 2022

**Obtención de dobles haploides en tomate mediante ginogénesis y rescate
in vitro de embriones**

Tesis realizada por el C. **IVAN MARYN MARIN MONTES** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Director



Dr. Jaime Sahagún Castellanos

Asesor



Dr. Juan Enrique Rodríguez Pérez

Asesor



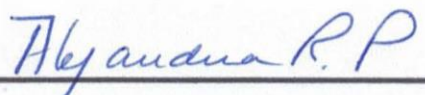
Dr. Aureliano Peña Lomelí

Asesor



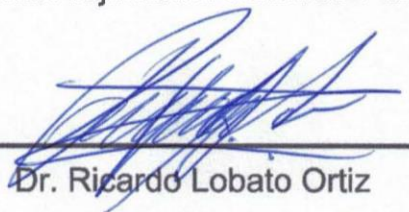
Dr. Eulogio de la Cruz Torres

Asesor



Dra. Alejandrina Robledo Paz

Lector externo



Dr. Ricardo Lobato Ortiz

Chapingo, México, diciembre 2022

CONTENIDO

CONTENIDO	iii
LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
DEDICATORIA	viii
AGRADECIMIENTOS	ix
DATOS BIBLIOGRÁFICOS	x
RESUMEN GENERAL	xi
GENERAL ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I	1
1.2 Introducción general	1
1.3 Literatura citada	4
CAPÍTULO II	7
HAPLOID INDUCTION IN TOMATO (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) VIA GYNOGENESIS	7
Abstract:	7
2.1. Introduction	7
2.2 Importance of Doubled Haploids	8
2.3 Doubled Haploids in Tomato	9
2.4. Gynogenesis in Agricultural Crops	10
2.4.1. In Vitro Culture of Ovaries or Ovules	10
2.4.2. Irradiated Pollen	11
2.4.3. Wide Hybridization	12
2.4.4. In Vivo Haploid Induction	12
2.5. Gynogenesis in Tomato	14
2.5.1. Wide Hybridization	14
2.5.2. Unfertilized Ovule Culture	14
2.5.3. Irradiated Pollen	14
2.5.4. In Vivo Haploid Inducers	15
2.6. Future Perspectives	15

2.7. Materials and Methods	15
2.8. Conclusions	15
2.9. References	16
CAPÍTULO III	21
INDUCCIÓN DE GINOGENESIS EN TOMATE (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) MEDIANTE POLEN IRRADIADO CON RAYOS- γ	21
Resumen	21
3.2 Introducción	22
3.3. Materiales y métodos.....	23
3.3.1 Experimento 1. Ginogénesis mediante pseudofertilización con polen irradiado	23
3.3.2 Experimento 2: Cultivo <i>in vitro</i> de semillas inmaduras	25
3.3.3 Experimento 3. Cultivo <i>in vitro</i> de semillas normales y anormales....	26
3.4 Resultados y discusión	27
3.4.1 Experimento 1. Ginogénesis mediante pseudofertilización con polen irradiado	27
3.4.2 Experimento 2. Rescate <i>in vitro</i> de semillas inmaduras	32
3.4.3 Experimento 3. Cultivo <i>in vitro</i> de semillas maduras	35
3.5 Conclusiones	37
3.6 Literatura citada.....	38
CAPÍTULO IV.....	44
RADIOSENSIBILIDAD DE POLEN DE TOMATE (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) A ^{60}CO PARA INDUCIR GINOGENESIS.	44
Resumen	44
4.2 Introducción	44
4.3 Materiales y métodos.....	46
4.3.1 Análisis estadístico	49
4.4 Resultados y discusión	49
4.5 Conclusiones	57
4.6 Literatura consultada	59

CAPÍTULO V.....	65
5.2 DISCUSIÓN GENERAL.....	65
5.3 Literatura consultada	66
CAPÍTULO VI.....	68
CONCLUSIONES GENERALES	68

LISTA DE CUADROS

Cuadro 2. 1. Reports of androgenesis methodology in <i>Solanum lycopersicum</i> L.L.	10
Cuadro 2. 2. Examples of protocols used for successful haploid induction mediated <i>in vitro</i> culture of unfertilized ovaries or ovules.....	11
Cuadro 2. 3. Examples of successful haploid induction methods by induced parthenogenesis by irradiated pollen in recalcitrant species.....	11
Cuadro 2. 4 Summary of haploid induction methodologies by wide hybridization.	12
Cuadro 2. 5 Summary of haploid induction reports via <i>in vivo</i> haploid inducers of haploid induction reports via <i>in vivo</i> haploid inducers.	13
Cuadro 3. 1. Significancia estadística de las fuentes de variación en 8 variables de frutos generados con polen irradiado en tomate.....	28
Cuadro 3. 2. Valores promedios del efecto de la polinización con polen irradiado y sin irradiar en características de frutos de tomate.....	28
Cuadro 3. 3. Promedios del efecto de la polinización con polen irradiado y sin irradiar en características de frutos de tomate	31
Cuadro 3. 4. Efecto del rescate de semillas inmaduras de tomate generadas con polen irradiado y sin irradiar en los medios de cultivo <i>in vitro</i> empleados.....	33
Cuadro 3. 5. Respuesta al cultivo <i>in vitro</i> de semillas maduras de tomate generadas con polen irradiado y sin irradiar.	36
Cuadro 4. 1. Significancia estadística de las fuentes de variación en características evaluados en frutos de tomate generados con polen irradiado	52
Cuadro 4. 2. Valores promedios del efecto de la polinización con polen irradiado y sin irradiar en características de frutos de tomate.....	53
Cuadro 4. 3. Efecto de la pseudopolinización con polen irradiado en formación de semillas normales y anormales en tomate	54
Cuadro 4. 4. Valores promedios del efecto de la polinización con polen irradiado y sin irradiar en características de frutos de tomate.....	57
Cuadro 4. 5. Interacción entre niveles de radiación y edad de planta en cinco características de semillas y tamaño de frutos de tomate.	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 3. 1. A: Semilla normal generada con polen sin radiación. B-C: Semilla normal y anormal producida mediante polen tratado con 160 Gy. D-E: Semillas generadas con polen irradiado con 200 Gy. G: Semilla anormal inducida mediante pseudofecundación con polen irradiado con 220 Gray.	31
Figura 3. 2. A: Semilla inmadura formada a 160 Gy de rayos-γ establecida 28 DDP. B: Semilla inmadura formada a 220 Gy de rayos-γ establecida 28 DDP. C: Callo generado a partir de 160 Gy después de 30 días sobre M1.2. D: Callo generado a partir de 200 Gy después de 30 días sobre M1.2. E: Callo formado a partir de 200 Gy después de 30 días sobre M2.1. F: Callo generado a partir de 180 Gy después de 30 días sobre M2.2.	35
Figura 3. 3. A: Respuesta <i>in vitro</i> de semilla anormal obtenida con 180 Gy B: Germinación de semilla normal inducida con 160 Gy C: Emergencia de radícula de semilla obtenida con 200 Gy. D: Respuesta <i>in vitro</i> de semilla anormal obtenida con 220 Gy. E: Plántula 15 días después de germinación (200 Gy) F: Planta derivada de semilla promovida con 160 Gy.	36
Figura 4. 1. Respuesta de la radiación gamma en germinación de polen y formación de semillas. PGP: porcentaje de germinación de polen, PSN: porcentaje de semillas normales, NTS: número total de semillas.	51
Figura 4. 2. Semillas maduras de tomate obtenidas por pseudopolinización con polen irradiado. A: 0 Gy, B: 40 Gy, C: 80 Gy, D: 160 Gy, E: 180 Gy, F: 220 Gy. Barra escala = 5 cm.	55
Figura 4. 3. Frutos maduros de tomate obtenidos por pseudopolinización con polen irradiado. A: 0 Gy, B: 40 Gy, C: 100 Gy, D: 120 Gy, E: 200 Gy, F: 220 Gy. Barra escala = 5 cm.	56

DEDICATORIA

A mi esposa, Angela Velasco

Quien siempre confió en mí, y me impulsó a ser mejor, gracias eternas por
compartir tu vida conmigo.

A Irma Montes

Por ser la mejor madre que dios puede otorgar.

AGRADECIMIENTOS

Al pueblo de México por el financiamiento económico otorgado a través de CONACyT para realizar mis estudios de posgrado en la Universidad Autónoma Chapingo.

Al Dr. Jaime Sahagún Castellanos, por compartir su vasto conocimiento en mejoramiento genético, y oportunos consejos durante mi estancia en el posgrado.

Al Dr. Juan Enrique Rodríguez Pérez, por su valioso apoyo durante toda mi formación académica, en especial por su confianza y amistad brindada.

Al Dr. Aureliano Peña Lomelí, por sus acertados consejos en redacción de resultados, y por compartir sus conocimientos en genética y cultura general.

A la Dra. Alejandrina Robledo Paz, qué con sus consejos y asesorías en laboratorio, y en conjunto con su equipo de trabajo: Dr. Luis Flores Hernández y MC. Ángel Martínez, me instruyeron en el cultivo *in vitro*.

Al Dr. Eulogio de la Cruz Torres, por compartir su amplio conocimiento en mutagénesis dirigida al mejoramiento genético.

Especial agradecimiento a la Dra. Martha Hernández Rodríguez, quien me apoyó para realizar el protocolo de conteo cromosómico. Asimismo, al Dr. Ricardo Lobato Ortiz, por su apoyo y amistad en todo momento.

A los M.C. Karina Sánchez, Tabita Pérez y Héctor Delín por sus asesorías, y buenos momentos durante estos años de doctorado.

Al C. Jorge Sánchez Galicia por su acompañamiento práctico y técnico en la realización de la fase práctica en campo de la investigación.

Al equipo de polinizadores y bikers “El capulín”, los futuros doctores Ismael, Ariadna, Alma, Plácido, Efrén, Diego y Ana, quienes me apoyaron durante la fase práctica de mi tesis.

A mis amigos Miguel, Fernando, Eligio Jr, Brian y Enrique porque nunca faltaron los buenos momentos durante este tiempo de conocerlos.

A la familia Campos Santoyo por recibirme en su familia desde hace 6 años y apoyarme en la culminación de mis estudios de posgrado.

Al equipo de choferes de Fitotecnia por su valioso apoyo para el traslado de muestras Chapingo-ININ. También a Andrés Martínez y todas aquellas personas que aportaron su grano de arena para la culminación de este proyecto.

DATOS BIBLIOGRÁFICOS

Ivan Marin Maryn Montes (MAMI930322HOCRNV05) nació el 22 de marzo de 1993 en San Pedro y San Pablo Teposcolula, Oaxaca. Sus estudios nivel bachillerato fueron cursados en la preparatoria agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo (2008-2011), después ingresó al departamento de Fitotecnia de la misma casa de estudios para recibirse como Ingeniero Agrónomo especialista en Fitotecnia (2011-2015). Durante su formación universitaria formó parte del programa de formación de nuevos investigadores (PROFONI, 2012-2015). En 2017 obtuvo el grado de Maestro en Ciencias en Recursos Genéticos y Productividad-Genética en el Colegio de Postgraduados.

Durante su preparación académica se formó en programas de pre-mejoramiento y mejoramiento genético de tomate, donde participó como autor principal y coautor de cinco y cuatro artículos científicos, respectivamente, los cuales están publicados en revistas científicas indexadas. Asimismo, fue ponente en diferentes congresos científicos nacionales e internacionales, y dirigió una tesis nivel licenciatura.

RESUMEN GENERAL

OBTENCIÓN DE DOBLES HAPLOIDES EN TOMATE MEDIANTE GINOGENESIS Y RESCATE *IN VITRO* DE EMBRIONES

La generación de híbridos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) requiere seis ciclos de autofecundación para generar líneas homocigóticas, sin embargo, este periodo puede reducirse a una sola generación si se pudieran formar dobles haploides. Sin embargo, su aplicación en este cultivo no ha sido posible por su recalcitrancia a androgénesis, y poco estudio sobre la inducción de haploidía con ginogénesis, la cual es exitosa en algunas especies recalcitrantes. Así, el objetivo del presente trabajo fue generar un protocolo eficiente para inducir haploidía mediante ginogénesis con polen irradiado de una línea S₈, para su uso en mejoramiento genético de tomate. Para ello se trató polen viable con ⁶⁰Co para evaluar su efecto en germinación y fertilidad mediante pseudofecundación de flores de un híbrido experimental en condiciones ambientales y etapas fisiológicas de planta diferentes. Esto permitió determinar que la germinación del polen y formación de embriones se reduce 50 % con 95 y 53 Gy, respectivamente. Además, la radiación se clasificó como baja (≤ 53 Gy), intermedia (> 53 Gy, ≤ 95 Gy), y alta (> 95 Gy). Asimismo, se realizó rescate y cultivo *in vitro* de semillas inmaduras estimuladas con polen irradiado. Así, se estableció que la pseudofertilización promueve el aborto del embrión antes de 14 días después de polinización, lo cual impidió alguna respuesta morfogénica en los callos obtenidos. Se recomienda utilizar dosis superiores a 100 Gy para inducir partenogénesis mediante polen irradiado, y deben ser empleadas en condiciones ambientales óptimas para el desarrollo del cultivo de tomate en invernadero (35 ° C/10 ° C) para generar mejor tamaño de fruto y semillas con embrión. Los resultados obtenidos son promisorios, debido a que es el primer estudio que obtiene frutos y semillas maduras mediante ginogénesis con polen irradiado.

Palabras clave: radiación gamma, partenogénesis, cultivo *in vitro*, mejoramiento genético, haploidía, DL₅₀.

¹ Tesis de Doctorado en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: M.C Ivan Maryn Marin Montes.

Director de tesis: Dr. Jaime Sahagún Castellanos

GENERAL ABSTRACT

OBTAINING DOUBLE HAPLOIDS IN TOMATO VIA GYNOGENESIS AND *IN VITRO* EMBRYO RESCUE

The development of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) hybrids requires six self-fertilization cycles to generate homozygous lines. However, if the generation of double haploids could be possible in tomato, it would reduce this time to a single generation. In this crop, the main problem for haploid induction is its recalcitrance to androgenesis. Also, tomato haploid induction via gynogenesis has not been studied in depth, which is successful in other recalcitrant species. Therefore, this study aimed to generate an efficient protocol to induce haploids by gynogenesis with irradiated pollen of an S₈ line to be used in tomato breeding. Thus, normal pollen was treated with ⁶⁰Co to evaluate its effect on germination and fertility by pseudo-fertilization in flowers from an experimental hybrid under different growing environmental conditions and physiological stages of the plant. So, we determined that pollen germination and embryo development was reduced by 50 % with 95 Gy and 53 Gy, respectively. In addition, we classified radiation as low (≤ 53 Gy), intermediate (> 53 Gy, ≤ 95 Gy), and high (> 95 Gy). Furthermore, from an experiment of *in vitro* rescue of immature seeds generated with irradiated pollen, we found that pseudo-fertilization promotes embryo abortion 14 days after pollination, which prevented any morphogenetic response in the callus obtained. Doses higher than 100 Gy are recommended to induce parthenogenesis by irradiated pollen, and the plants should be grown under optimal environmental conditions for tomato cultivation in greenhouses (35/10 ° C) to improve fruit size and seeds with embryo. The results achieved are promising because this is the first study where mature fruits and seeds by gynogenesis with irradiated pollen were obtained.

Key words: gamma radiation, parthenogenesis, *in vitro* culture, plant breeding, haploid induction, LD₅₀.

CAPÍTULO I

1.2 Introducción general

Al inicio del mejoramiento genético vegetal este fue considerado como arte; sin embargo, al paso del tiempo se consideró como ciencia, debido a que aplica el conocimiento generado en Agronomía, Botánica, Citogenética, Genética Molecular, Fisiología, Entomología y Estadística, para evaluar, seleccionar y fijar fenotipos y genotipos superiores con el objetivo de generar variedades vegetales novedosas que coadyuven procesos productivos en cada cultivo (Moose & Muhm, 2008).

La formación de variedades vegetales mejoradas se realiza con diferentes enfoques y emplea estrategias útiles para las necesidades de cada cultivo agrícola. El mejoramiento clásico en algunas hortalizas se basa en seleccionar fenotipos superiores a partir de diferentes fuentes de germoplasma, derivar líneas homocigóticas y después iniciar el proceso de hibridación, sin embargo, el avance actual de técnicas biotecnológicas como cultivo in vitro, biología molecular e ingeniería genética generó un proceso más rápido y eficiente (Fugimoto et al., 2018; Ghuge & Mirza, 2021).

El tiempo requerido para generar híbridos nuevos es de al menos 10 años, porque el proceso de fijación de alelos en líneas homocigóticas es tardado (Yan et al., 2017). En especies autógamas se requieren al menos 7 ciclos de autofecundación después de selección para generar homocigosis de 95 % o más antes de hibridación (Bal & Abak, 2007). Al respecto, mejoradores, biotecnólogos y genetistas han desarrollado alternativas para reducir el tiempo de formación de líneas, donde dobles haploides (DH) y sistemas de generación de ciclos rápidos son empleados a nivel mundial (Yan et al., 2017; Samantara et al., 2022).

A diferencia de un organismo diploide, un genoma DH solo cuenta con información genética de un progenitor. En este sentido, si se parte de DH solo forma gametos $\frac{1}{2}$ AA y $\frac{1}{2}$ aa, en cambio, un diploide genera gametos $\frac{1}{4}$ AA, $\frac{1}{2}$ Aa y $\frac{1}{4}$ aa. Así, al tener mayor proporción de homocigotos en DH es posible

reducir el tiempo, tamaño de población y trabajo para seleccionar un genotipo AA, comparado con métodos clásicos. Además, líneas DH ayudan a obtener mayor ganancia genética mediante selección debido a que por su naturaleza homocigótica solo se aprovecha varianza aditiva al no tener efectos de dominancia entre alelos, y se pueden identificar fenotipos recesivos con mayor frecuencia (Rajcan, Boersma & Shaw, 2011)

Para utilizar dobles haploides primero es necesario inducir haploidía (n) a partir de gametos femeninos o masculinos, y después restaurar su nivel $2n$ mediante aplicación de agentes químicos que inhiban la formación del huso acromático. Las metodologías que permiten la inducción de haploides se clasifican en: 1) androgénesis y 2) ginogénesis (Forster et al., 2007).

Androgénesis es la técnica más empleada para inducir plantas haploides en mejoramiento genético, la cual se desarrolla con cultivo *in vitro* de anteras o polen (Asif, 2013). Esta metodología se basa en inducción de embriogénesis somática que permite el desarrollo del embrión haploide a partir de granos de polen, por lo tanto, el embrión generado solo portara cromosomas de origen masculino. Lo anterior es posible siempre y cuando la reprogramación del esporofito suceda antes del inicio de la división celular, cuando las células aún son totipotentes (Bhojwani & Kumar, 2013b).

El cultivo de anteras es simple y se usa como inductor de haploidía. Este proceso consta de recolectar flores, separar anteras de la flor, siembra *in vitro*, aislar embriones, regenerar plantas y determinar ploidía en plantas generadas (Seguí-Simarro, Jacquier, Widiez, 2021). Esta técnica resulta útil en muchos cultivos porque la estructura de antera (tapete) protege al polen, y permite su desarrollo durante primeras etapas haploides (Niazian & Shariatpanahi, 2020). Sin embargo, en algunas especies el tapete puede secretar compuestos inhibidores o tóxicos que provocan muerte de anteras, o pueden interaccionar con reguladores hormonales del medio de cultivo y formar callo somático ($2n$), a las especies con este problema se le denomina recalcitrantes (Bonga, Klimaszewska & von Aderkas, 2010).

La ginogénesis es la principal alternativa en especies recalcitrantes en que el cultivo de anteras o polen no induce haploidía, aun cuando sus porcentajes de éxito son bajos en comparación con androgénesis, los avances obtenidos justifican el trabajo requerido (Asif, 2013). Esta metodología engloba métodos *in situ* como líneas inductoras de haploidía materna (Kalinowska et al., 2019), hibridación interespecífica (Tadesse et al., 2012), pseudofertilización con polen irradiado (Dong et al., 2016), y métodos *in vitro* como cultivo de ovarios u óvulos sin polinizar (Bhojwani & Kumar, 2013^a) y CRISPR/Cas 9 (Hooghvorst & Nogués, 2021).

Una vez que plantas haploides son obtenidas es necesario restaurar su nivel cromosómico $2n$ para que se desarrollen de manera normal. Al respecto, es necesario emplear agentes inhibidores del huso acromático, el más empleado es colchicina (Kalinowska et al., 2019). Esta puede ser aplicada de manera *in vitro* o *in vivo*. Cuando se utiliza de manera directa sobre plantas, el agente debe aplicarse sobre el meristemo, pero es necesario determinar la concentración adecuada para evitar la formación de poliploidía o muerte de plántulas. Además, se han reportado interacción entre método de inducción de haploidía, dependencia del genotipo y concentración de colchicina, que afectan el éxito de duplicación cromosómica (Shariatpanahi, Niazian & Ahmadi, 2021).

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es de las principales hortalizas cultivadas a nivel mundial. Durante 2020 se cosecharon 5,051,983 ha que produjeron 186,821,216 toneladas de fruto (FaoStat, 2022). En México la producción anual durante 2021 se concentró en 47,940.38 ha que generaron \$ 31,503,817.27 por la venta de 3, 324, 263.09 ton de fruto. Sin embargo, en el mercado nacional de semillas se ofrecen variedades mejoradas de empresas trasnacionales, principalmente (SNICS, 2022). Esto incrementa los costos por este insumo y la fuga de divisas de gran magnitud. Por ejemplo, si se considera que México posee 26,000 ha de producción de jitomate en invernadero, y emplea una densidad de plantación de 3.3 plantas por metro cuadrado, y costo promedio de semilla es \$3.50, la fuga de divisas asciende alrededor de 3 mil millones de pesos anuales.

Por lo anterior, es de gran importancia que programas de mejoramiento nacionales reduzcan el tiempo para obtener variedades mejoradas para ofrecer a productores, a menor precio, de manera rápida y eficiente, los genotipos que utilizan en campos de producción.

En la literatura consultada no fue posible encontrar reportes científicos sobre protocolos eficientes de dobles haploides en tomate. Esto se debe a que es una especie recalcitrante a androgénesis (Seguí-Simarro, 2016), y se han evaluado diferentes métodos de inducción de haploidía, pero estos no fueron exitosos (Bal y Abak, 2003; Bathia et al., 2004). Sin embargo, hace falta estudiar por completo todas las variantes de ginogénesis en tomate porque los reportes son escasos y existe la posibilidad de determinar los requerimientos necesarios para obtener plantas haploides de origen materno, como ha sucedido en otras especies recalcitrantes mediante el uso de ginogénesis con polen irradiado (Marin-Montes et al, 2022). En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue generar un protocolo eficiente y efectivo para inducir haploidía mediante ginogénesis con polen irradiado, con uso potencial en mejoramiento genético de tomate.

1.3 Literatura citada

Asif M. (2013). Progress and Opportunities of Doubled Haploid Production, Springer International Publishing. ISBN: 978-3-319-00732-8.

Bal, U. & Abak, K. (2007). Haploidy in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): a critical review. *Euphytica*, 158, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9427-1>

Bhatia, P., Ashwath, N., Senaratna, T. & Midmore, D. (2004). Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78, 1–21. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000020430.08558.6e>

Bhojwani, S.S. & P.K. Dantu (2013^a). Gynogenesis. In Bhojwani, S.S. & P.K. Dantu (eds.) *Plant Tissue Culture: An Introductory Text* (pp: 113-118). Springer, India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9_9

Bhojwani, S.S. & P.K. Dantu (2013a). Gynogenesis. In Bhojwani, S.S. & P.K. Dantu (eds.) *Plant Tissue Culture: An Introductory Text* (pp: 93-111). Springer, India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9_9

Bonga, J.M., Klimaszewska, K.K. & P von Aderkas (2010). Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell, and Tissue Organ Culture*, 100, 241–254. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9647-2>

Dong, Y.Q., Zhao, W.X., Li, X.H., Liu, X.C., Gao, N.N., Huang, J.H., Wang, W.Y., Xu, X.L. & Tang, Z.H. (2016). Androgenesis, gynogenesis, and parthenogenesis haploids in cucurbit species. *Plant Cell Reports*, 35, 1991–2019. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2018-7>

Food and Agriculture Data (FaoStat). (2022). Crops and livestock products Available online: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (accessed on 30 October 2022).

Forster, B.P., Heberle-Bors, E., Kasha, K. J. & Touraev, A. (2007). The resurgence of haploids in higher plants. *TRENDS in Plant Science*, 12(8), 1360–1375. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.06.007>

Fugimoto, R., Uezono, K., Ishikura, S., Osabe, K., Peacock, W. J. & Dennis, E. S. (2018). Recent research on the mechanism of heterosis is important for crop and vegetable breeding systems. *Breeding Science Preview*, 68(2), 17155. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.17155>

Ghuge, M.B. & Mirza, A. (2021). Vegetable breeding strategies. *Asian Journal of Agricultural and Horticultural Research*, 8(2), 28-37. <https://doi.org/10.9734/AJAHR/2021/v8i230113>

Hooghvorst, I. & Nogués, S. (2021). Chromosome doubling methods in doubled haploid and haploid inducer-mediated genome-editing systems in major crops. *Plant Cell Reports*, 40, 255–270. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02605-0>

Kalinowska, K., Chamas, S., Unkel, K., Demidov, D., Lermontova, I., Dresselhaus, T., Kumlehn, J., Dunemann, F. & Houben, A. (2019). State-of-the-art and novel developments of *in vivo* haploid technologies. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(3), 593–605. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3261-9>

Marin-Montes, I.M., Rodríguez-Pérez, J.E., Robledo-Paz, A., de la Cruz-Torres, E., Peña-Lomelí, A. & Sahagún-Castellanos, J. (2022). Haploid induction in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) via gynogenesis. *Plants*, 11, 1595. <https://doi.org/10.3390/plants11121595>

Moose, S. P. & Mumm, R. H. (2008). Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. *Plant Physiology*, 147(3), 969-977. <https://doi.org/10.1104/pp.108.118232>

Niazian, M. & Shariatpanahi, M.E (2020). *In vitro*-based doubled haploid production: recent improvements. *Euphytica*, 216, 69. <https://doi.org/10.1007/s10681-020-02609-7>

Rajcan, I., Boersma, J.G. & Shaw, E.J. (2011). Plant genetic techniques: plant breeder's toolbox: In M. Moo-Young (Ed.). *Comprehensive Biotechnology* (pp. 133–147). Elsevier B.V. ISBN: 978-0-08-088504-9

Samantara, K., Bohra, A., Mohapatra, S.R., Prihatini, R., Asibe, F., Singh, L., Reyes, V.P., Tiwari, A., Maurya, A.K., Croser, J.S., Wani, S.H., Siddique, K.H.M.

& Varshney, R.K. (2022). Breeding more crops in less time: a perspective on speed breeding. *Biology*, 11, 275. <https://doi.org/10.3390/biology11020275>

Seguí-Simarro, J.M. (2016). Androgenesis in Solanaceae. In M. Germana, & M. Lambardi (Eds.). *In vitro embryogenesis in higher plants. methods in molecular biology* (pp. 209-244). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_9

Seguí-Simarro, J.M., Jacquier, N.M.A. & Widiez, T. (2021). Overview of *in vitro* and *in vivo* doubled haploid technologies. In J. M. Segui-Simarro (Ed.) *Doubled haploid technology. Methods in molecular biology* (pp. 3-22). Humana. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1315-3_1

Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS). (2022). Catálogo nacional de variedades vegetales. Disponible online: <https://datastudio.google.com/u/0/reporting/5b7206ba-e190-48fe-9696-73523bfccf58/page/itBWB>

Shariatpanahi, M.E., Niazian, M. & B. Ahmadi (2021). Methods for chromosome doubling. In J. M. Segui-Simarro (Ed.) *Doubled haploid technology. Methods in molecular biology* (pp. 127-148), Humana. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1315-3_5

Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (2021). Anuario Estadístico en la Producción Agrícola. Disponible online: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (30 Octubre 2022).

Tadesse W., Inagaki, M., Tawkaz, S., Baum, M. & van Ginkel, M. (2012). Recent advances and application of doubled haploids in wheat breeding. *African Journal of Biotechnology*, 11(89), 15484-15492. <https://doi.org/10.5897/AJB12.2124>

Yan, G., Liu, H., Wang, H., Lu, Z., Wang, Y., Mullan, D., Hamblin, J. & Liu, C. (2017). Accelerated generation of selfed pure line plants for gene identification and crop breeding. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1786. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01786>

CAPÍTULO II

HAPLOID INDUCTION IN TOMATO (*Solanum lycopersicum* L.) VIA GYNOGENESIS

Ivan Maryn Marin-Montes ¹, Juan Enrique Rodríguez-Pérez ¹, Alejandrina Robledo-Paz ², Eulogio de la Cruz-Torres ³, Aureliano Peña-Lomelí ¹ and Jaime Sahagún-Castellanos ^{1,*}

Citation: Marin-Montes, I.M.; Rodríguez-Pérez, J.E.; Robledo-Paz, A.; de la Cruz-Torres, E.; Peña-Lomelí, A.; Sahagún-Castellanos, J. Haploid Induction in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) via Gynogenesis. *Plants* **2022**, *11*, 1595. <https://doi.org/10.3390/plants11121595>

Academic Editor(s): Giani Barcaccia, Alessandro Vannozzi and Fabio Palumbo

Received: 3 May 2022

Accepted: 13 June 2022

Published: 17 Jun 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

¹ Departamento de Fitotecnía, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo 56230, Mexico;

maryn.montes@gmail.com (I.M.M.-M.); erodriguezx@gmail.com (J.E.R.-P.); penalomeli@gmail.com (A.P.-L.)

² Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgraduados, Montecillo 56230, Mexico; arobledo@colpos.mx

³ Departamento de Biología, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac 52750, Mexico; eulogio.delacruz@inin.gob.mx

* Correspondence: jsahagunc@yahoo.com.mx; Tel.: +59-59521500 (ext. 6185)

Abstract: The generation of new hybrid varieties of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is the most widely used breeding method for this species and requires at least seven self-fertilization cycles to generate stable parent lines. The development of doubled haploids aims at obtaining completely homozygous lines in a single generation, although, to date, routine commercial application has not been possible in this species. In contrast, obtaining doubled haploid lines via gynogenesis has been successfully implemented in recalcitrant crops such as melon, cucumber, pumpkin, loquat and walnut. This review provides an overview of the requirements and advantages of gynogenesis as an inducer of haploidy in different agricultural crops, with the purpose of assessing the potential for its application in tomato breeding. Successful cases of gynogenesis variants involving in vitro culture of unfertilized ovules, use of ⁶⁰Co-irradiated pollen, in vivo *haploid inducers* and wide hybridization are presented, suggesting that these methodologies could be implemented in tomato breeding programs to obtain doubled haploids.

Keywords: doubled haploids; in vitro ovule culture; irradiated pollen; wide hybridization; in vivo *haploid inducers*; breeding

2.1. Introduction

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the most consumed vegetable species worldwide, which is reflected in its production in 2019 when just over five million hectares were planted, yielding 180,166,329 tons of fruits [1]. This wide diffusion in production areas with the presence of various adverse factors continuously demands improved varieties that provide the possibility of increasing the production and quality of the fruit, with the necessary characteristics to carry out the appropriate agronomic management. This is a constant task within the world seed market

in which the plant breeder is obliged to design strategies to reduce the time required to obtain new commercial varieties.

The vegetable seed market is increasingly offering hybrid varieties that allow obtaining better yields and fruit quality by taking advantage of the phenomenon of heterosis and by immediately combining characteristics of both parents. This methodology, in its classic version, requires obtaining pure lines, or populations with high inbreeding, to ensure the stability of the generated genotype [2,3]. The classical breeding of autogamous species, such as tomato, requires the execution of several stages: an initial cross to generate genetic variability, the selection of segregating genotypes to obtain homozygous lines with traits of agronomic interest, the identification of combinations between parent lines with a high expression of heterosis, the evaluation of yield and quality and stability of the hybrids under production conditions and the final release of the improved hybrid variety.

In this process, obtaining lines alone requires at least seven self-fertilization cycles [3,4], which means that the time invested to release a new variety occurs in a period of 11 to 13 years [3]. This makes it necessary to develop alternatives to reduce the time to obtain homozygous genotypes. Currently, two main techniques are used: (a) doubled haploids (DHs) and (b) the fast generation cycle system (FGCS) [3]. Of these options, doubled haploids are the most widely used in different agricultural crops due to their efficiency in obtaining pure lines in crops such as *Oryza sativa* L. [5,6], *Zea mays* L. [7–9] and *Triticum aestivum* L. [10,11].

The generation of doubled haploids through androgenesis has not had the expected results in some vegetables of high economic value such as chili pepper (*Capsicum* spp.) [12], eggplant (*Solanum melongena* L.) [12], tomato [2,4] and cucurbits [14]. In tomatoes, studies have been carried out to induce haploidy by another culture, although satisfactory results have not been obtained to allow its routine application in breeding programs [4,15]. However, given the possibility of substantially reducing the time to obtain lines by using this technique, it is attractive to continue the search for alternatives that allow for efficiently obtaining DHs in this culture.

Gynogenesis is a viable methodology with promising results in recalcitrant species for the generation of doubled haploids, which uses unpollinated female gametophytes [14,16]. This technique has been successful in loquat (*Eriobotrya japonica* (Thumb) Lindl.) [17], citrus (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) [18], spinach (*Spinacia oleracea* L.) [19], cucurbits [14,20], red beet (*Beta vulgaris* L.) [21] and *Gentiana* ssp. [22] crops, where it is feasible to apply this technique in breeding.

However, in tomatoes, results that support the routine use of gynogenesis have not yet been found. Therefore, this literature review focuses on the advantages of gynogenesis, its requirements, success stories and the state of the art in the generation of doubled haploid plants in tomatoes.

2.2 Importance of Doubled Haploids

Doubled haploid (DH) produces homozygous genotypes in a single generation. The idea is to generate a haploid genotype with a single set of n chromosomes; subsequently, through chromosomal duplication, genotypes with $2n$ chromosomes are generated. These plants have two identical chromosome sets and, consequently, are homozygous at each of their *loci* [23,24]. To achieve the above, the protocols reported worldwide coincide in the following procedure: (a) induction of haploidy by in vitro culture of anthers [5], ovules [12,13] or in vivo induction [9,25]; (b) duplication of chromosomal material by colchicine [24]; and (c) determination of haploidy level by squash root apices and/or flow cytometry [5,7,17].

The generation of homozygous individuals by haploid doubling has become a useful and efficient tool in the breeding of plants such as maize [27,28], wheat [29,30] and rice [31,32]. The main reasons for using DHs in breeding programs are: (1) obtaining pure lines in a single generation, (2) fixing desirable genotypic combinations, (3) increasing selection efficiency, and (4) reducing sample size for selection. These advantages help reduce the time and cost of breeding, which can

represent savings in the order of millions of dollars, even in the case of small breeding programs, by substantially increasing the achievement of outstanding results [23].

Several in vitro tissue culture techniques have been developed in different species of agricultural interest for the generation of doubled haploids for commercial purposes. Of these, androgenesis is the most reported worldwide [23,24]. However, the results of this methodology are varied due to the little or no response of anthers to in vitro culture conditions (recalcitrance). A recalcitrant species is one in which morphogenetic processes such as somatic embryogenesis or organogenesis are not successful, and therefore, it is not possible to regenerate plants even when provided with favorable culture conditions [33]. For this reason, recalcitrance is the main problem for haploidy induction by in vitro anther culture. Among the species of agricultural interest with this problem are some *Solanaceae* [2] and *Cucurbitaceae* [14]; therefore, the search for alternatives to induce haploids continues to reduce breeding processes for the development of new commercial varieties.

2.3 Doubled Haploids in Tomato

Obtaining DHs in tomato has been the subject of research for more than 30 years due to the economic importance of the crop; however, no standardized, efficient and reproducible protocols for generating doubled haploids in this vegetable have been reported in the literature reviewed. Among the factors identified that prevent the achievement of this objective are recalcitrance to in vitro culture [4,15] and polyploidy generated by the fusion of nuclei [34,35]. It is still necessary to define the physical and chemical conditions of the in vitro culture, the genotype dependency, the physiological state of the mother plant and anther development and the composition of the medium and the incubation conditions, which affects the repeatability of protocols to achieve the induction of haploid plants [2,15]. The first published studies on androgenesis in tomato reported that it is possible to obtain haploid callus and maintain it for 7 months, although with the subsequent morphogenetic induction of roots only [36]. Subsequently, it was reported that it is feasible to obtain haploid plants by in vitro culture of anthers of *S. pimpinellifolium* L. and *S. peruvianum* L. [37]. Their success was in choosing the correct developmental stage of the anthers, which is between metaphase I and telophase II of microspore development [38].

Different evaluations of the in vitro culture of tomato anthers led to the conclusion that it is possible to obtain plants by organogenesis (adventitious shoots) and that this would allow accelerating their breeding, although it is still not an efficient way for haploid induction due to the few replicable results [39,40]. The generation of haploids in tomato is not efficient because anthers generate three types of callus (an irregular mass of parenchyma tissue that, despite lacking structure, allows cell differentiation), which was induced by 4.4 g·L⁻¹ of Murashige and Skoog medium, 20 g·L⁻¹ sucrose, 1 mg·L⁻¹ 2-isopentenyladenine and 2 mg·L⁻¹ indoleacetic acid, where the calli that presented polygonal cells with a large vacuole and faster growth became amorphous and friable macroscopic masses with a rough and granular surface where only 7% of cells were haploid [41]. Similarly, it was shown that from gametophytes and sporophytes it is possible to obtain calli; however, in these the nuclei fuse, leading to polyploidy [42]. Likewise, CorralMartínez et al. [34] obtained calli by culturing 4- to 5-mm-long anthers of the ms1035 mutant in an induction medium composed of 4.4 g·L⁻¹ of Murashige and Skoog medium, 2.5 g·L⁻¹ phytagel, 20 g·L⁻¹ sucrose, 1 mg·L⁻¹ 2-isopentenyladenine and 2 mg·L⁻¹ indoleacetic acid; however, they did not obtain a favorable response, and only one plant was haploid out of the 83 regenerated, which was attributed to the fact that the growth rate of callus of somatic origin is higher compared to those generated from meiocytes.

Based on these advances, further research has been carried out to improve protocols for generating doubled haploids. For example, Moreno et al. [43] determined that in tomato it is possible to culture anthers in vitro with microspores from the tetrad stage to the uninucleate stage by using the regulators 2-isopentenyladenine (1 mg·L⁻¹) and indoleacetic acid (4 mg·L⁻¹); with this, the 2*n* androgenic plants generated was 97%, although the fusion of the meiocyte nuclei generated

the loss of complete homozygosity of the plants obtained. Thus, Niazian et al. [15], using the artificial neural network model for image processing, found that the main factors determining androgenesis and callus induction and regeneration are the genotype and the concentration of 2,4-dichlorophenoxyacetic.

Due to the recalcitrance of tomato, the results achieved in androgenesis so far have not been favorable or replicable; therefore, there is still no reliable and efficient methodology for haploid induction. However, due to the great advantages that DHs represent in breeding, it is necessary to continue searching for successful alternatives for this purpose (Table 1).

Cuadro 2. 1. Reports of androgenesis methodology in *Solanum lycopersicum* L.

Species	Common Name	Pathway	Ploidy Level Determination	Haploid Plants	Reference
<i>S. lycopersicum</i> L.	Tomato	Anther culture	Flow cytometry	3	Corral-Martínez et al. [34]
		Anther culture	Flow cytometry	0	Julião et al. [35]
		Anther culture	Burn's technique	0	Sharp et al. [36]
		Anther culture	Flow cytometry	0	Seguí-Simarro et al. [38]
		Anther culture	Flow cytometry	0	Seguí-Simarro et al. [41]
		Anther culture	Flow cytometry	0	Seguí-Simarro et al. [42]
		Anther culture	Flow cytometry	0	Moreno et al. [43]

2.4. Gynogenesis in Agricultural Crops

Haploid regeneration by means of unpollinated female gametophytes is one of the most commonly used alternatives in species where androgenesis has not been effective; this method is called haploid gynogenesis or haploid parthenogenesis. The term gynogenic haploid regeneration is used for all haploid induction methods in which a female gametophyte is used as the origin of the haploid cells, regardless of whether it is a pseudofertilization process or not; therefore, there are four variants: (a) in vitro culture of unfertilized ovaries or ovules [14], (b) pollination with pollen irradiated with cobalt-60 (^{60}Co) [16,20], (c) wide hybridization [16] and (d) in vivo haploid inducers [20,25].

2.4.1. In Vitro Culture of Ovaries or Ovules

In the case of self-pollinated species, in vitro culture of unfertilized female gametes is achieved by culturing flower buds prior to anthesis, while in male-sterile or self-incompatible plants it is performed at any stage of ovule development, since they show a favorable response to gynogenic induction [24]. This technique is successfully employed in species of the genus *Allium*, where it is the main technique to derive DHs [44]. For example, Panahandeh et al. [45] achieved a gynogenic induction range of 5 to 12% by culturing unpollinated flower buds of *Allium hirtifolium* Boiss., which allowed callus formation with a success rate of 20%, of which the efficiency of obtaining haploid plants was 70 to 77%. This technique is also viable in both wild and improved species of the genus *Gentiana* L. spp. [22,46,47]. Although the results obtained were promising in both species mentioned, the authors agree that it is necessary to continue with the establishment of efficient protocols because the average response in obtaining haploid plants does not exceed 5% (Table 2).

Cuadro 2. 2. Examples of protocols used for successful haploid induction mediated *in vitro*

Species	Common Name	Pathway	Ploidy Level Determination	Haploid Induction Rate	Reference
<i>Beta vulgaris</i> L.	Red beet	Unfertilized ovule culture	Flow cytometry and chromosome counting	25%	Zayachkovskaya et al. [21]
<i>Gentiana</i> spp.	Gentians	Unfertilized ovule culture	Flow cytometry and molecular marker analysis	32.5%	Takamura et al. [22]
<i>Allium hirtifolium</i> Boiss	Persian shallot	Unfertilized ovary	Squash root	0–77%	Panahandeh et al. [45]
<i>Gentiana triflora</i>	Gentians	Unfertilized ovules	Flow cytometry and Feulgen staining	23.5–56%	Doi et al. [47]
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Tomato	Non-fertilized ovary culture	-	0%	Bal et al. [78]

2.4.2. Irradiated Pollen

Irradiated pollen allows the development of haploid embryos by fertilizing an ovule with mature pollen whose genetic material is inactive, i.e., it is capable of inducing cell divisions in the ovule and the normal development of the embryo [16]. There are many favorable examples involving the use of irradiated pollen in different vegetable and fruit species in which androgenesis was not an option (Table 3).

Cuadro 2. 3. Examples of successful haploid induction methods by induced parthenogenesis

Species	Common Name	Pathway	Ploidy Level Determination	Haploid Induction Rate	Reference
<i>Eriobotrya japonica</i> (Thunb.) Lindl.	Loquat	γ -irradiated pollen	Flow cytometry	0.007–0.008%	Blasco et al. [17]
<i>Citrus grandis</i> (L.) Osbeck	Pummelo	γ -irradiated pollen	Flow cytometry	1% _s	Wang et al. [51]
<i>Spinacia oleracea</i> L.	Spinach	γ -irradiated pollen	Flow cytometry	-	Keleş et al. [19]
<i>Cucumis melo</i> L.	Melon	γ -irradiated pollen	Flow cytometry	14–33%	Lotfi et al. [49]
<i>Cucumis melo</i> L.	Melon	γ -irradiated pollen	Chromosome counting	23.65%	Nasertorabi et al. [50]
<i>Citrus reticulata</i>	Mandarin	γ -irradiated pollen	Flow cytometry	2.58–8.33%	Jedidi et al. [52]

Thus, Hooghvorst et al. [20] and Kurtar et al. [48] reported that in cucurbits, a family containing crops of high economic value such as pumpkin, melon and cucumber, pollination with γ -ray-irradiated pollen is the most efficient method to induce haploidy because it has not been possible to take advantage of androgenesis in these crops. In *Cucumis melo* L., pollen irradiated with 250 Gys of ^{137}Cs was more effective compared to in vitro culture of unpollinated ovules [49]. Likewise, Nasertorabi et al. [50] obtained 48 *Cucumis melo* L. plants induced from embryos obtained with pollen irradiated with 550 Gys of ^{60}Co , of which 94% were haploid.

In citrus, this technique has proven to be very useful to obtain haploid plants with high value for breeding. For example, Wang et al. [51] were able to induce haploid plants in *Citrus grandis* L. Osbeck by irradiating pollen with γ -rays with doses lower than 500 Gys and in vitro culture of immature embryos. Likewise, Jedidi et al. [52], by irradiating pollen at 250 Gys with γ -rays, obtained seven seedlings that were used to generate homozygous lines in *Citrus reticulata* Blanco.

2.4.3. Wide Hybridization

The third variant of gynogenesis consists of interspecific crosses, through which it is possible to induce the formation of haploid embryos due to the fertilization of an ovule with pollen from a distant species, allowing double fertilization. However, cell divisions in the zygote eliminate the chromosomes of the male parent [16,53]. Thus, Santra et al. [54] published an efficient protocol to obtain completely homozygous lines in only two years by wide hybridization to obtain DHs from wheat pollinated with maize pollen.

Although wide hybridization is most commonly used in cereals, in recent years its application in leafy vegetables has been shown to have acceptable results in the induction of haploid plants (Table 4). For example, Piosik et al. [55] carried out distant hybridization of *Lactuca sativa* L. with *Helianthus annuus* L. and *Helianthus tuberosus* L., with which they established an effective methodology to induce haploidy in lettuce. In addition, Wei et al. [56] obtained haploid offspring by embryo rescue and subsequent duplication of chromosomal material with colchicine using a commercial variety of *Brassica oleracea* var. *alboglabra* as the male parent and a variety of *Brassica rapa* var. *parachinensis* as the female parent. Similarly, haploid plants were obtained by crossing *Brassica rapa* X *Brassica oleracea* and in vitro culture of immature embryos [57].

Cuadro 2. 4 Summary of haploid induction methodologies by wide hybridization.

Species	Common Name	Pathway	Ploidy Level Determination	Haploid Induction Rate	Reference
<i>Triticum aestivum</i> L.	Wheat	Wheat x maize crossing	-	-	Wiśniewska et al. [10]
<i>Lactuca sativa</i> L.	Lettuce	Cross-pollination with <i>Helianthus annuus</i> L.	Flow cytometry and chromosome counting	15%	Piosik et al. [55]
<i>Lactuca sativa</i> L.	Lettuce	Cross-pollination with <i>Helianthus tuberosus</i> L.	Flow cytometry and chromosome counting	16%	Piosik et al. [55]
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Tomato	Cross-pollination with <i>S. sisymbriifolium</i> Lam.	Chromosome counting	0%	Bal et al. [76]
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Tomato	Cross-pollination with <i>S. sisymbriifolium</i> Lam.	Flow cytometry and chromosome counting	~10% cells haploids	Chambonnet [77]

2.4.4. In Vivo Haploid Induction

In the past decade, methodologies applied to induce in vivo haploidy to accelerate the production of double haploid lines have been developed for several target crops [20,58]. These methodologies take advantage of the specific gene expressions that regulate the formation of maternal haploids (Table 5). In maize, the generation of in vivo haploid inducer lines of maternal haploidy via the expression of the genes *MATL* [9], *NLD* [59] and *ZmPLA1* has been possible [60]. In wheat, the genetic edition of the gen *MTL* permitted to observe that the alleles *mtl-AD*, *mtl-BD* and *mtl-ABD* were effective to generate inducer lines from self-pollinated and cross-pollinated progenies; its rate of success ranged between 7.8% and 15.6%. However, these genes do not work in dicot species [62]. On the other hand, the haploid induction from aneuploidy is possible via CRISPR/Cas9

mutation of the *CENH3* gene in both monocot and dicot crops [20,58]. These two methodologies are very promising and are used in cereals because they have been more efficient than the in vitro methods.

Cuadro 2. 5 Summary of haploid induction reports via in vivo haploid inducers.

Species	Common Name	Pathway	Ploidy Level Determination	Haploid Induction Rate	Reference
<i>Zea mays</i> L.	Maize	Inducer inbred lines	Morphological markers	2.5–15.7%	Qu et al. [7]
<i>Zea mays</i> L.	Maize	BHI Bulk	Embryo coloration (R1-nj)	11.2–16.8%	Trampe et al. [8]
<i>Zea mays</i> L.	Maize	Frame-shift mutation in <i>MATRILINEAL</i> (<i>MTL</i>)	Flow cytometry	6.7%	Kelliher et al. [9]
<i>Zea mays</i> L.	Maize	Eliminate native <i>CENH3</i> -gene	Flow cytometry	0.05–0.31%	Kelliher et al. [25]
<i>Zea mays</i> L.	Maize	Inducer lines (NOT LIKE DAD)	Morphological markers	0–3.59%	Gilles et al. [59]
<i>Triticum aestivum</i> L.	Wheat	Edited the <i>MTL</i> alleles using CRISPR/Cas9	Chromosome counting	0–15.6%	Tang et al. [61]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Arabidopsis	Edited the <i>DMP</i> genes using CRISPR/Cas9	Flow cytometry	0–4.41%	Zhong et al. [62]
<i>Brassica napus</i> L.	Oilseed rape	Knocked out of <i>BnaDMP</i> using CRISPR/Cas9	Flow cytometry	1.5 ± 0.63%	Li et al. [64]
<i>Brassica napus</i> L.	Oilseed rape	<i>DMP</i> CRISPR/Cas9 mutagenesis	Flow cytometry	0–4.44%	Zhong et al. [63]
<i>Nicotiana tabacum</i>	Tobacco	<i>DMP</i> CRISPR/Cas9 mutagenesis	Flow cytometry	0–1.63%	Zhong et al. [63]
<i>Nicotiana tabacum</i>	Tobacco	<i>DMP</i> CRISPR/Cas9 mutagenesis	Flow cytometry and cytological observation	1.52–1.75%	Zhang et al. [65]
<i>Medicago truncatula</i> Gaertn	Barrel medic	<i>DMP</i> CRISPR/Cas9 mutagenesis	Flow cytometry	0.29–0.82%	Wang et al. [66]
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Tomato	<i>DMP</i> CRISPR/Cas9 mutagenesis	Flow cytometry	0.5–3.7%	Zhong et al. [67]
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Tomato	Edition of the <i>CENH3</i> gen with GFP-tailswap disruption	Flow cytometry	0.2–2.3%	Op Den Camp et al. [88]

In contrast, the conservation of the *DMP* genes in dicot species opens up the possibility to apply this haploidy induction system [62]. From this starting point, protocols for some horticultural crops have been developed. In *Brassica napus* L., *bnaDMP* mutation could induce amphihaploidy [63,64]. In *Nicotiana tabacum* L., it was reported that the simultaneous *MtDMP1*, *MtDMP2* and *MtDMP3* mutations can trigger maternal haploidy at rates from 1.52% to 1.75%. In contrast, the inactivation of the *MtDMP8* and *MtDMP9* alleles in *Medicago truncatula* Gaertn would facilitate in vivo maternal haploid induction at a rate from 0.29% to 0.82% in mutant progeny [66]. Despite

these results, the use of *DMP* genes is not very frequent because there are not transformation systems (CRISPR/Cas9) or TILLING populations in major crops [20,63].

2.5. Gynogenesis in Tomato

Due to the few successful results obtained by androgenesis for haploidy induction and the formation of doubled haploids in tomato, some research groups have sought alternatives to achieve this goal. The options employed are variants of gynogenesis: wide hybridization, unfertilized ovule culture and irradiated pollen [4]; and haploid inducers/CRISPR/Cas9 [67]; however, it is not yet fully known what these could mean for the breeding of this crop.

2.5.1. Wide Hybridization

Wild species phylogenetically related to tomato are commonly used for crop improvement to incorporate alleles of interest into crop breeding programs, most notably *S. pimpinellifolium* [68], *S. arcanum* Peralta [69], *S. sitiens* I. M. Johnst [70], *S. pinnelli* L.[71], *S. chilense* (Dunal) Reiche [72], *S. neorickii* D. M. Spooner, G. J. Anderson & R. K. Jansen [73], *S. habrochaites* S. Knapp & D. M. Spooner [74] and *S. sisymbriifolium* Lam. [75].

The general use of wide crosses in this species is not only performed to induce haploidy, as some studies have attempted to apply them to generate DHs (Table 4). For example, *S. sisymbriifolium* pollen was used unsuccessfully to induce haploids [76]. In contrast, *S. sisymbriifolium* pollen allowed obtaining haploid and di-haploid genotypes of maternal origin.

Even though only ~10% of embryos were rescued and only two plants were generated, the results suggest that it may be a viable alternative; however, the author suggests that the procedure needs to be modified to improve results [77].

2.5.2. Unfertilized Ovule Culture

Few attempts have been made to obtain haploid tomato plants by in vitro culture of unfertilized ovules (Table 2). In tomato, this objective was not possible despite the fact that ovules have a variable response to different culture media [78]. Moreover, Zhao et al. [79] designed a very efficient in vitro protocol with which they isolated, from a single ovary in tomato, between 100 and 150 ovules with which they were able to induce gynogenic callus; despite this, they were unsuccessful in regenerating haploid plants.

2.5.3. Irradiated Pollen

Regarding the use of irradiated pollen in tomato, the work carried out is limited, although the results are promising (Table 3). Thus, Nishiyama et al. [80] reported that *S. pimpinellifolium* pollen maintains its germination capacity and that it is possible to generate fruits with some seeds with doses of 2000 to 7000 Gys of X-rays. In addition, Nishiyama et al. [81], when applying between 100 and 1100 Gys in increments of 100 Grays with X and γ radiation to *S. pimpinellifolium* pollen, found that it has the same effect on germination and fruit set, with a pollen germination capacity of less than 50% with doses higher than 300 Gys. These studies suggest the possibility of obtaining tomato fruits and seeds from irradiated pollen, although the doses used did not allow inactivating the genetic material of the microspore and inducing haploid parthenogenesis. However, the success of this technique obtained in other crops allows us to assume that it is essential to determine the median lethal dose (LD₅₀), which could vary according to the genotype and species [14,18].

For this methodology to be used in tomato breeding programs for haploidy induction, the optimum dose for the inactivation of genetic material in pollen must be determined. In recent years, Akbudak et al. [82] irradiated pollen from different tomato hybrids with doses of 100, 200, 300 and 400 Gys of γ -rays without obtaining fruit in any treatment although radiation doses higher than 200 Gys correspond to LD₅₀. Likewise, Bal et al. [4] mentioned their own unpublished work on haploidy induction in this crop using irradiated pollen, where 1000 Gys caused the loss of viability and germination capacity of the pollen; however, with 800 Gys, fruits were generated, which were aborted in the early stages of development.

2.5.4. In Vivo Haploid Inducers

In tomato, the use of CRISPR/Cas9 has been applied to achieve objectives such as introgression breeding [83], plant architecture, fruit development and ripening [84], herbicide-resistance [85], leaf development [86] and ToBRFV-resistant tomato [87]. This suggests that it is possible to generate protocols to use the *DMP* and *CENH3* genes that regulate the gynogenesis to facilitate the generation of maternal haploid inducer males, as reported in maize [9,59,60] and wheat [61]. Thus, Zhong et al. [67] obtained *sldmp* tomato mutants using CRISPR/Cas9, with a rate of 1.9% for haploidy induction. Likewise, KEYGENE N. V. (Wageningen, Netherlands) has a patent for a methodology to generate haploids via GFP-tailswap disruption that by editing the *CENH3* gene produces 0.5–2.3% of haploids [87]. These achievements produced by genetic edition show the potential of the in vivo haploid inducers to obtain DH lines in tomato and other recalcitrant crops.

2.6. Future Perspectives

Once haploid induction is possible in tomato, the next step would be to restore the chromosomal level of the crop to obtain 100% homozygous lines. For this, as is routinely performed in other species, colchicine could be used. It is expected that this would not be an obstacle for the generation of doubled haploids in tomato because the use of colchicine has allowed obtaining tetraploid genotypes [89,90]. Therefore, it is necessary for researchers to generate the appropriate methodology for the induction of haploid plants.

Based on the information presented in this paper, it is possible to infer that the use of irradiated pollen may be an option to develop a method to induce haploidy and subsequent development of DH lines in crops recalcitrant to in vitro culture; however, to be used in tomato, it is necessary to determine, through radiosensitivity studies, the appropriate radiation dose for the formation of haploid seeds or embryos. Thus, previous work on this species offers a basis for designing experiments to determine the LD₅₀ in pollen; for this, it is suggested to use doses of less than 200 Gys of ⁶⁰Co. Simultaneously, studies should be carried out to determine both the appropriate culture medium that allows in vitro development of immature embryos and the period between pollination and embryo rescue for their culture to generate haploid plants.

The use of the genetic edition with CRISPR/Cas9 in tomato may lead to the development of efficient protocols to activate the *DMP* and *CENH3* genes involved in the gynogenesis regulation. If the new protocols were more successful in inducing haploidy than the existing ones for dicots, their use in plant breeding would facilitate obtaining fully homozygous genotypes in a short time.

2.7. Materials and Methods

The search for scientific information was carried out using the following keywords in English and their equivalents in Spanish: *Solanum lycopersicum* L., tomato, doubled haploid, haploid induction, androgenesis, anther culture, gynogenesis, haploid embryo, embryo rescue, pollination with irradiated pollen, unfertilized ovule, ovary culture, irradiated pollen, pseudofertilized ovule culture, in vivo haploid inducer, maternal haploids, CRISPR/Cas9 haploid and wide hybridization. The search was carried out in different databases: Scopus, Web of Science, SciELO, Springer Link, ScienceDirect, Conricyt, Crossref, EBSCO, PubMed, Taylor and Francis, Wiley Online Library, Google Scholar, Dialnet, Redalyc and ResearchGate. A total of 350 written works were consulted of which 91 were selected, including books, scientific or review articles and scientific notes related to the use of methodologies for the generation of doubled haploids and to success stories in breeding programs for different agricultural crops.

2.8. Conclusions

Doubled haploids are an alternative with great advantages for breeding. Their application in tomato has not yet been possible in a conventional way. A promising technique is to use gynogenesis techniques, specifically irradiated pollen, which together with the rescue of immature embryos and in vitro culture may be an efficient means of achieving this objective. However, novel approaches such as the use of CRISPR/Cas9 mutation system, and its obtained

successful results in editing *DMP* and *CENH3* genes trigger in vivo haploidy induction, but it still needs to be explored. Therefore, both methodologies to induce haploidy are to be considered in tomato to achieve its application in breeding programs to take advantage of DHs in terms of time and cost, which would be greatly appreciated by breeders.

Author Contributions: Conceptualization: I.M.M.-M., J.E.R.-P. and A.P.-L.; methodology: I.M.M.-M., J.S.-C. and J.E.R.-P.; resources: J.S.-C. and J.E.R.-P.; investigation: I.M.M.-M., J.E.R.-P., A.R.-P., E.d.I.C.-T., A.P.-L. and J.S.-C.; writing—original draft preparation, I.M.M.-M., J.S.-C. and J.E.R.-P.; writing—review and editing: I.M.M.-M., J.E.R.-P., A.R.-P., E.d.I.C.-T., A.P.-L. and J.S.-C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

2.9. References

- Food and Agriculture Data (2021). Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#data> (accessed on October 2021).
- Seguí-Simarro, J.M. Androgenesis in Solanaceae: In *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants. Methods in Molecular Biology*; Germanà, M.A., Lambardi, M., Eds.; Springer Science + Business Media: New York, NY, USA, 2016; pp. 209–244. ISBN 978-1-4939-3061-6.
- Yan, G.; Liu, H.; Wang, H.; Lu, Z.; Wang, Y.; Mullan, D.; Hamblin, J.; Liu, C. Accelerated generation of selfed pure line plants for gene identification and crop breeding. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1786. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01786>.
- Bal, U.; Abak, K. Haploidy in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): A critical review. *Euphytica* **2007**, *158*, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9427-1>.
- Hooghvorst, I.; Ramos-Fuentes, E.; López-Cristofannini, C.; Ortega, M.; Vidal, R.; Serrat, X.; Nogués, S. Antimitotic and hormone effects on green double haploid plant production through anther culture of Mediterranean japonica rice. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **2018**, *134*, 205–215. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1413-x>.
- Duyen, D.V.; Kwon, Y.; Kabange, N.R.; Lee, J.-Y.; Lee, S.-M.; Kang, J.-W.; Park, H.; Cha, J.-K.; Cho, J.-H.; Shin, D.; et al. Novel QTL associated with aerenchyma-mediated radial oxygen loss (ROL) in rice (*Oryza sativa* L.) under iron (II) sulfide. *Plants* **2022**, *11*, 788. <https://doi.org/10.3390/plants11060788>.
- Qu, Y.; Liu, Z.; Zhang, Y.; Yang, J.; Li, H. Improving the sorting efficiency of maize haploid kernels using an NMR-based method with oil content double thresholds. *Plant Methods* **2021**, *17*, 2. <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00703-4>.
- Trampe, B.; Batîru, G.; Pereira da Silva, A.; Frei, U.K.; Lübberstedt, T. QTL mapping for haploid inducibility using genotyping by sequencing in maize. *Plants* **2022**, *11*, 878. <https://doi.org/10.3390/plants11070878>.
- Kelliher, T.; Starr, D.; Richbourg, L.; Chintamanani, S.; Delzer, B.; Nuccio, M.L.; Green, L.; Chen, Z.; McCuiston, J.; Wang, W.; et al. MATRILINEAL, a sperm-specific phospholipase, triggers maize haploid induction. *Nature* **2017**, *542*, 105–109. <https://doi.org/10.1038/nature20827>.
- Wiśniewska, H.; Majka, M.; Kwiątek, M.; Gawłowska, M.; Surma, M.; Adamski, T.; Kaczmarek, Z.; Drzazga, T.; Lugowska, B.; Korbas, M.; et al. Production of wheat-doubled haploids resistant to eyespot supported by marker-assisted selection. *Electron. J. Biotechnol.* **2019**, *37*, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2018.10.003>.
- Al-Ashkar, I.; Alderfasi, A.; El-Hendawy, S.; Al-Suhaibani, N.; El-Kafafi, S.; Seleiman, M.F. Detecting salt tolerance in doubled haploid wheat lines. *Agronomy* **2019**, *9*, 211. <https://doi.org/10.3390/agronomy9040211>.
- Palacios, M.A.; Seguí-Simarro, J.M. Anther culture in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.); In *Doubled Haploid Technology*. Seguí-Simarro, J.M. Eds.; Methods in Molecular Biology, Humana: New York, NY, USA, 2021; pp. 279–292. ISBN: 9781071613345.
- Mir, R.; Calabuig-Serna, A.; Seguí-Simarro, J.M. Doubled haploids in eggplant. *Biology* **2021**, *10*, 685. <https://doi.org/10.3390/biology10070685>.
- Dong, Y.Q.; Zhao, W.X.; Li, X.H.; Liu, X.C.; Gao, N.N.; Huang, J.H.; Wang, W.Y.; Xu, X.L.; Tang, Z.H. Androgenesis, gynogenesis, and parthenogenesis haploids in cucurbit species. *Plant Cell Rep.* **2016**, *35*, 1991–2019. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2018-7>.

Niazian, M.; Shariatpanahi, M.E.; Abdipour, M.; Oroojloo, M. Modeling callus induction and regeneration in an anther culture of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) using image processing and artificial neural network method. *Protoplasma* **2019**, *256*, 1317–1332. <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01379-x>.

Forster, B.P.; Heberle-Bors, E.; Kasha, K.J.; Touraev, A. The resurgence of haploids in higher plants. *Trends Plant Sci.* **2007**, *12*, 378–375. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.06.007>.

Blasco, M.; Badenes, M.L.; Del Mar Naval, M. Induced parthenogenesis by gamma-irradiated pollen in loquat for haploid production. *Breed. Sci.* **2016**, *66*, 606–612. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.16021>.

Kundu, M.; Dubey, A. Effect of gamma ray irradiated pollen technique on seed development pattern in Citrus. *Indian J. Genet. Plant Breed.* **2020**, *80*, 450–458. <https://doi.org/10.31742/IJGPB.80.4.11>.

Keleş, D.; Özcan, C.; Pınar, H.; Ata, A.; Denli, N.; Yücel, N.; Taşkın, H.; Büyükalaca, S. First report of obtaining haploid plants using tissue culture techniques in spinach. *HortScience* **2016**, *51*, 742–749. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.51.6.742>.

Hooghvorst, I.; Nogués, S. Opportunities and challenges in doubled haploids and haploid inducer-mediated genome-editing systems in cucurbits. *Agronomy* **2020**, *10*, 1441. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091441>.

Zayachkovskaya, T.; Domblides, E.; Zayachkovsky, V.; Kan, L.; Domblides, A.; Soldatenko, A. Production of gynogenic plants of red beet (*Beta vulgaris* L.) in unpollinated ovule culture in vitro. *Plants* **2021**, *10*, 2703. <https://doi.org/10.3390/plants10122703>.

Takamura, Y.; Takahashi, R.; Hikage, T.; Hatakeyama, K.; Takahata, Y. Production of haploids and doubled haploids from unfertilized ovule culture of various wild species of gentians (*Gentiana* spp.). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **2021**, *146*, 505–514. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02084-5>.

Rajcan, I.; Boersma, J.G.; Shaw, E.J. Plant genetic techniques: Plant breeder's toolbox. In *Comprehensive Biotechnology*; Moo-Young, M., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2011; pp. 133–147, ISBN: 978-0-08-088504-9.

Asif, M. *Progress and Opportunities of Doubled Haploid Production*; Springer International Publishing: New York, NY, USA, 2013; p. 75. ISBN: 978-3-319-00732-8.

Kelliher, T.; Starr, D.; Wang, W.; McCuiston, J.; Zhong, H.; Nuccio, M.L.; Martin, B. Maternal haploids are preferentially induced by CENH3-tailswap transgenic complementation in maize. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 414. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00414>.

Maqbool, M.A.; Beshir, A.; Khokhar, E.S. Doubled haploids in maize: Development, deployment, and challenges. *Crop Sci.* **2020**, *60*, 2815–2840. <https://doi.org/10.1002/csc2.20261>.

Chaikam, V.; Molenaar, W.; Melchinger, A.E.; Boddupalli, P.M. Doubled haploid technology for line development in maize: Technical advances and prospects. *Theor. Appl. Genet.* **2019**, *132*, 3227–3243. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03433-x>.

Cerrudo, D.; Cao, S.; Yuan, Y.; Martinez, C.; Suarez, E.A.; Babu, R.; Zhang, X.; Trachsel, S. Genomic selection outperforms marker assisted selection for grain yield and physiological traits in a maize doubled haploid population across water treatments. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 366. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00366>.

Asif, M.A.; Schilling, R.K.; Tilbrook, J.; Brien, C.; Dowling, K.; Rabie, H.; Short, L.; Trittermann, C.; Garcia, A.; Barrett-Lennard, E.G.; et al. Mapping of novel salt tolerance QTL in an Excalibur × Kukri doubled haploid wheat population. *Theor. Appl. Genet.* **2018**, *131*, 2179–2196. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3146-y>.

Khumalo, T.P.; Barnard, A.; Dube, E.; Tsilo, T.J. Characterization of vegetative vigor of two doubled-haploid wheat populations. *J. Crop Improv.* **2021**, *19*, 1542–7528. <https://doi.org/10.1080/15427528.2021.1970675>.

Anshori, M.F.; Purwoko, B.S.; Dewi, I.S.; Ardie, S.W.; Suwarno, W.B. A new approach to select doubled haploid rice lines under salinity stress using indirect selection index. *Rice Sci.* **2021**, *28*, 368–378. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2021.05.007>.

Akbar, M.R.; Purwoko, B.P.; Dewi, I.S.; Suwarno, W.B.; Sugiyanta, S.; Anshori, M.F. Agronomic and yield selection of doubled haploid lines of rainfed lowland rice in advanced yield trials. *Biodiversitas* **2021**, *22*, 3006–3012. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220754>.

Bonga, J.M.; Klimaszewska, K.K.; Aderkas, P.V. Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **2010**, *100*, 241–254. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9647-2>.

Corral-Martínez, P.; Nuez, F.; Seguí-Simarro, J.M. Genetic, quantitative and microscopic evidence for fusion of haploid nuclei and growth of somatic calli in cultured ms1035 tomato anthers. *Euphytica* **2011**, *178*, 215–228. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0303-z>.

Julião, S.A.; Carvalho, C.R.; da Silva, T.C.R.; Koehler, A.D. Multiploidy occurrence in tomato calli from anther culture. *Afr. J. Biotechnol.* **2015**, *14*, 2846–2855. <https://doi.org/10.5897/AJB2015.14525>.

Sharp, W.R.; Dougall, D.K.; Paddock, E.F. Haploid plantlets and callus from immature pollen grains of *Nicotiana* and *Lycopersicon*. *Bull. Torrey Bot. Club.* **1971**, *98*, 219–222. <https://doi.org/10.2307/2483689>.

Gresshoff, P.M.; Doy, C.H. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (Tomato). *Planta* **1972**, *107*, 161–170. <https://doi.org/10.1007/BF00387721>.

Seguí-Simarro, J.M.; Nuez, F. Meiotic metaphase I to telophase II as the most responsive stage during microspore development for callus induction in tomato (*Solanum lycopersicum*) anther cultures. *Acta Physiol. Plant.* **2005**, *27*, 675–685. <https://doi.org/10.1007/s11738-005-0071-x>.

Ahmadi, B.; Shariatpanahi, M.E.; Asghari-Zakaria, R.; Zare, N.; Azadi, P. Efficient microspore embryogenesis induction in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) using shed microspore culture. *J. Pure Appl. Microbiol.* **2015**, *9*, 21–29. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3265.8805>.

Kumar, S.; Jindal, S.K.; Sarao, N.K.; Dhaliwal, M.S. Callus induction and plant regeneration of tomato through anther culture. *Veg. Sci.* **2020**, *47*, 23–27.

Seguí-Simarro, J.M.; Nuez, F. Androgenesis induction from tomato anther cultures: Callus characterization. *Acta Hortic.* **2006**, *725*, 855–861. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.725.118>.

Seguí-Simarro, J.M.; Nuez, F. Embryogenesis induction, callogenesis, and plant regeneration by in vitro culture of tomato isolated microspores and whole anthers. *J. Exp. Bot.* **2007**, *5*, 1119–1132. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl271>.

Moreno, A.; Claveria, E.; Pujol, M.; Dolcet-Sanjuan, R. Development of a methodology for the production of doubled haploid lines in *Solanum lycopersicum* L. *Acta Hortic.* **2012**, *935*, 95–100. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.935.13>.

Khan, P.S.S.V.; Vijayalakshmi, G.; Raja, M.M.; Naik, M.L.; Germanà, M.A.; Terry, R.G. Doubled haploid production in onion (*Allium cepa* L.): From gynogenesis to chromosome doubling. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **2020**, *142*, 1–22. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01831-4>.

Panahandeh, J.; Farhadi, N. Haploid induction via in vitro gynogenesis in Persian shallot (*Allium hirtifolium*). *J. Hortic. Res.* **2019**, *27*, 91–98. <https://doi.org/10.2478/johr-2019-0017>.

Doi, H.; Takahata, Y. Haploid and doubled haploid plant production in gentian (*Gentiana* spp.). In *The Gentianaceae: Biotechnology and Applications*, Rybczyński, J., Davey, M., Mikula, A. Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg. 2015; Volume 2, pp. 187–197; ISBN: 9783642541018.

Doi, H.; Yokoi, S.; Hikage, T.; Nishihara, M.; Tsutsumi, K.-I.; Takahata, Y. Gynogenesis in gentians (*Gentiana triflora*, *G. scabra*): Production of haploids and doubled haploids. *Plant Cell Rep.* **2011**, *30*, 1099–1106. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1017-y>.

Kurtar, E.S.; Seymen, M.; Kal, Ü. An overview of doubled haploid plant production in Cucurbita species. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi* **2020**, *30*, 510–520. <https://doi.org/10.29133/yyutbd.741087>.

Lotfi, M.; Alan, A.R.; Henning, M.J.; Jahn, M.M.; Earle, E.D. Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. *Plant Cell Rep.* **2003**, *21*, 1121–1128. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0636-3>.

Nasertorabi, M.; Madadkhah, E.; Moghbeli, E.; Grouh, M.S.H.; Soleimani, A. Production of haploid lines from parthenogenetic Iranian melon plants obtained of irradiated pollen (*Cucumis melo* L.). *Int. Res. J. Appl. Basic Sci.* **2012**, *3*, 1585–1589.

Wang, S.M.; Lan, H.; Jia, H.H.; Xie, K.D.; Wu, X.M.; Chen, C.L.; Guo, W.W. Induction of parthenogenetic haploid plants using gamma irradiated pollens in "Hirado Buntan" pummelo (*Citrus grandis* L. Osbeck). *Sci. Hortic.* **2016**, *207*, 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.05.028>.

Jedidi, E.; Kamiri, M.; Pouillet, T.; Ollitrault, P.; Froelicher, Y. Efficient haploid production on 'Wilking' mandarin by induced gynogenesis. *Acta Hortic.* **2015**, *1065*, 495–500. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1065.60>.

Niu, Z.; Jiang, A.; Abu Hammad, W.; Oladzadabbasabadi, A.; Xu, S.S.; Mergoum, M.; Elias, E.M. Review of doubled haploid production in durum and common wheat through wheat × maize hybridization. *Plant Breed.* **2014**, *133*, 313–320. <https://doi.org/10.1111/pbr.12162>.

Santra, M.; Wang, H.; Seifert, S.; Haley, S. Doubled haploid laboratory protocol for wheat using wheat–maize wide hybridization: In *Wheat Biotechnology: Methods in Molecular Biology*. Bhalla, P., Singh, M. Eds.; Humana Press: New York, NY, USA, 2017; pp. 234–249, ISBN 978-1-4939-7337-8.

Piosik, Ł.; Zenktele, E.; Zenktele, M. Development of haploid embryos and plants of *Lactuca sativa* induced by distant pollination with *Helianthus annuus* and *H. tuberosus*. *Euphytica* **2016**, *208*, 439–451. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1578-x>.

Wei, Y.; Zhu, M.; Qiao, H.; Li, F.; Zhang, S.; Zhang, S.; Zhang, H.; Sun, R. Characterization of interspecific hybrids between flowering Chinese cabbage and broccoli. *Sci. Hortic.* **2018**, *240*, 552–557. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.06.059>.

Wei, Y.; Li, F.; Zhang, S.; Zhang, S.; Zhang, H.; Qiao, H.; Sun, R. Characterization of interspecific hybrids between Chinese cabbage (*Brassica rapa*) and red cabbage (*Brassica oleracea*). *Sci. Hortic.* **2019**, *250*, 33–37. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.051>.

Uliana Trentin, H.; Frei, U.K.; Lübberstedt, T. Breeding maize maternal haploid inducers. *Plants* **2020**, *9*, 614. <https://doi.org/10.3390/plants9050614>.

Gilles, L.M.; Khaled, A.; Laffaire, J.-B.; Chaignon, S.; Gendrot, G.; Laplaige, J.; Bergès, H.; Beydon, G.; Bayle, V.; Barret, P.; et al. Loss of pollen-specific phospholipase NOT LIKE DAD triggers gynogenesis in maize. *Eur. Mol. Biol. Organ.* **2017**, *36*, 707–717. <https://doi.org/10.15252/embj.201796603>.

Jiang, C.; Sun, J.; Li, R.; Yan, S.; Chen, W.; Guo, L.; Qin, G.; Wang, P.; Luo, C.; Huang, W.; et al. A reactive oxygen species burst causes haploid induction in maize. *Mol. Plant.* **2022**, *15*, 9543–955. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2022.04.001>.

Tang, H.; Zhang, S.; Yu, M.; Wang, K.; Yu, Y.; Qiu, Y.; Chang, Y.; Lin, Z.; Du, L.; Fu, D.; et al. Effects of TaMTL-Edited mutations on grain phenotype and storage component composition in wheat. *Agriculture* **2022**, *12*, 587. <https://doi.org/10.3390/agriculture12050587>.

Zhong, Y.; Chen, B.; Li, M.; Wang, D.; Jiao, Y.; Qi, X.; Wang, M.; Liu, Z.; Chen, C.; Wang, Y.; et al. A DMP-triggered in vivo maternal haploid induction system in the dicotyledonous Arabidopsis. *Nat. Plants.* **2020**, *6*, 466–472. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0658-7>.

Zhong, Y.; Wang, Y.; Chen, B.; Liu, J.; Wang, D.; Li, M.; Qi, X.; Liu, C.; Boutilier, K.; Chen, S. Establishment of a dmp based maternal haploid induction system for polyploid *Brassica napus* and *Nicotiana tabacum*. *J. Integr. Plant Biol.* **2022**, 1–15. <https://doi.org/10.1111/jipb.13244>.

Li, Y.; Li, D.; Xiao, Q.; Wang, H.; Wen, J.; Tu, J.; Shen, J.; Fu, T.; Yi, B. An in planta haploid induction system in *Brassica napus*. *J. Integr. Plant Biol.* **2022**. <https://doi.org/10.1111/jipb.13270>.

Zhang, X.; Zhang, L.; Zhang, J.; Jia, M.; Cao, L.; Yu, J.; Zhao, D. Haploid induction in allotetraploid tobacco using DMPs mutation. *Planta* **2022**, *255*, 98. <https://doi.org/10.1007/s00425-022-03877-4>.

Wang, N.; Xia, X.; Jiang, T.; Li, L.; Zhang, P.; Niu, L.; Cheng, H.; Wang, K.; Lin, H. In planta haploid induction by genome editing of DMP in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Biotechnol. J.* **2022**, *20*, 22–24. <https://doi.org/10.1111/pbi.13740>.

Zhong, Y.; Chen, B.; Wang, D.; Zhu, X.; Li, M.; Zhang, J.; Chen, M.; Wang, M.; Riksen, T.; Liu, J.; et al. In vivo maternal haploid induction in tomato. *Plant Biotechnol. J.* **2022**, *20*, 250–252. <https://doi.org/10.1111/pbi.13755>.

Di Giacomo, M.; Luciani, M.D.; Cambiaso, V.; Zorzi, R.; Rubén, R.G.; Pereira da Costa, J.H. Tomato near isogenic lines to unravel the genetic diversity of *S. pimpinellifolium* LA0722 for fruit quality and shelf life breeding. *Euphytica* **2020**, *216*, 126. <https://doi.org/10.1007/s10681-020-02649-z>.

Awais Ghani, M.; Mehran Abbas, M.; Amjad, M.; Ziaf, K.; Ali, B.; Shaheen, T.; Saeed Awan, F.; Nawaz Khan, A. Production and characterization of tomato derived from interspecific hybridisation between cultivated tomato and its wild relatives. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **2020**, *95*, 506–520. <https://doi.org/10.1080/14620316.2019.1689182>.

Chetelat, R.T.; Qin, X.; Tan, M.; Burkart-Waco, D.; Moritama, Y.; Huo, X.; Wills, T.; Pertuzé, R. Introgression lines of *Solanum sitiens*, a wild nightshade of the Atacama Desert, in the genome of cultivated tomato. *Plant J.* **2019**, *100*, 836–850. <https://doi.org/10.1111/tpj.14460>.

Ali, A.A.M.; Romdhane, W.B.; Tarroum, M.; Al-Dakhil, M.; Al-Doss, A.; Alsadon, A.A.; Hassairi, A. Analysis of salinity tolerance in tomato introgression lines based on morpho-physiological and molecular traits. *Plants* **2021**, *10*, 2594. <https://doi.org/10.3390/plants10122594>.

Prasanna, H.C.; Sinha, D.P.; Rai, G.K.; Krishna, R.; Kashyap, S.P.; Singh, N.K.; Singh, M.; Malathi, V.G. Pyramiding Ty-2 and Ty-3 genes for resistance to monopartite and bipartite tomato leaf curl viruses of India. *Plant Pathol.* **2015**, *64*, 256–264. <https://doi.org/10.1111/ppa.12267>.

Baek, Y.S.; Covey, P.A.; Petersen, J.J.; Chetelat, R.T.; McClure, B.; Bedinger, P.A. Testing the SI × SC rule: Pollen–pistil interactions in interspecific crosses between members of the tomato clade (*Solanum section Lycopersicon*, *Solanaceae*). *Am. J. Bot.* **2015**, *102*, 302–311. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400484>.

Marin-Montes, I.M.; Lobato-Ortiz, R.; Carrillo-Castañeda, G.; Rodríguez-Pérez, J.E.; García-Zavala, J.J.; Hernández-Rodríguez, M.; Velasco-García, A.M. Genetic parameters of an interspecific cross between *S. lycopersicum* L. and *S. habrochaites* Knapp & Spooner. *Rev. Chap. Ser. Hortic.* **2020**, *26*, 111–123. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2020.01.003>.

Piosik, Ł.; Ruta-Piosik, M.; Zenkteler, M.; Zenkteler, E. Development of interspecific hybrids between *Solanum lycopersicum* L. and *S. sisymbriifolium* Lam. via embryo calli. *Euphytica* **2019**, *215*, 31. <https://doi.org/10.1007/s10681-019-2358-9>.

Bal, U.; Abak, K. Attempts of haploidy induction in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) via gynogenesis I: Pollination with *Solanum sisymbriifolium* Lam. *Pollen. Pak. J. Biol. Sci.* **2003**, *6*, 745–749. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2003.745.749>.

Chambonnet, D. In situ induction of haploid gynogenesis in tomato. *Rep. Tom. Gen. Coop.* **2012**, *62*, 5–22.

Bal, U.; Abak, K. Attempts of haploidy induction in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) via gynogenesis II: In vitro non-fertilized ovary culture. *Pak. J. Biol. Sci.* **2003**, *6*, 750–755. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2003.750.755>.

Zhao, H.; Wang, X.; Du, Y.; Zhu, D.; Guo, Y.; Gao, J.F.; Snyder, J. Haploid induction via in vitro gynogenesis in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *J. Int. Agric.* **2014**, *13*, 2122–2131. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60672-3](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60672-3).

Nishiyama, I.; Tsukuda, S. Radiobiological studies in plant, I. Effects of X-rays upon pollen germination and fertility. *Jpn. J. Gen.* **1959**, *34*, 363–370. <https://doi.org/10.1266/jjg.34.363>.

Nishiyama, I.; Tsukuda, S. Effects of X- and gamma-irradiations on pollen fertility of *Lycopersicum pimpinellifolium*. *Jpn. J. Gen.* **1961**, *36*, 423–427. <https://doi.org/10.1266/jjg.36.423>.

Akbudak, N.; Seniz, V. In vitro and in vivo behavior of gamma irradiated tomato (*Lycopersicon esculentum*) pollen. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* **2009**, *37*, 361–367. <https://doi.org/10.1080/01140671.2009.9687591>.

Choun-Sea, L.; Chen-Tran, H.; Yu-Hsuan, Y.; Po-Xing, Z.; Fu-Hui, W.; Qiao-Wei, C.; Yu-Lin, W.; Ting-Li, W.; Steven, L.; Jin-Jun, Y.; et al. DNA-free CRISPR-Cas9 gene editing of wild tetraploid tomato *Solanum peruvianum* using protoplast regeneration, *Plant Physiol.* **2022**, *188*, 1917–1930. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac022>.

Xuhu, G.; Jianguo, Z.; Zhiwen, C.; Jun, Q.; Yongfang, Z.; Hong, S.; Zhongli, H. CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of SICMT4 causes changes in plant architecture and reproductive organ in tomato. *Hortic. Res.* **2022**, *81*. <https://doi.org/10.1093/hr/uhac081>.

Yang, S.H.; Kim, E.; Park, H.; Koo, Y. Selection of the high efficient sgRNA for CRISPR-Cas9 to edit herbicide related genes, PDS, ALS, and EPSPS in tomato. *Appl. Biol. Chem.* **2022**, *65*, 13. <https://doi.org/10.1186/s13765-022-00679-w>.

Tang, Y.; Li, H.; Liu, C.; He, Y.; Wang, H.; Zhao, T.; Xu, X.; Li, J.; Yang, H.; Jiang, J. CRISPR-Cas9-mediated mutagenesis of the SISRMI-like gene leads to abnormal leaf development in tomatoes. *BMC Plant Biol.* **2022**, *22*, 13. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03397-5>.

Masayuki, I.; Tetsuya, Y.; Momoko, M.; Yusuke, K.; Akihito, K.; Kazuhiro, I. Tomato brown rugose fruit virus resistance generated by quadruple knockout of homologs of TOBAMOVIRUS MULTIPLICATION1 in tomato. *Plant Physiol.* **2022**, *103*. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac103>.

Op Den Camp, R.H.M.; Van Dijk, P.L.; Gallard, A. Method for the Production of Haploid and Subsequent Doubled Haploid plants. Patent WO 2017/200386 A1 2017, 25 May 2016. Available online: <https://patents.google.com/patent/WO2017058022A1/en> (accessed on May 2022).

Yonggang, Q.; Xiuying, S.; Yun, S.; Xiaoming, Z. Tetraploidy inducement of small-fruit-type tomato with colchicine. *Chin. Agric. Sci. Bull.* **2007**, *23*, 19.

Praça, M.M.; Carvalho, C.R.; Clarindo, W.R. A practical and reliable procedure for in vitro induction of tetraploid tomato. *Sci. Hortic.* **2009**, *122*, 501–505. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.05.032>.

Cola, G.P.A.; Marques, A.M.; Damasceno, S.; Carvalho, C.R.; Clarindo, W.R. In vitro polyploidization in *Solanum lycopersicum* Mill. "Santa Cruz Kada Gigante". *Cytologia* **2014**, *79*, 351–358. <https://doi.org/10.1508/cytologia.79.351>.

CAPÍTULO III

INDUCCIÓN DE GINOGENESIS EN TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) MEDIANTE POLEN IRRADIADO CON RAYOS- γ .

Resumen

La obtención de dobles haploides mediante ginogénesis con polen irradiado no ha sido implementada con éxito en tomate a pesar de ser una alternativa promisorio para el mejoramiento genético de especies recalcitrantes a la inducción de androgénesis. El objetivo de la presente investigación fue evaluar el potencial de polen irradiado con rayos- γ para inducir ginogénesis para formar embriones haploides en un híbrido de tomate. Para ello en esta investigación, polen viable se trató con ^{60}Co con 0, 160, 180, 200 y 220 Gy, para polinizar flores de un híbrido experimental en dos ocasiones (60 y 90 días después de trasplante -DDT-). En ambas pseudopolinizaciones se obtuvo 54.17 % de amarre de frutos normales (<45 g) y solo 14 semillas normales de las cuales 12 germinaron y formaron planta en condiciones *in vitro*. A los 90 DDT se realizaron 50 polinizaciones extras, en las cuales se identificó que el polen irradiado promovió aborto del embrión durante los primeros 14 días de desarrollo. Debido a esto, semillas inmaduras fueron rescatadas y cultivadas *in vitro*; pero, los callos formados no fueron morfogenéticos. La respuesta aleatoria del polen irradiado como inductor de semilla haploide sugiere el uso de tamaños de muestra grandes para incrementar la probabilidad de obtener semilla haploide. De otra forma, la selección de fenotipos para la subsecuente formación de dobles haploides sería poco fructífera.

Palabras claves

haploidía, dobles haploides, partenogénesis dependiente de polinización, rescate de embriones inmaduros, cultivo *in vitro*, mejoramiento genético.

3.2 Introducción

Los dobles haploides (DH) son homocigóticos en todos sus *loci* lo cual permite utilizarlos en diferentes investigaciones genéticas (Yan et al., 2017); por ejemplo, el ensamble del genoma en *Pyrus communis* L. (Linsmith et al., 2019), reconocimiento del genoma en triticale (*X Triticosecale* Wittm) hexaploide (Tyrka et al., 2018), mapeo de genes asociados con tolerancia a salinidad en trigo (*Triticum aestivum* L) (Asif et al., 2018), obtención de líneas de introgresión con genes de resistencia a factores bióticos y abióticos en trigo (Grewal et al., 2021), selección de genes asociados a la viscosidad de la pasta del almidón en *Oryza sativa* L. (Shar et al., 2020) y búsqueda de QTLs para el contenido de aceite y ácidos grasos en *Zea mays* L. (Ortiz-Islas et al., 2018).

La formación convencional de híbridos en cultivos hortícolas autógamos requiere de al menos siete ciclos de autofecundación para derivar líneas progenitoras homocigóticas. En contraste, los DH requieren solo una generación (Yan et al., 2017; Kumar, Saini & Nath, 2021). La metodología más usada para obtener dobles haploides es androgénesis; en la cual, primero se induce haploidía (n) mediante el cultivo *in vitro* de gametos masculinos; posteriormente, se restaura la condición diploide ($2n$) mediante la aplicación de colchicina. Esta metodología es exitosa en especies como *Tagetes* spp. (Kumar et al., 2019), *Triticum spelta* L. (Lantos et al., 2018), *Capsicum annuum* L. (Grozeva, Todorova, & Nankar, 2021; Olszewska & Tomaszewska-Sowa, 2022) y *Hordeum vulgare* L. (Hentour et al., 2020). En contraste, no induce genotipos haploides en diferentes familias de alto valor económico como las solanáceas (Seguí-Simarro, 2016), cucurbitáceas (Kurtar, Seymen, & Kal 2020), amarilidáceas (Khan et al., 2020), rutáceas (Ollitrault et al., 2020) y rosáceas (Pereira-Lorenzo et al., 2018).

La técnica más utilizada para obtener líneas DH en especies recalcitrantes es ginogénesis, esta produce embriones haploides de origen materno (Forster et al., 2007), donde es necesario activar embriogénesis mediante la presencia del gameto masculino, pero sin la fusión de ambos gametos, por lo tanto, se conoce como pseudogamia o partenogénesis dependiente de polinización (sperm-

dependent parthenogenesis) (Vijverberg, Ozias-Akins & Schranz, 2019). De las variantes ginogénicas, el polen irradiado con rayos-γ es empleado en cultivos ornamentales como *Iris pseudacorus* L. (Sadat-Hosseini et al., 2015) y *Mimulus aurantiacus* Curtis (Murovec & Bohanec, 2013), frutales como *Eriobotrya japonica* (Thunb) Lidl. (Blasco, Badenes & Naval, 2016), cítricos (Kundu & Dubey, 2022), y hortícolas como *Manihot esculenta* Crantz (Buttibwa et al., 2015) y cucurbitáceas (Kurtar et al., 2020).

Por ejemplo, en *Cucumis melo* L. se indujo ginogénesis con polen irradiado para formar DH con 20 % de éxito (Hooghvorst et al., 2020). De manera similar, Kurtar et al. (2021) obtuvieron plantas haploides al aplicar polen de *Cucurbita pepo* L. con 150 Gy, después en plántulas se aplicó colchicina para restaurar su nivel cromosómico $2n$ y derivar líneas DH fértiles. Así, Dal, Sari, & Solmaz (2016) determinaron que con 300 Gray de ^{60}Co fue posible obtener 8.77 embriones haploides por fruto con una tasa de regeneración del 92.56 %.

La inducción de haploidía en *Solanum lycopersicum* L. no se ha logrado debido a que esta hortaliza presenta recalcitrancia al cultivo *in vitro* de anteras, polen y óvulos. Además, el potencial de otras metodologías empleadas en especies recalcitrantes no ha sido evaluado en su totalidad. Por lo tanto, se desconocen sus alcances en el mejoramiento genético del tomate (Marin-Montes et al, 2022). Idealmente, el uso de ginogénesis con polen irradiado en tomate permitiría la obtención de plantas haploides y posterior derivación de líneas DH. Con base en esto, el objetivo de esta investigación fue evaluar el potencial de polen irradiado con rayos-γ para inducir ginogénesis para la formación de embriones haploides en un híbrido de tomate

3.3. Materiales y métodos

3.3.1 Experimento 1. Ginogénesis mediante pseudofertilización con polen irradiado

La investigación se desarrolló en el campo experimental de la Universidad Autónoma Chapingo ubicado en Texcoco, México (19° 29' 23" N y 98° 53' 37" O)

en un invernadero con cubierta plástica blanca calibre 600 y 70 % de transmitancia de luz.

Se utilizó un híbrido experimental de hábito de crecimiento indeterminado y frutos tipo saladette, y como donador de polen una línea homocigótica S₈ con hábito de crecimiento indeterminado y frutos cilíndricos. Ambos genotipos fueron sembrados el 10 de abril de 2021 en sustrato de espuma agrícola (Oasis Easy Plant/Espuma 40) con 60 % de retención de humedad. Las plántulas se trasplantaron 20 días después de la siembra en sustrato de espuma volcánica con partículas de 3 mm de diámetro, contenido en macetas de polipropileno de 15 L de capacidad a una densidad de 3.7 plantas·m⁻². Se usó un sistema hidropónico abierto con la solución nutritiva de Cadahía Segura & Massaguer (2005), aplicada de acuerdo con la etapa fenológica y condiciones ambientales.

Los tratamientos se establecieron en un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial. Se evaluaron cinco dosis de radiación-γ (0, 160, 180, 200 y 220 Gy), aplicada en polen viable, y dos edades de planta: 60 y 90 días después de trasplante (DDT) en seis repeticiones. La unidad experimental fue formada por seis flores emasculadas.

La emasculación se realizó 48 horas antes de la polinización, se eligieron flores cerradas, en coloración crema-amarilla, se eliminaron sépalos, pétalos y anteras con fórceps para dejar expuesto el estigma y estilo. Las flores emasculadas enseguida se cubrieron con bolsas de glassine # 000 para evitar la contaminación de polen normal. El polen fue colectado en tubos de polipropileno de 0.5 ml (Eppendorf, Thermo Fisher Scientific) mediante vibración mecánica generada con cepillo de dientes eléctrico (Pro 500 Floss Action, Oral B), 24 horas antes de irradiación.

El polen fue trasladado al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares de México para ser tratado en irradiador GAMMACELL 220 con radiación-γ. La primera radiación realizada (60 DDT) se hizo a una dosis de 18.735301 Gy h⁻¹, mientras que la segunda (90 DDT) fue a 18.500253 Gy h⁻¹. Enseguida, el polen se transportó al invernadero para realizar las polinizaciones entre las 12:00 y

14:00 horas, las bolsas de glassine se mantuvieron en la flor polinizada durante 10 días.

Los frutos generados después de la polinización se mantuvieron en la planta hasta alcanzar su madurez completa. En la cosecha se evaluó: número de frutos normales (> 11 g, con semillas) y anormales (< 11 g, sin pulpa y semilla), porcentaje de amarre de frutos normales, peso de frutos normales y anormales, peso promedio de frutos normales y anormales, número de semillas, normales (con embrión, endospermo y tamaño estándar) y anormales (sin embrión, tamaño pequeño).

Las variables con distribución normal fueron analizadas mediante análisis de varianza. En aquellas sin distribución normal se realizó la transformación box cox, previo al análisis de varianza. Se empleó la prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha \leq 0.5$) en las variables con diferencias significativas. Los procedimientos antes mencionados fueron realizados en SAS 9.4, mediante los procedimientos GLM y TRANSREG.

3.3.2 Experimento 2: Cultivo *in vitro* de semillas inmaduras

Se realizó el rescate *in vitro* de semillas inmaduras generadas por pseudofertilización de óvulos con polen irradiado con ^{60}Co , según se describió en el experimento 1. Sólo se realizó en plantas con 90 DDT, donde se polinizaron 50 flores por dosis de radiación. Los tratamientos se distribuyeron en forma aleatoria. Posteriormente, 14, 21 y 28 días después de polinización se cosecharon 10 frutos para rescatar y sembrar semillas inmaduras en condiciones *in vitro*.

Los frutos cosechados se lavaron con detergente comercial (Roma©) durante 5 minutos y enjuague con agua destilada, seguido de 5 minutos en alcohol al 96 %, doble enjuague con agua destilada y estéril, 15 minutos en solución al 15 % v/v de cloro comercial, y 4 enjuagues con agua destilada y estéril. El rescate de semillas se realizó bajo cabina de flujo laminar vertical (TELSTAR, PV-100) con la ayuda de microscopio estereoscopio (VE-S6, VELAB), los tejidos seminales fueron transferidos a cajas Petri de 60 x 15 mm con 15 ml de medio de cultivo.

Se evaluaron dos medios de cultivo: **Medio 1.1 (M1.1)**: con sales y vitaminas de Murashige y Skoog (MS) al 100 %, 0.1 mg L⁻¹ AIA, 0.5 mg L⁻¹ AIB, 0.5 mg L⁻¹ AG₃, 20 g L⁻¹ de sacarosa, 7 g L⁻¹ de agar; **Medio 1.2 (M1.2)**: MS al 100 %, 0.2 mg L⁻¹ de zeatina, 20 g L⁻¹ de sacarosa, 7 g L⁻¹ de agar. Las semillas se mantuvieron durante 15 días en oscuridad total; posteriormente fueron expuestas a luz fluorescente blanca fría (60 μmol m⁻² s⁻¹) durante 16 horas.

El callo obtenido fue subcultivado en dos medios para su multiplicación y formación de brotes: **Medio 2.1 (M2.1)**: MS 100 %, 1.5 mg L⁻¹ TDZ, 0.1 mg L⁻¹ ANA, 20 g L⁻¹ de sacarosa y 7 g L⁻¹ de agar; **Medio 2.2 (M2.2)**: MS 100 %, 2 mg L⁻¹ cinetina, 0.02 mg L⁻¹ AIA, 20 g L⁻¹ de sacarosa y 7 g L⁻¹ de agar. El pH de todos los medios fue ajustado a 5.7, y tratados en autoclave durante 25 minutos a 121 ° C y 1.05 kg cm⁻², previo a ser vertidos en caja Petri.

La unidad experimental consistió en una caja Petri 60 x 15 mm con 10 semillas inmaduras, distribuidas en un diseño experimental completamente al azar con 6 repeticiones. Antes de siembra se evaluó el peso total y promedio de frutos, diámetro ecuatorial y polar de fruto. Después de dos meses de cultivo se cuantificó el porcentaje de callo normales, porcentaje de callos oxidados, y porcentaje de plantas obtenidas.

3.3.3 Experimento 3. Cultivo *in vitro* de semillas normales y anormales

Las semillas generadas en Experimento 1 fueron establecidas en cultivo *in vitro* para evaluar su germinación, se seleccionaron al azar 200 semillas entre normales (con embrión, endospermo y tamaño estándar) y anormales (sin embrión, tamaño pequeño), las cuales se desinfectaron mediante lavado con detergente comercial (Roma©) durante 5 minutos y enjuague con agua destilada, 5 minutos con solución de fungicida al 0.2 % de benomilo (Promyl 50 P.H.), se enjuagaron con agua destilada, sumergidas por 5 minutos en alcohol al 95 %, doble enjuague con agua destilada y estéril, 15 minutos en solución al 15 % v/v de cloro comercial, y 4 enjuagues con agua destilada y estéril.

La siembra se realizó en condiciones *in vitro* en cajas Petri de 90x15 mm con 20 ml de medio 3 (**M3.1**): MS al 100 % suplementado con 0.2 mg L⁻¹ zeatina, 30 g L⁻¹

¹ de sacarosa, 7 g L⁻¹ de agar, el pH se ajustó a 5.7, y fue esterilizado en autoclave durante 25 minutos a 121 ° C y 1.05 kg cm⁻².

Se empleó un diseño completamente al azar con 5 repeticiones. La unidad experimental fue una caja Petri con 40 semillas, y se conservaron en oscuridad hasta el inicio de germinación; posteriormente, se mantuvieron con fotoperiodo de 16 horas de luz fluorescente blanca fría (60 µmol m⁻² s⁻¹) y 8 h de oscuridad. Las plantas generadas fueron sub cultivadas a un medio MS al 100 %, con 0.2 mg L⁻¹ AIA, 0.2 mg L⁻¹ AG₃, 30 g L⁻¹ de sacarosa y 8 g L⁻¹ de agar.

3.4 Resultados y discusión

3.4.1 Experimento 1. Ginogénesis mediante pseudofertilización con polen irradiado

Según los resultados del análisis de varianza (Cuadro 3.1), las dosis de radiación al polen (a excepción de PFA y PPFA), y oportunidades de polinización en diferente edad de planta, afectaron las variables evaluadas ($\alpha \leq 0.05$); sin embargo, la interacción de ambos solo fue diferente significativamente en número de semillas anormales ($\alpha \leq 0.05$). Al respecto, Akbudak & Seniz (2009) señalaron que la radiación-y afecta de manera similar la germinación del polen de tomate a pesar de que sea aplicada en condiciones ambientales distintas. También, Sadat-Hosseini et al. (2015) observaron que la ginogénesis con polen irradiado en *Iris pseudacorus* L. es estable en diferentes ambientes.

La inducción de mutagénesis es un proceso aleatorio que ocurre en todo el genoma y cada *locus* (Mba, Afza & Shu, 2012), lo cual explica que los coeficientes de variación obtenidos (Cuadro 3. 1) fueran altos debido al efecto aleatorio sobre gametos masculinos. En consecuencia, los óvulos debieron haber sido estimulados en forma distinta durante el desarrollo del fruto y semillas. Esto no solo sucede en tomate, por ejemplo, en *Manihot esculenta* Crantz se observaron valores entre 34.8 y 89.7 % al emplear polen irradiado (Buttibwa et al., 2015); y en *Physalis peruviana* L. se identificaron valores entre 16 y 52 % en caracteres morfológicos de planta al irradiar semilla con ⁶⁰Co (Antunez-Ocampo et al., 2020).

Cuadro 3. 1. Significancia estadística de las fuentes de variación en 8 variables de frutos generados con polen irradiado en tomate.

FV	G L	NFT	PAM	NSA	NST	PFN	PFA	PPFN	PPFA
DRAD	4	423.86*	134.88 *	64.03 *	63.07 *	182795.9 8*	91.94	2946.1 4*	15.79
EP	1	4959.5 0*	422.85 *	29.88 *	46.40 *	357436.0 2*	5358.1 5*	2154.6 0*	809.73 *
DRAD*EP	4	102.34	34.60	5.22*	4.49	11962.35	114.94	184.15	26.28
Error Total	50 59	123.83	15.60	1.53	1.84	5776.62	148.85	131.92	12.49
Lamda		2	0.75	0.25	0.25	-	-	-	-
CV (%)		35.17	15.36	21.31	17.72	22.63	53.32	19.46	39.63

FV: Fuente de variación, DRAD: dosis de radiación-γ, EP: edad de planta, CV: coeficiente de variación. GL: grados de libertad. NFT: número total de frutos. PAM: porcentaje de amarre de fruto normal. NSA: número de semillas anormales. NST: número de semillas total. PFN: peso total de frutos normales. PFA: peso total de frutos anormales. PPFN: peso promedio de frutos normales. PPFA: peso promedio de frutos anormales. * significancia con $\alpha \leq 0.05$

Las comparaciones de medias (Cuadro 3. 2) indicaron que cuando la dosis de radiación se incrementa, la expresión de las variables evaluadas tiende a disminuir ($\alpha \leq 0.05$); excepto para peso total de frutos anormales; además, difirieron ($\alpha \leq 0.05$) con respecto al testigo (polen no irradiado). Este efecto ha sido observado en *Citrullus lanatus* L (Taskin et al., 2013), *Citrus grandis* L. Osbeck (Wang et al., 2016), *Citrus* (Kundu y Dubey, 2020) y *Lagenaria siceraria* (Molina) Stadley (Zhang y Zhao et al., 2022).

Cuadro 3. 2. Valores promedios del efecto de la polinización con polen irradiado y sin irradiar en características de frutos de tomate

DRAD	NFT	PAM	NSA	NST	PFN	PFA	PPFN	PPFA
0	7.92 ab	62.50a	6.00c	230.75a	536.92a	17.75a	86.44a	8.83a
160	8.92 a	65.83a	82.42a	82.67b	345.33b	19.83a	52.65b	7.38a
180	7.83 ab	54.17ab	73.88a	73.88b	288.00bc	24.08a	51.87b	9.48a
200	6.83 b	42.50b	37.17b	37.92c	205.17c	24.08a	47.47b	8.45a
220	7.25 ab	54.17ab	51.33ab	51.50bc	303.50b	20.67a	56.71b	10.45a
DMSH	12.85	12.46	1.42	1.57	87.81	14.10	13.27	4.08

Medias con la misma letra dentro de la misma columna no difieren estadísticamente (Tukey, $\alpha \leq 0.05$). DRAD: dosis de radiación-γ. NFT: número total de frutos. PAM: porcentaje de amarre de fruto normal. NSA: número de semillas anormales. NST: número de semillas total. PFN: peso total de frutos normales. PFA: peso total de frutos anormales. PPFN: peso promedio de frutos normales. PPFA: peso promedio de frutos anormales. DMSH: diferencia mínima significativa honesta.

La formación de frutos con polen irradiado fue posible, con porcentaje de amarre de frutos normales mayor al emplear polen no irradiado (Cuadro 3.2); en contraste, al usar polen tratado aumentó la presencia de frutos anormales. Situación similar fue observada al emplear polen tratado con 200 Gy en *Lycopersicum pimpinellifolium*, donde se redujo 50 % la formación de frutos (Nishiyama & Tsukuda, 1961); también en flores de *Manihot esculenta* polinizadas con polen irradiado (260 Gy de rayos- γ) se redujo 60 % (Buttibwa et al., 2015), y en *Eriobotrya japonica* Thunb. Lindl disminuyó entre 30 y 50 % (Blasco et al., 2016). Los efectos de irradiar polen en la formación de frutos de tomate observados en la presente investigación son similares con los reportados en especies donde la ginogénesis ha permitido la inducción de haploidía; esto sugiere la necesidad de determinar el nivel de radiación adecuado para establecer un protocolo que permita obtener mayor cantidad de frutos con semillas con embrión mediante pseudogamia y así incrementar la probabilidad de generar plantas haploides en esta hortaliza.

El desarrollo del fruto está asociado con la presencia de semillas, las cuales activan rutas metabólicas responsables de sintetizar hormonas vegetales que promueven crecimiento del fruto (Fenn y Giovannoni, 2021). Sin embargo, a pesar de que con diferentes niveles de radiación se formaron semillas (Cuadro 3.2), la mayoría fueron anormales y solo se identificaron 3, 9 y 2 semillas normales en frutos inducidos mediante polen tratado con 160 (Figura 3.1 B-C), 200 (Figura 3.1 D-E), y 220 Gy (Figura 3.1G), respectivamente. Al respecto, en *L. pimpinellifolium*, Nishiyama y Tsukuda (1961) encontraron 1 y 3 semillas normales al emplear granos de polen tratados con 500 y 700 Gy de radiación- γ , respectivamente, y las semillas restantes fueron vanas. En *Citrus grandis* L. Osbeck con 255 y 500 Gy de rayos- γ se incrementó 97 % la cantidad de semillas anormales y reportaron una semilla haploide viable en cada dosis, con respecto al polen sin irradiar (Wang et al., 2016). De manera similar, en *Citrus maxima* (Burm.) al usar polen irradiado con 1000 Gy incrementó 600 % la presencia de semillas pequeñas y sin embrión (Yang et al., 2020).

La formación de semillas de tomate en este estudio ocurrió porque la radiación gamma solo afecta el material genético del polen, y no ARNs, proteínas y lípidos esenciales en germinación y crecimiento de la célula polar (Stephan, 2021); por lo tanto, el tubo polínico solo puede fertilizar la ovocélula o los núcleos polares (Musial & Przywara, 1998; Peixe et al., 2000); en este sentido, la presencia de semillas normales con embrión y endospermo debe estar asociada con polispermia; sin embargo, es necesario corroborar lo anterior mediante estudios embriológicos.

El testigo sin radiación mostró desarrollo normal de frutos; en tanto que frutos generados mediante polen tratado con ^{60}Co mostraron menor peso total y promedio (Cuadro 3. 2), sin observarse diferencias significativas entre los tratamientos irradiados; estas disimilitudes se asociaron a la cantidad de semillas normales presentes en fruto. Por ejemplo, Yang et al. (2020) indicaron que al polinizar cítricos con polen irradiado obtuvieron frutos de peso y dimensiones menores que los testigos sin radiación, pero con mayor presencia de semillas vanas.

Respecto a la formación de frutos anormales, esta fue semejante desde 0 a 220 Gy; los frutos anormales de tamaño pequeño (< 11 g), huecos y sin semillas. El peso de estos frutos representó entre 3 y 11 % del rendimiento total de fruto. Nasertorabi et al. (2012) evaluaron la formación de frutos de *Cucumis melo* L. con polen irradiado desde 250 a 550 Gray y encontraron que los frutos sin semillas se incrementaron al aumentar el nivel de radiación aplicada.

La inducción de partenogénesis dependiente de polinización está afectada de manera negativa por el ambiente de desarrollo del genotipo hembra, es decir, si las plantas no se desarrollan en su ambiente óptimo o son afectadas por enfermedades, su estado fisiológico será deficiente, esto generará mayor aborto de embriones (Dong et al., 2016). Al respecto, en el presente trabajo se formaron más frutos cuando la polinización se llevó a cabo 60 días después de trasplante (DDT), estos fueron más grandes y con mayor cantidad de semillas en

comparación con los obtenidos en la segunda polinización (90 DDT) (Cuadro 3.3).

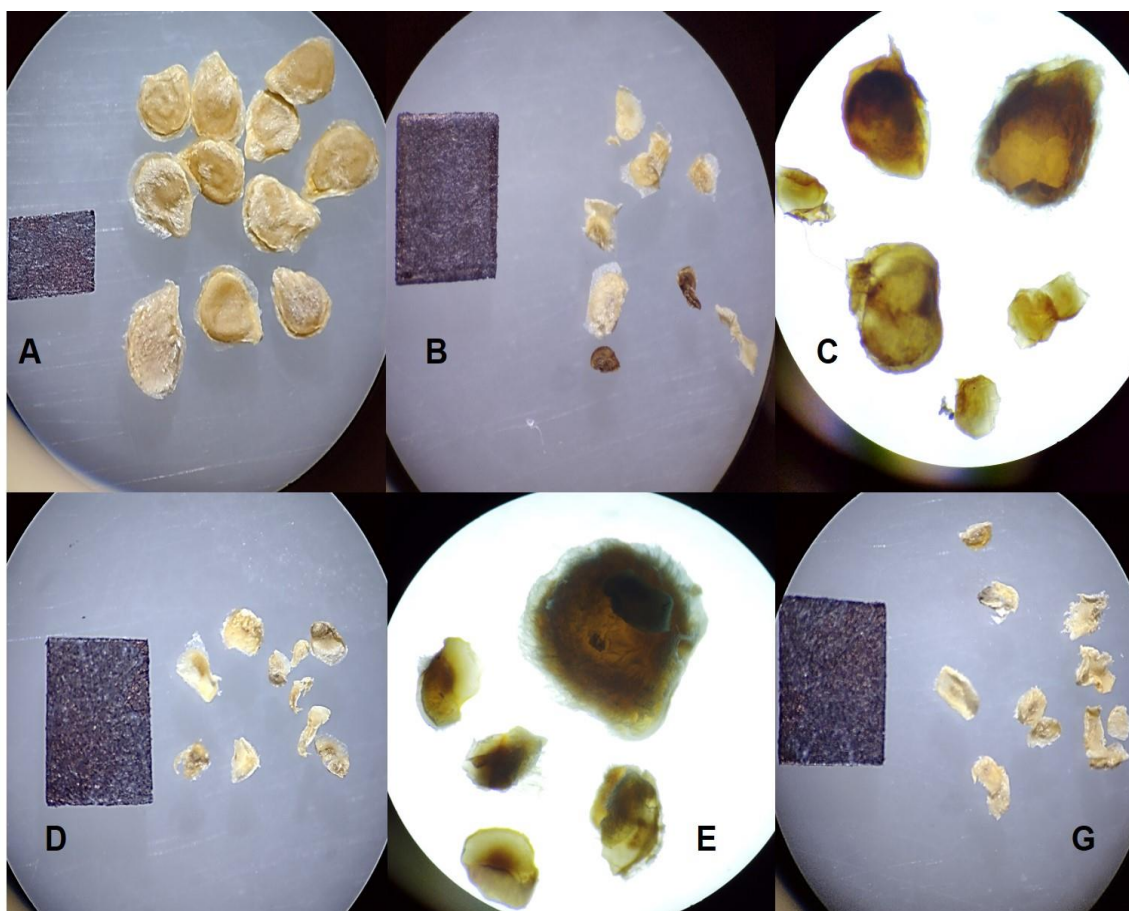


Figura 3. 1. A: Semilla normal generada con polen sin radiación. B-C: Semilla normal y anormal producida mediante polen tratado con 160 Gy. D-E: Semillas generadas con polen irradiado con 200 Gy. G: Semilla anormal inducida mediante pseudofecundación con polen irradiado con 220 Gray.

Cuadro 3. 3. Promedios del efecto de la polinización con polen irradiado y sin irradiar en características de frutos de tomate

DDT	NFRT	PAM	NSA	NST	PFRN	PFRA	PPFRN	PPFRA
60	9 a	63.00a	64.33a	122.03a	412.97a	30.73a	65.02a	12.59a
90	6.5 b	48.67b	35.98b	68.65b	258.60b	11.83b	53.04b	5.24b
DMSH	5.77	2.05	0.64	0.70	39.42	6.33	5.96	1.83

Medias con la misma letra dentro de la misma columna no difieren estadísticamente (Tukey, $\alpha \leq 0.05$). DDT: días después de trasplante. NFRT: número total de frutos. PAM: porcentaje de amarre de fruto normal. NSA: número de semillas anormales. NST: número de semillas total. PFRN: peso total de frutos normales (g). PFRA: peso total de frutos anormales (g). PPFRN: peso promedio de frutos normales (g). PPFRA: peso promedio de frutos anormales (g). DMSH: diferencia mínima significativa honesta.

Los resultados obtenidos son promisorios para el mejoramiento genético de tomate. Este es el primer reporte exitoso de inducción de ginogénesis mediante polen irradiado con rayos-γ que alcanzó la formación de frutos y semillas maduras. En la literatura no se han encontrado casos de éxito del uso de esta metodología en *S. lycopersicum* L. (Marin-Montes et al., 2022). Sin embargo, se recomienda realizar un estudio de radio sensibilidad del polen con menor amplitud entre dosis de radiación para determinar el nivel adecuado para incrementar la producción de embriones y aumentar la probabilidad de encontrar genotipos haploides en este cultivo.

3.4.2 Experimento 2. Rescate *in vitro* de semillas inmaduras

En una evaluación previa, se encontró que los óvulos estimulados con polen irradiado mostraban desarrollo como semilla normal; sin embargo, en estos óvulos pseudo fecundados no se identificó el embrión a partir de 14 días después de polinización (DDP), por lo que se decidió sembrar toda la semilla inmadura.

La pseudofecundación con polen irradiado indujo la formación de frutos y semillas de manera similar en las dosis evaluadas (Cuadro 3.4). Los frutos provenientes de polinizaciones normales tuvieron desarrollo superior en peso y dimensiones que aquellos derivados de pseudopolinización; sin embargo, no se detectaron diferencias en el desarrollo del fruto por efecto de los niveles de irradiación aplicados al polen. Estos resultados son similares a los obtenidos en cultivos como *Pyrus communis* L. (Bouvier, Zhang & Lespinasse, 1993), *Actinidia deliciosa* A. Chev. (Musial y Przywara, 1998) y *Manihot esculenta* (Buttibwa et al., 2015). En estos, sin embargo, el rendimiento de fruto disminuyó al utilizar polen irradiado, sin detectarse asociación entre variables y niveles de radiación-γ evaluados. Es decir, el efecto de los rayos-γ se interpretó como aleatorio; por lo que existen condiciones adicionales desconocidas, que tienen que ser detectadas para hacer predecible el comportamiento del fruto y semilla ante dosis de radiación a polen.

Cuadro 3. 4. Efecto del rescate de semillas inmaduras de tomate generadas con polen irradiado y sin irradiar en los medios de cultivo *in vitro* empleados.

DRA D	DDP	PPF R	DP	DE	NBR		PC		PCN	
					M1.1	M1.2	M1.1	M1.2	M1.1	M1.2
0	14	1.83	19.37	13.8	2.33	2	78.33	96.67	35.00	31.67
	21	10.19	33.82	24.63	3.66	2	45.00	70.00	26.67	5.00
	28	21.93	37.49	37.47	2.66	1.5	75.00	71.67	50.00	18.33
160	14	0.96	15.33	11.25	0	0	76.67	98.33	73.33	41.67
	21	4.63	27.45	19.81	0	0	100.0	95.00	71.67	31.67
	28	7.31	31.87	24.77	0	0	98.33	95.00	81.67	28.33
180	14	1.4	18.58	13.19	0	0	95.00	86.67	88.33	36.67
	21	5.06	26.53	20.13	0	0	96.67	95.00	75.00	16.67
	28	12.43	35.36	25.27	0	0	96.67	100.0	85.00	31.67
200	14	0.5	13.4	9.85	0	0	56.67	75.00	51.67	41.67
	21	2.92	24.09	18.23	0	0	93.33	100.0	80.00	20.00
	28	5.15	28	21.74	0	0	96.67	100.0	71.67	36.67
220	14	1	15.01	11.31	0	0	88.33	98.33	81.67	43.33
	21	7.32	28.16	22.54	0	0	95.00	100.0	75.00	25.00
	28	12.4	33	26.34	0	0	93.33	98.33	81.67	38.33
S	-	5.9	7.88	7.41	1.26	0.77	19.08	14.39	24.19	19.13
$\bar{X}$	-	6.33	25.83	20.02	0.58	0.22	85.66	92.00	68.55	29.78

DRAD: dosis de radiación- γ , DDP: días después de polinización, PPFR: peso promedio de frutos inmaduros (g), DP: diámetro polar de fruto (mm), DE: diámetro ecuatorial de fruto (mm), NBR: número de brotes, PC: porcentaje de callo, PCN: porcentaje de callo oxidado. M1: MS (100 %), 0.1 mg L⁻¹ AIA, 0.5 mg L⁻¹ AIB, 0.5 mg L⁻¹ AG3, 20 g L⁻¹ de sacarosa, 7 g L⁻¹ de agar, M2: MS (100 %), 0.2 mg L⁻¹ de zeatina, 20 g L⁻¹ de sacarosa, 7 g L⁻¹ de agar, S: desviación estándar, $\bar{X}$: media aritmética.

Las semillas inmaduras de tomate inducidas con polen normal cultivadas *in vitro* formaron plantas en forma directa, con porcentaje de éxito similar al reportado en la especie (Kharkongar et al., 2013; Piosik et al., 2019). Esto indicó que el medio de cultivo empleado fue apropiado para rescatar embriones inmaduros en esta hortaliza (Cuadro 3. 4). En tomate se cuenta con casos de éxito en el rescate *in vitro* de embriones diploides formados 15 DDP, en cultivo *in vitro* con medio MS suplementado con AG₃, ANA y BAP (Kharkongar et al., 2013), y también con ZEA y 2,4 - D (Piosik et al., 2019). Al respecto, los resultados obtenidos en la presente investigación permitieron comprobar que el rescate de embriones inmaduros en esta especie se puede emplear para reducir el tiempo para obtener plantas mediante embriones que no han terminado su desarrollo, pero son capaces de

germinar *in vitro*, por consiguiente, se obtendrían más generaciones por año (Samantara et al., 2022) o también sería útil para la obtención de híbridos inter específicos y así aprovechar los genes favorables que conservan especies silvestres emparentadas con el tomate (Piosik et al., 2019).

El aborto del embrión durante la inducción de ginogénesis con polen irradiado es común en *Pyrus communis* L. (Bouvier et al., 1993), *Prunus domestica* L. (Peixe et al., 2000), cucurbitáceas (Dong et al., 2016) y *Citrus* (Kundu y Dubey et al., 2020), en donde se promueve la formación inicial del embrión, este crece en ausencia del endospermo, y mediante cultivo *in vitro* es posible obtener plantas normales a pesar de la inmadurez del embrión. Los resultados derivados del presente estudio mostraron que el embrión de semillas de tomate estimuladas con polen irradiado fue abortado antes de 14 DDP, por consiguiente, no fue posible generar plántulas debido a que el tejido cultivado (endospermo) (Figura 3.2A, 3.2B) solo generó callo que no fue capaz de reprogramar sus células para promover respuesta morfogénica (Figura 3.2C, 3.2D) (Thomas & Chaturvedi, 2008).

Las condiciones *in vitro* proporcionadas al callo generado con óvulos sin polinización normal no tuvieron efecto morfogénico en estas estructuras (Figura 3.2E, 3.2F), en cambio, el callo inducido a partir de semillas con embrión si generó brotes. La inmadurez del endospermo está relacionada con el aborto del embrión en etapas tempranas de desarrollo, por lo tanto, no fue posible promover la reprogramación celular hacia embriogénesis u organogénesis a partir de esta estructura. Cuando se emplean semillas inmaduras en tomate es necesaria la presencia del embrión para que el endospermo alcance el nivel de organización celular necesario para obtener embriones somáticos durante el cultivo *in vitro* (Thomas & Chaturvedi, 2008). Las condiciones *in vitro* propuestas por Piosik et al. (2019) indicaron que la hibridación interespecífica de *S. lycopersicum* L. con *S. sisymbriifolium* Lam. permite estimular la formación de brotes en embriones rescatados 20 DDP; en contraste, en embriones con menor desarrollo el callo generado no tiene la capacidad de generar brotes. A partir de lo anterior, la

respuesta del callo generado desde semillas estimuladas con polen irradiado fue ocasionada por inmadurez fisiológica del endospermo provocado por ausencia del embrión.

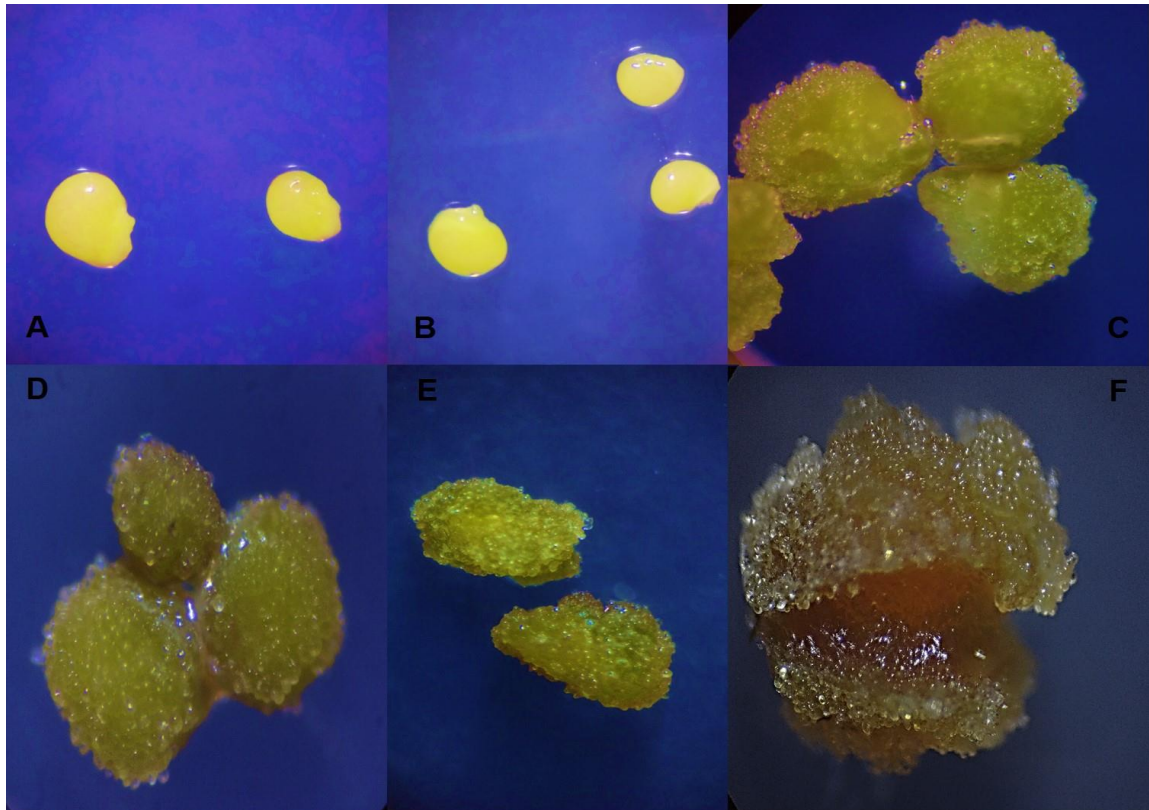


Figura 3. 2. **A:** Semilla inmadura formada a 160 Gy de rayos- γ establecida 28 DDP. **B:** Semilla inmadura formada a 220 Gy de rayos- γ establecida 28 DDP. **C:** Callo generado a partir de 160 Gy después de 30 días sobre M1.2. **D:** Callo generado a partir de 200 Gy después de 30 días sobre M1.2. **E:** Callo formado a partir de 200 Gy después de 30 días sobre M2.1. **F:** Callo generado a partir de 180 Gy después de 30 días sobre M2.2.

3.4.3 Experimento 3. Cultivo *in vitro* de semillas maduras

Las semillas identificadas en los frutos formados a partir de tratamientos con radiación- γ que contenían embrión germinaron de manera adecuada en el medio M3.1 (Cuadro 3. 5). Las semillas del testigo iniciaron la emergencia de radícula cuatro días después de siembra (DDS), mientras que las estimuladas con polen irradiado generaron raíz ocho DDS (Cuadro 3.5) (Figura 3.3A, 3.3B). En especies con semillas que presentan latencia producida por embriones inmaduros o rudimentarios, la aplicación de zeatina mejoró porcentaje de germinación (Moreno, Miranda & Martínez, 2013). Sin embargo, el uso de este regulador de

crecimiento con concentración de 0.2 mg L^{-1} no indujo la germinación en semillas anormales generadas con polen irradiado, por lo que no se logró generar plántulas a partir de estas semillas.

Cuadro 3. 5. Respuesta al cultivo *in vitro* de semillas maduras de tomate generadas con polen irradiado y sin irradiar.

DRAD	NSS	PG	DG	NPN
0 Gy	200	95.7	4	175
160 Gy	200	0.5	12	1
180 Gy	200	0	-	0
200 Gy	200	4.5	8	9
220 Gy	200	1	14	2

DRAD: dosis de radiación- γ , NSS: número de semillas sembradas *in vitro*, PG: porcentaje de germinación *in vitro*, DG: días a inicio de germinación, NPN: número de plantas normales.

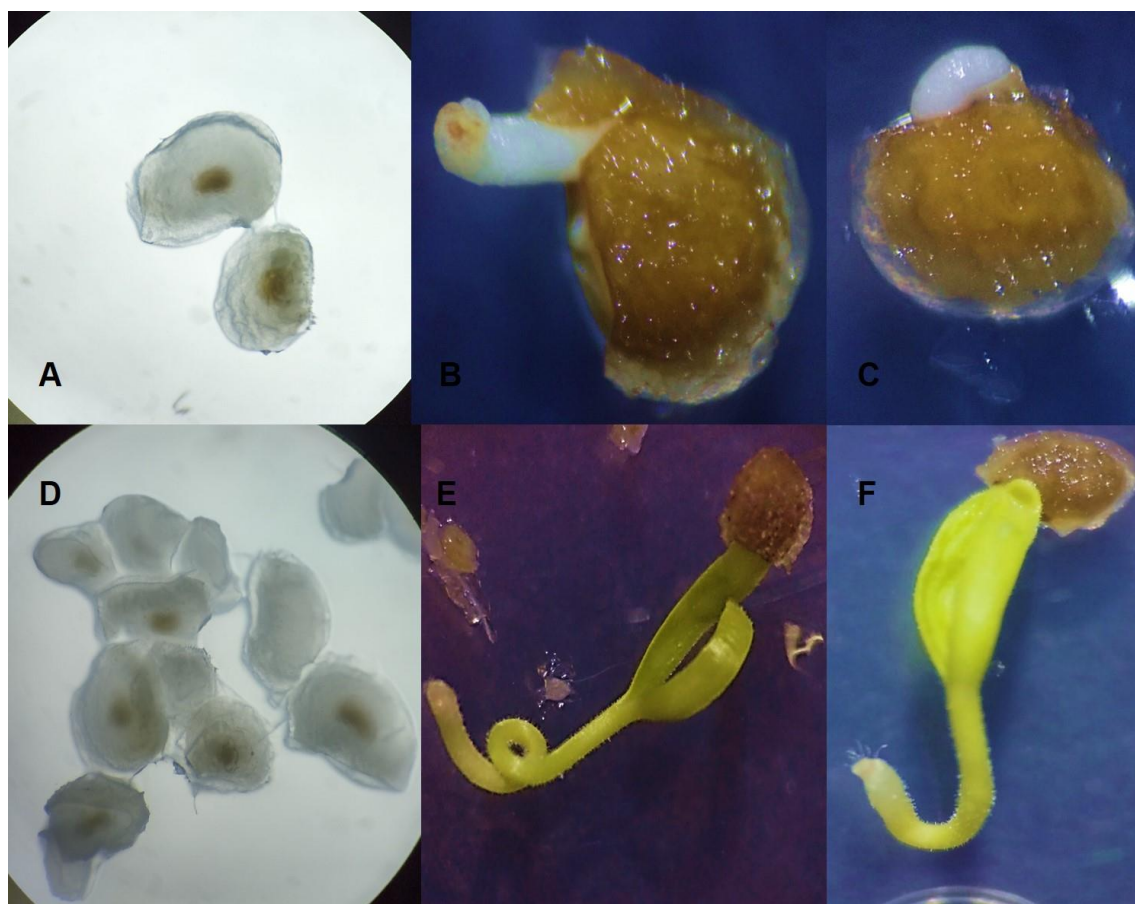


Figura 3. 3. **A:** Respuesta *in vitro* de semilla anormal obtenida con 180 Gy **B:** Germinación de semilla normal inducida con 160 Gy **C:** Emergencia de radícula de semilla obtenida con 200 Gy. **D:** Respuesta *in vitro* de semilla anormal obtenida con 220 Gy. **E:** Plántula 15 días después de germinación (200 Gy) **F:** Planta derivada de semilla promovida con 160 Gy.

En *Cucumis melo* L. se determinó que si el embrión se cultiva al menos en etapa cotiledonar es posible regenerar plantas haploides con polen tratado a 250 Gy (Goodbole & Hosakatte, 2012). No obstante, el rescate *in vitro* de embriones es muy laborioso y costoso; en cambio, la siembra directa de semillas maduras seleccionadas mediante inspección en cámara de luz hace más eficiente la técnica de ginogénesis con polen irradiado (Ari et al., 2010; Baktemur et al., 2013). Con base en los resultados del rescate *in vitro* de semillas inmaduras en tomate se recomienda esperar la maduración fisiológica del fruto, extraer semillas y analizar la presencia de embrión mediante observación en cámara de luz para obtener plantas *in vitro* (Figura 3.3C, 3.3D), las cuales pueden ser empleadas para la cuantificación del nivel de ploidía y duplicación cromosómica.

3.5 Conclusiones

El uso de polen irradiado con ^{60}Co para inducir frutos de tomate fue exitoso desde 160 a 220 Gray, sin embargo, debido a que las dosis de radiación fueron altas, la tasa de formación de semillas normales fue baja, pero es necesario determinar su ploidía para determinar su potencial ginogénico.

Se recomienda emplear los racimos formados antes de 60 días después de trasplante porque en las plantas poseen mayor vigor en la producción de frutos y semillas producidas con polen irradiado. Con esto se asegura respuesta favorable a la inducción de ginogénesis con polen irradiado.

El uso de polen tratado con radiación-y generó el aborto del embrión en etapas tempranas del desarrollo del fruto, lo cual no permitió la formación de plantas a partir del rescate *in vitro* de semillas inmaduras. En cambio, se encontraron semillas maduras normales al extraerlas de manera directa en frutos maduros, estas formaron plántulas *in vitro* de tomate. Una vía probable con mayor éxito para producir plantas a partir de partenogénesis dependiente de polinización es mediante la obtención de semillas maduras y su siembra en condiciones *in vitro*.

3.6 Literatura citada

Akbudak, N. & Seniz, V. (2009). *In vitro* and *in vivo* behavior of gamma irradiated tomato (*Lycopersicon esculentum*) pollen. *New Zealand Journal Crop Horticulture Science*, 37 (4), 361-367. <https://doi.org/10.1080/01140671.2009.9687591>.

Antúñez-Ocampo, O. M., Cruz-Izquierdo, S., Mendoza-Onofre, L. E., Sandoval-Villa, M., Santacruz-Varela, A., de la Cruz-Torres, E. & Peña-Lomelí, A. (2020). Growth dynamics of morphological and reproductive traits of *Physalis peruviana* L. M1 plants obtained from seeds irradiated with gamma rays. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici CLUJ-NAPOCA*, 48 (1), 200–209. <https://doi.org/10.15835/nbha48111745>

Ari, E., Ikten, H., Gocmen, M., Coskun, R. & Eren, A. (2010). Comparative evaluation of different embryo rescue techniques on parthenogenetic melon (*Cucumis melo* L.) fruits induced with irradiated pollen. *African Journal of Biotechnology*, 9 (33), 5347-5356. <https://doi.org/10.5897/AJB10.514>

Asif, M.A., Schilling, R.K., Tilbrook, J., Brien, C., Dowling, K., Rabie, H., Short, L., Trittermann, C., Garcia, A., Barrett-Lennard, E.G., Berger, B., Mather, D.E., Gilliam, M., Fleury, D., Tester, M., Roy, S.J. & Pearson, A.S. (2018). Mapping of novel salt tolerance QTL in an Excalibur × Kukri doubled haploid wheat population. *Theoretical and Applied Genetics*, 131, 2179–2196. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3146-y>.

Baktemur, G., Taşkın, H. & Büyükalaca, S. (2013). Comparison of different methods for separation of haploid embryo induced through irradiated pollen and their economic analysis in melon (*Cucumis melo* var. *inodorus*). *Plant Biotechnology*, 529502, <https://doi.org/10.1155/2013/529502>

Blasco, M., Badenes, M. L. & Naval, M. del M. (2016). Induced parthenogenesis by gamma-irradiated pollen in loquat for haploid production. *Breeding Science*, 66, 606–612, <https://doi.org/10.1270/jsbbs.16021>.

Bouvier, L., Zhang, Y. X. & Lespinasse, Y. (1993). Two methods of haploidization in pear, *Pyrus communis* L.: greenhouse seedling selection and *in situ* parthenogenesis induced by irradiated pollen. *Theoretical and Applied Genetics*, 87, 229–232, <https://doi.org/10.1007/BF00223769>.

Buttibwa, M., Kawuki, R. S., Tugume, A. K., Akol, J., Magambo, S., Apio, H., Heberle-Bors, E., Wedzony, M., Ceballos, H., Hershey, C. & Baguma, Y. (2015). *In vitro* embryo rescue and plant regeneration following self-pollination with irradiated pollen in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *African Journal of Biotechnology*, 14, 2191-2201, <https://doi.org/10.5897/AJB2015.14577>.

Cadahía L., C., Segura, M. L. & Massaguer R, A.M. (2005). Apéndice 1: Fertirrigación de cultivo hortícola. In C. Cadahía L., (Ed.) *Fertirrigación: Cultivos*

hortícolas, frutales y ornamentales (pp. 355-428). Editorial Mundi-Prensa. ISBN: 84-8476-247-5.

Dal, B., Sari, N. & Solmaz, I. (2016). Effect of different irradiation sources and doses on haploid embryo induction in Altınbas (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*) melons. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 40, 552-559, <https://doi.org/10.3906/tar-1511-27>.

Dong, YQ., Zhao, WX., Li, XH., Liu, XC., Gao, NN., Huang, JH., Wang, WY., Xu, XL. & Tang, ZH. (2016). Androgenesis, gynogenesis, and parthenogenesis haploids in cucurbit species. *Plant Cell Reports*, 35, 1991–2019. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2018-7>.

Forster, B.P., Heberle-Bors, E., Kasha, K. J. & Touraev, A. (2007). The resurgence of haploids in higher plants. *Trends in Plant Science* 12 (8), 1360–1375. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.06.007>

Godbole, M. & Hosakatte N., M. (2012). *In vitro* production of haploids via parthenogenesis in culinary melon (*Cucumis melo* var. *acidulus*). *Indian Journal of Biotechnology*, 11 (4), 495-497.

Grewal, S., Guwela, V., Newell, C., Yang, C-y., Ashling, S., Scholefield, D., Hubbard-Edwards, S., BurrIDGE A., Stride, A., King, I.P. & King, J. (2021). Generation of doubled haploid wheat-*Triticum urartu* introgression lines and their characterisation using chromosome-specific KASP markers. *Frontiers in Plant Sciences*, 12, 643636. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.643636>.

Grozeva, S., Todorova, V. & Nankar, A.N. (2021). Creation of pepper doubled haploids and morphological characterization of androgenic plants. *Euphytica*, 217, 113. <https://doi.org/10.1007/s10681-021-02840-w>.

Hentour, S., El Goumi, Y., Oubaidou, R., El Aanachi, S., Lamsaouri, O., Essayagh, S., Houmairi, H. & Fakiri, M. (2020). Results of *in vitro* androgenesis under increasing salinity conditions for three Moroccan spring barley varieties (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 10, 112-116. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2020.10.1.112-116>.

Hooghvorst, I., Torrico, O., Hooghvorst, S. & Nogués, S. (2020). *In situ* parthenogenetic doubled haploid production in melon “piel de sapo” for breeding purposes. *Frontiers in Plants Sciences*, 11, 378, <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00378>.

Khan, P.S.S.V., Vijayalakshmi, G., Raja, M.M., Naik, M.L., Germanà, M.A. & Terry, R.G. (2020). Doubled haploid production in onion (*Allium cepa* L.): from gynogenesis to chromosome doubling. *Plant Cell, and Tissue Organs Culture*, 142, 1–22. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01831-4>.

Kharkongar, H. P., Khanna, V.K., Tyagi, W., Rai, M. & Meetei, N.T. (2013). Wide hybridization and embryo-rescue for crop improvement in *Solanum*. *Agrotechnology*, *S11*, 004. <https://doi.org/10.4172/2168-9881.S11-004>.

Kumar, K.R., Singh, K.P., Bhatia, R., Raju, D.V.S. & Panwar, S. (2019). Optimising protocol for successful development of haploids in marigold (*Tagetes* spp.) through *in vitro* androgenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *138*, 11–28. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01598-3>.

Kumar M., A., Saini, R., & Nath, K. T. (2021). Double haploid production and its applications in crop improvement. In D. Kumar S., A. Thakur & P. Kumar (Eds.) *Agricultural biotechnology: Latest research and trends* (pp. 75-101). Springer Nature, ISBN: 978-981-16-2338-7.

Kundu, M. & Dubey, A. (2022). Impact of γ ray exposure on *in vitro* pollen viability and seed development pattern in different interspecific crosses of *Citrus*. *National Academy Science Letters*, *45*, 373-378. <https://doi.org/10.1007/s40009-022-01136-4>

Kurtar, E. S., Seymen, M. & Kal, Ü. (2020). An overview of doubled haploid plant production in *Cucurbita* species. *YYU Journal of Agricultural Sciences*, *30*, 510-520. <https://doi.org/10.29133/yyutbd.741087>.

Kurtar, E. S., Seymen, M. & Çetin, A.N. (2021). Türkmen, Ö. Dihaploidization in promising summer squash genotypes (*Cucurbita pepo* L.) via irradiated pollen technique. *YYU Journal of Agricultural Sciences*, *31*, 42-51. <https://doi.org/10.29133/yyutbd.800475>.

Lantos, C., Bóna, L., Nagy, É., Békés, F. & Pauk, J. (2018). Induction of *in vitro* androgenesis in anther and isolated microspore culture of different spelt wheat (*Triticum spelta* L.) genotypes. *Plant Cell, and Tissue Organ Culture*, *133*, 385–393. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1391-z>.

Linsmith, G., Rombauts, S., Montanari, S., Deng, C.H., Celton, J-M., Guérif, P., Liu, C., Lohaus, R., Zurn, J.D., Cestaro, A., Bassil, N.V., Bakker, L.V., Schijlen, E., Gardiner, S.E., Lespinasse, Y., Durel, C.-E., Velasco, R., Neale, D.B., Chagné, D.; Van de Peer, Y., Troggio, M., & Bianco, L. (2019). Pseudo-chromosome–length genome assembly of a double haploid “Bartlett” pear (*Pyrus communis* L.), *GigaScience*, *8*, giz138. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz138>.

Marin-Montes, I.M., Rodríguez-Pérez, J.E., Robledo-Paz, A., de la Cruz-Torres, E., Peña-Lomelí, A. & Sahagún-Castellanos, J. (2022). Haploid induction in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) via gynogenesis. *Plants*, *11*, 1595. <https://doi.org/10.3390/plants11121595>

Mba, C., Afza, R. & Shu, Q.Y. (2012). Mutagenic radiations: X-rays, ionizing particles and ultraviolet. In Q.Y. Shu, B.P. Forster, & H. Nakagawa (Eds.). *Plant*

mutation breeding and biotechnology (pp. 83-90) CAB International and FAO. ISBN: 978-178064-085-3

Moreno B., N.E., Miranda, D. & Martínez M., F.E. (2013). Zeatin promotes sugar apple seed germination (*Annona squamosa* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 7 (1), 9-19.

Murovec, J. & Bohanec, B. (2013). Haploid induction in *Mimulus aurantiacus* Curtis obtained by pollination with gamma irradiated pollen. *Scientia Horticulturae*, 162, 218-225. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.08.012>.

Musial K. & Przywara, L. (1998). Influence of irradiated pollen on embryo and endosperm development in kiwifruit. *Annals of Botany*, 82 (6), 747-756, <https://doi.org/10.1006/anbo.1998.0747>.

Nasertorabi, M., Madadkhah, E., Moghbeli, E., Grouh, M. S. H. & Soleimani, A. (2012). Production of haploid lines from parthenogenetic Iranian melon plants obtained of irradiated pollen (*Cucumis melo* L.) *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 3 (8), 1585-1589.

Nishiyama, I. & Tsukuda, S. (1961). Effects of X- and gamma-irradiations on pollen fertility of *Lycopersicum pimpinellifolium*. *The Japanese Journal of Genetics*, 36 (11), 423-427. <https://doi.org/10.1266/jjg.36.423>.

Ollitrault, P., Germanà, M. A., Froelicher, Y., Cuenca, J., Aleza, P., Morillon, R., Grosser, J. W. & Guo, W. (2020). Ploidy manipulation for citrus breeding, genetics, and genomics. In A. Gentile, S. La Malfa, & Z. Deng (Eds.). *The citrus genome. compendium of plant genomes* (pp. 75-106). Springer Nature. ISBN: 978-3-030-15308-3.

Olszewska, D. & Tomaszewska-Sowa, M. (2022). Androgenesis—technology for obtaining genetically stable breeding material of *Capsicum annuum* L. *Agriculture*, 12, 19. <https://doi.org/10.3390/agriculture12010019>.

Ortíz-Islas, S., García-Lara, S., Preciado-Ortíz, R.E. & Serna-Saldívar, S.O. (2019). Fatty acid composition and proximate analysis of improved high-oil corn double haploid hybrids adapted to subtropical areas. *Cereal Chemistry*, 96, 182–192, <https://doi.org/10.1002/cche.10109>.

Peixe, A., Camposa, M.D., Cavaleiroa, C., Barrosoa, J. & Paisb, M.S. (2000). Gamma-irradiated pollen induces the formation of $2n$ endosperm and abnormal embryo development in European plum (*Prunus domestica* L. cv. “Rainha Cláudia Verde”). *Scientia Horticulturae*, 86 (4), 267-278, [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(00\)00156-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(00)00156-4).

Pereira-Lorenzo, S., Fischer, M., Ramos-Cabrer, A.M. & Castro, I. (2018). Apple (*Malus* spp.) breeding: present and future. In J. Al-Khayri, S. Jain, & D. Johnson

(Eds.) *Advances in plant breeding strategies: Fruits* (pp. 3-29). Springer. ISBN: 978-3-319-91944-7.

Piosik, Ł., Ruta-Piosik, M., Zenkteler, M. & Zenkteler, E. (2019). Development of interspecific hybrids between *Solanum lycopersicum* L. and *S. sisymbriifolium* Lam. via embryo calli. *Euphytica*, 215, 31. <https://doi.org/10.1007/s10681-019-2358-9>

Sadat-Hosseini, G. M., Sousaraei, N., Akbari, M., Rahimi, V. & Bayat, H. (2015). Induction of haploid plants in iris (*Iris pseudacorus*) by pollen irradiation. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 39, 596-600, <https://doi.org/10.3906/tar-1407-18>.

Samantara, K., Bohra, A., Mohapatra, S.R., Prihatini, R., Asibe, F., Singh, L., Reyes, V.P., Tiwari, A., Maurya, A.K., Croser, J.S., Wani, S.H., Siddique, K.H.M. & Varshney, R.K. (2022). Breeding more crops in less time: a perspective on speed breeding. *Biology*, 11, 275. <https://doi.org/10.3390/biology11020275>

Seguí-Simarro, J.M. (2016). Androgenesis in *Solanaceae*. In M. Germana, & M. Lambardi (Eds.) *In vitro embryogenesis in higher plants. Methods in molecular biology* (pp. 209-244). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_9

Shar, T., Sheng, Z-h., Ali, U., Fiaz, S., Wei, X-j., Xie, L-h., Jiao, G-l., Ali, F., Shao, G-N., Hu, S-K, Hu, P-S & Tang, S-Q (2020). Mapping quantitative trait loci associated with starch paste viscosity attributes by using double haploid populations of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Integrative Agriculture*, 19, 1691-1703. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62726-7](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62726-7).

Stephan, O.O.H. (2021). Implications of ionizing radiation on pollen performance in comparison with diverse models of polar cell growth. *Plant, Cell & Environment*, 44 (3): 665– 691. <https://doi.org/10.1111/pce.13929>

Taşkın, H., Yücel, N. K., Baktemur, G., Çömlekçioğlu, S. & Büyükalaca, S. (2013). Effects of different genotypes and gamma ray doses on haploidization with irradiated pollen technique in watermelon (*Citrullus lanatus* L.). *Canadian Journal of Plant Science*, 93 (6), 1165–1168, <https://doi.org/10.4141/cjps2013-059>

Tyrka, M., Oleszczuk, S., Rabiza-Swider, J., Wos, H., Wedzony, M., Zimny, J., Ponitka, A., Ślusarkiewicz-Jarzina, A., Metzger, R. J., Baenziger, P. S. & Lukaszewski, A. J. (2018). Populations of doubled haploids for genetic mapping in hexaploid winter triticale. *Molecular Breeding*, 38, 46. <https://doi.org/10.1007/s11032-018-0804-3>

Thomas, T.D. & Chaturvedi, R. (2008). Endosperm culture: a novel method for triploid plant production. *Plant Cell, and Tissue Organ Culture*, 93, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9336-6>

Vijverberg, K., Ozias-Akins, P. & Schranz, M.E. (2019). Identifying and engineering genes for parthenogenesis in plants. *Frontiers in Plants Sciences*, 10, 128, <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00128>

Wang, S.M., Lan, H., Jia, H.H., Xie, K.D., Wu, X. M., Chen, C.L. & Guo, W.W. (2016). Induction of parthenogenetic haploid plants using gamma irradiated pollens in 'Hirado Buntan' pummelo (*Citrus grandis* [L.] Osbeck). *Scientia Horticulturae*, 207, 233-239, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.05.028>

Yan, G., Liu, H., Wang, H., Lu, Z., Wang, Y., Mullan, D., Hamblin, J. & Liu, C. (2017). Accelerated generation of selfed pure line plants for gene identification and crop breeding. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1786. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01786>

Yang, L., Liu, D., Hu, W., Chun, Y., Zhang, J. & Liu, Y. (2020). Fruit characteristics and seed anatomy of 'Majia' pomelo pollinated with cobalt-60 gamma-ray-irradiated pollen. *Scientia Horticulturae*, 267, 109335, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109335>

CAPÍTULO IV

RADIOSENSIBILIDAD DE POLLEN DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) A ^{60}Co PARA INDUCIR GINOGENESIS.

Resumen

La ginogénesis es una variante de la partenogénesis que genera embriones haploides, solo en presencia del gameto masculino que no aporta su información genética. Este fenómeno es la base de una metodología para inducir plantas haploides en cultivos hortícolas recalcitrantes a androgénesis. El objetivo del presente estudio fue determinar DL50 a ^{60}Co en polen de tomate para evaluar su potencial en inducción de ginogénesis. Para ello, polen normal fue tratado con radiación gamma con 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 y 220 Gy; posteriormente, el polen irradiado fue empleado para polinizar un híbrido experimental a los 30, 60 y 70 días después del trasplante (DDT). A partir del modelo de regresión se estimó que la capacidad germinativa del polen y formación de embriones se redujo 50 % con 95 y 53 Gy, respectivamente; esto permitió clasificar la radiación como baja (≤ 53 Gy), intermedia ($54 \text{ Gy} > x \leq 95$), y alta (> 95 Gy), por lo que se recomienda emplear dosis superiores a 100 Gy en la inducción de partenogénesis con polen irradiado. El efecto del ambiente de desarrollo afecta el éxito de ginogénesis en tomate, según lo sugiere una mejor respuesta en formación de semillas y tamaño de frutos en condiciones de primavera-verano comparada con invierno-primavera.

Palabras clave: radiación gamma, ginogénesis, partenogénesis, mejoramiento genético, dobles haploides, DL50.

4.2 Introducción

Los dobles haploides (DH) son apreciados en el mejoramiento genético debido a que permiten alcanzar 100 % de homocigosis en un solo ciclo; en contraste, la generación de líneas homocigóticas de manera convencional exige al menos 6 ciclos de autofecundación (Rajcan, Boersma & Shaw, 2011; Seguí-Simarro, Jacquier. & Widiez, 2021). Esto significa un acortamiento apreciable del período de generación de híbridos, lo cual puede traducirse en ahorros de millones de

dólares en programas de mejoramiento genético de cultivos (Rajcan, Boersma & Shaw, 2011; Yan et al., 2017).

En los cultivos de interés agrícola que son recalcitrantes al cultivo *in vitro* de anteras, la barrera inicial para generar DH es la dificultad para la obtención de genotipos haploides (Hazarika, Mishra & Chaturvedi, 2013). En estas especies, la ginogénesis es la principal alternativa para solventar esta limitante; tal es el caso de los cultivos *Nigella sativa* (El-Mahrouk et al., 2018), *Allium cepa* L. (Fayos et al., 2015), cucurbitáceas (Kurtar, Seymen & Kal, 2020), *Helianthus annuus* L. (Drumeva et al., 2014), *Beta vulgaris* L. (Kolesnikova, Donskikh & Berdnikov, 2021), *Manihot esculenta* (Baguma et al., 2019), *Daucus carota* (Vitsenia & Sergiyenko 2015), *Hylocereus* (Tel-Zur, 2022) y *Zea mays* L. (Chumkov & Maziov, 2022).

La partenogénesis es una forma de reproducción asexual que permite el desarrollo de un organismo que solo contiene la información genética materna sin fertilización (Jacquier et al., 2020), este fenómeno puede ocurrir de forma natural en dicotiledóneas y es regulada por el gen *PAR*, sus alelos se expresan en polen, al bloquear la embriogénesis después de fecundación (Underwood et al., 2022). Por otra parte, la ginogénesis es una variante de la partenogénesis en la cual el desarrollo del cigoto necesita ser inducido por la presencia de polen, este promueve embriogénesis, pero no aporta información genética y, por lo tanto, el embrión será haploide n (Jacquier et al., 2020).

La inducción de ginogénesis puede emplearse en el cultivo *in vitro* de ovarios (Zhu et al., 2019; Ermolaev & Domblides, 2022) u óvulos (Domblides et al., 2019; Zayachkovskaya et al., 2021) sin polinizar, o bien de manera *in vivo* con psuedofertilización con polen irradiado (Godbole & Hosakatte, 2012), hibridación interespecífica (Piosik, Zenkteler & Zenkteler, 2016) o genotipos inductores (Hooghvorst & Nogués, 2021; Zargar et al., 2022).

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es de los principales cultivos hortícolas sembrados a nivel mundial, tan solo en 2020 representó el 8 % del área total cosechada de hortalizas en el mundo, donde se cosecharon 186.8 millones de

toneladas con valor cercano a US \$9.81 miles de millones (FaoStat, 2022). A pesar de su importancia económica el uso de dobles haploides en su mejoramiento genético no ha sido posible debido a su recalcitrancia a androgénesis; además, se desconoce el potencial de variantes ginogénicas para inducir haploidía en esta hortaliza (Marin-Montes et al., 2022). El avance más reciente en tomate se logró mediante mutagénesis dirigida en genes *DMP*, donde obtuvieron 1.9 % de éxito al inducir haploidía en genotipos con genes *slomp* (Zhong et al., 2022). No obstante, es necesario perfeccionar este método con fin de hacerlo reproducible en diferente germoplasma.

Otra alternativa en tomate sería la inducción de ginogénesis con polen irradiado, la cual es exitosa en distintas especies recalcitrantes; no obstante, el uso de esta técnica exige inicialmente determinar la dosis letal 50 (DL_{50}), el efecto de la radiación sobre polen y el nivel de radiación adecuado que permita desarrollar embriones haploides (Szarajko, 2012; Kundu & Dubey, 2020). En este contexto, Germana (2012) sugirió utilizar dosis superiores a DL_{50} para inactivar por completo el material genético paterno, ya que las dosis bajas solo generan mutaciones que afectan el desarrollo del embrión o planta. En tomate, las dosis de radiación empleadas con este objetivo no han permitido obtener frutos o semillas (Marin-Montes et al., 2022). Es necesario identificar la dosis óptima para promover ginogénesis en este cultivo. Así, el objetivo de esta investigación fue determinar, en polen de una línea homocigótica de tomate, la DL_{50} debida a la exposición de rayos γ y generados mediante ^{60}Co y evaluar su potencial en la inducción de ginogénesis.

4.3 Materiales y métodos

La presente investigación se realizó en instalaciones del Departamento de Fitotecnia, de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) ubicada en Texcoco, Estado de México (19° 29' 23" N y 98° 53' 37" O).

Como fuente de polen se empleó la línea homocigótica S_8 , con hábito de crecimiento indeterminado y fruto cilíndrico, mientras que el progenitor hembra fue un híbrido experimental de tomate tipo saladette y crecimiento indeterminado.

Ambos materiales se establecieron con condiciones de hidroponía en invernadero de abertura total con cubierta plástica blanca calibre 600, 70 % de transmitancia de luz y sistema hidropónico abierto.

El 3 de enero de 2022 se realizó la primera siembra de ambos progenitores en charolas de poliestireno expandido con 200 cavidades. Como sustrato se empleó espuma agrícola (Oasis Easy Plant/Espuma 40) con 60 % de retención de humedad y 30 días después de siembra (DDS) se realizó el trasplante a macetas de polipropileno negro de 15 L que contenían arena volcánica (tezontle rojo) como sustrato. La nutrición fue suministrada de acuerdo con Cadahía, Segura & Massaguer (2005), aplicada acorde a etapa fenológica y condiciones ambientales, donde la temperatura mínima fue 6 ° C y máxima de 34 ° C. Una segunda siembra fue realizada el 20 de marzo de 2022 y trasplantada 20 DDS, con las condiciones de manejo antes descritas, durante su desarrollo la temperatura osciló entre 8.5 °C y 36 ° C.

Los factores estudiados fueron dosis de radiación- γ (0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 y 220 Gy) y edad de la planta en la polinización (30, 60 y 70 días después de trasplante [DDT]). El diseño de tratamientos fue factorial completo, lo que generó un total de 36 tratamientos ensayados. La unidad experimental consistió en 10 flores en la misma etapa de desarrollo. Se usó un diseño experimental completamente al azar con 4 repeticiones.

La emasculación de flores inmaduras se realizó 48 horas antes de polinización mediante el procedimiento propuesto por Kimura & Sinha (2008). Las flores emasculadas se cubrieron con bolsas de glassine # 000 para evitar contaminación de polen normal. El polen fue colectado 48 horas antes de polinización, en tubos de polipropileno de 0.5 mL (Eppendorf, Thermo Fisher Scientific) con vibración mecánica generada con cepillo de dientes eléctrico (Pro 500 Floss Action, Oral B).

El polen fue trasladado al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) de México, para ser tratado en una unidad de radiación GAMMACELL 220 con ^{60}Co . En la polinización realizada en 30 DDT el irradiador tenía razón de dosis

16.644741 Gy h⁻¹, en la de 60 DDT fue de 16.898831 Gy h⁻¹, y en la de 70 DDT 16.44185 Gy h⁻¹. Al terminar el tratamiento, el polen regresó a la UACH para polinizar las flores emasculadas. La bolsa de glassine fue conservada durante 10 días más en la flor polinizada para evitar contaminación con polen normal.

Las plantas recibieron manejo agronómico convencional para producción, en donde se realizó aplicación foliar de aminoácidos (Agro-K Amino, Cosmocel). El control preventivo de enfermedades fúngicas y bacterianas se realizó con oxiclورو de cobre (Cupravit, BAYER); el control curativo de *Alternaria solani* y *Leveillula taurica* con Boscalid+Pyraclostrobin (Cabrio C, BASF). El control de mosquita blanca se realizó con Buprofezin (Applaud 40sc, Arysta Life Science) y Naled (Lucanal 900-E, Lucava). Todos los productos fueron aplicados con dosis y frecuencia recomendadas por el fabricante.

Al cosechar se cuantificó el porcentaje de frutos normales y anormales, peso de frutos normales y anormales, diámetro polar y ecuatorial de frutos normales. Se consideró como fruto normal aquellos con forma cilíndrica, con pulpa, peso ≥ 12 g, y semillas, en tanto que los anormales fueron aquellos sin pulpa, peso < 12 g y sin semillas.

Posteriormente, los frutos fueron cortados de manera transversal para extraer semillas formadas con polen irradiado, y clasificarlas en semillas normales, aquellas de tamaño estándar con embrión y endospermo, y anormales aquellas sin embrión y tamaño pequeño.

De manera simultánea a polinización *in situ*, se evaluó la germinación *in vitro* de polen irradiado, en el “Laboratorio de las Estructuras de las Plantas Cultivadas”, del Departamento de Fitotecnia de la UACH. La prueba de germinación fue establecida a temperatura ambiente durante 24 horas en un medio líquido de cultivo que constó de: 12 g L⁻¹ de sacarosa, 100 mg L⁻¹ de H₃BO₃ (JT Baker), 300 mg L⁻¹ de Ca(NO₃)₂·4H₂O (J.T Baker) y 100 mg L⁻¹ de KNO₃ (Técnica Química), con pH de 6.5. En portaobjeto de cristal se colocaron 2 ml de medio líquido, uno en cada extremo, donde se aplicó polen con ayuda de agujas de 0.5 mm de diámetro, el portaobjeto fue conservado en caja Petri de cristal de 90x15 mm,

para evitar la evaporación del medio se colocó papel filtro Whatman No. 4 humedecido en su totalidad con agua destilada. Estas pruebas fueron realizadas con diseño experimental completamente al azar, donde los tratamientos fueron las combinaciones de dosis de radiación gamma y edades de planta, con 4 repeticiones por unidad experimental, la cual consistió en un portaobjeto de cristal con 2 gotas de medio de cultivo.

Los granos de polen se observaron mediante un microscopio óptico Zeiss en objetivo 40X y fuse obtuvieron fotografías digitales en cuatro campos del cubreobjeto; después, se contaron 300 granos de polen en cada repetición y se determinó el porcentaje de granos de polen germinados. Se consideró que un grano de polen había germinado cuando su tubo polínico midió al menos dos veces el diámetro del grano (Song, Nada, & Tachibana, 2001).

4.3.1 Análisis estadístico

La DL_{50} se determinó mediante análisis de correlaciones de Pearson y análisis de regresión cuadrática. A las variables sin distribución normal se aplicó la transformación de Box Cox, o bien, la transformación angular. Posteriormente, se realizaron análisis de varianza mediante el modelo del experimento factorial usado (dosis de radiación, edad de planta y su interacción), y se comparó las medias (Tukey, $p \leq 0.5$) de los caracteres con significancia estadística. Se empleó el paquete computacional Statistical Analysis System (SAS) versión 9.4.

4.4 Resultados y discusión

A partir del análisis de correlación (Cuadro 4.1) se identificó fuerte asociación negativa ($p \leq 0.05$) entre dosis de radiación con porcentaje de germinación de polen (PGP) (-0.82), porcentaje de semillas normales (PSN) (-0.88), y número total de semilla (NTS) (-0.53). De forma similar, se han observado efectos negativos por el efecto de radiación en *Juglans regia* (Sadat et al., 2011), *Cucumis melo* (Godbole & Niranjana, 2012), *Nicotiana Alata* (Grubska et al., 2018) y *Citrus* (Kundu & Dubey, 2020). Esto confirma que la capacidad germinativa del polen del tomate disminuyó de manera proporcional al aumento de energía absorbida; asimismo, la posibilidad de inducir embriogénesis disminuye.

El modelo de regresión cuadrático (Figura 4.1) explicó el efecto de radiación gamma sobre germinación de polen ($R^2 = 0.83$) y formación de semillas normal ($R^2 = 0.94$) de tomate. El polen disminuyó su capacidad germinativa 64 % debido al transporte y almacenamiento de 48 horas antes de emplearlo; esto es normal en tomate debido a que polen fresco sin tratamiento de pre secado pierde viabilidad en pocas horas, y esta se reduce entre 67 y 89 % a 25 °C en 2 días (Abdul-Baki, 1992; Heidmann et al., 2016).

En PGP con 95 Gy se redujo su valor en 50 % de los granos de polen, por lo cual este valor se consideró como DL_{50} . En contraste, Akbudak & Seniz (2009) reportaron que con 400 Gy de radiación gamma ocurrió la reducción del 50 % de germinación de polen en *S. lycopersicum*; en cambio, *Lycopersicum pimpinellifolium* presentó DL_{50} con 2000 Gy de rayos X (Nishiyama & Tsukuda, 1959). Estas diferencias se asocian a factores como especie, genotipo, tipo de radiación, intensidad de radiación, almacenamiento de polen (Brock & Franklin, 1966, Lagoda, 2012), por lo cual cada genotipo tendrá respuesta particular a la irradiación.

En la presente investigación, el incremento de las dosis de rayos gamma disminuyó drásticamente la fertilidad del polen, lo que demeritó la formación de semillas viables; así, al tratar polen normal con 53 Gy de ^{60}Co se redujo 50 % la generación de semillas con embrión. Brock & Franklin (1966) determinaron que la DL_{50} en *L. pimpinellifolium* ocurre con 60 Gy de radiación gamma. En contraste, *S. lycopersicum* con 50 Gy disminuyó solo 19 % la formación de semillas, y con 30 Gy la reducción fue de 23 % (Contant et al., 1971).

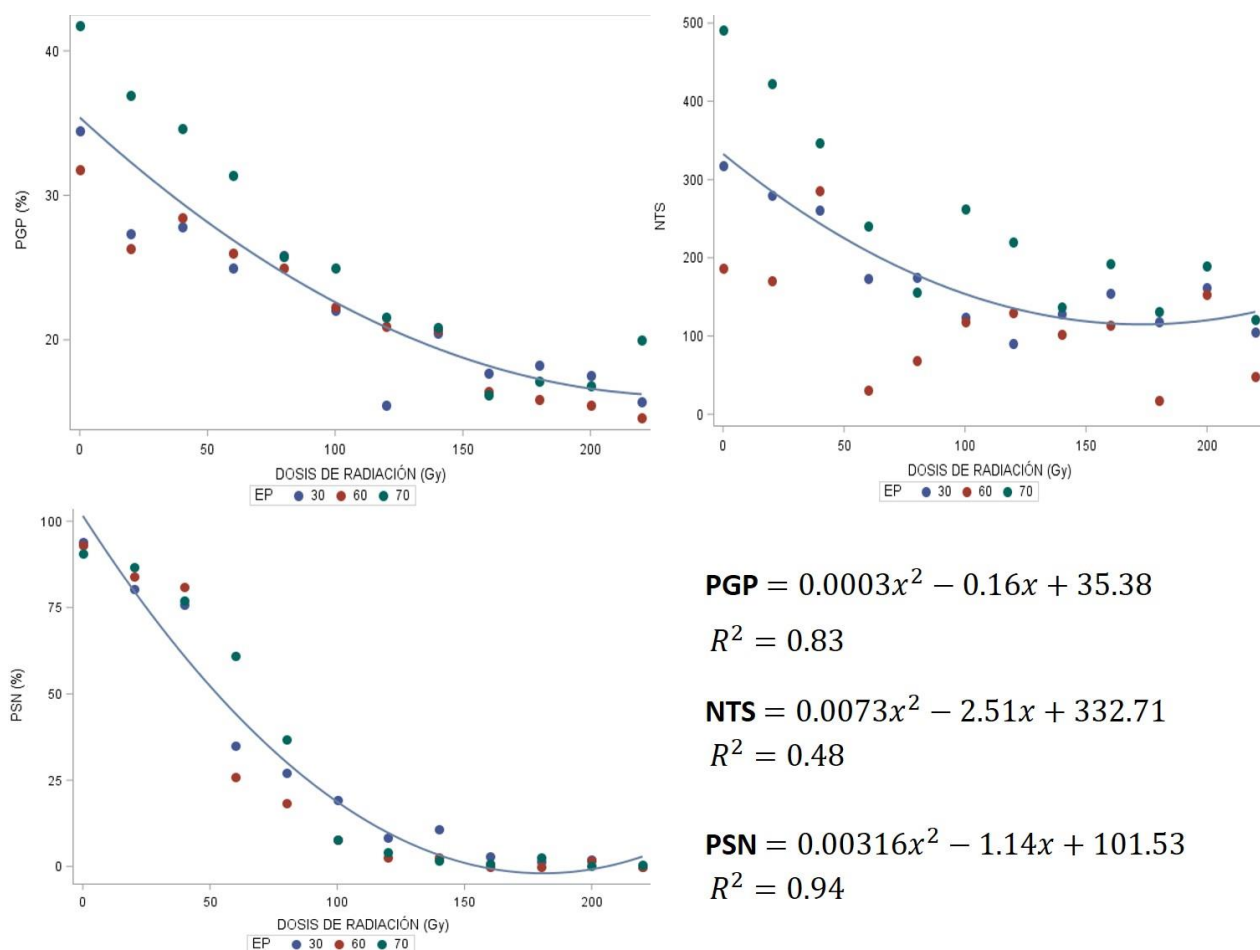


Figura 4. 1. Respuesta de la radiación gamma en germinación de polen y formación de semillas. PGP: porcentaje de germinación de polen, PSN: porcentaje de semillas normales, NTS: número total de semillas.

A partir de los resultados obtenidos en fertilidad del polen (porcentaje de germinación), los niveles de radiación se clasificaron como bajo (< 53 Gy), intermedio (entre 53 y 95 Gy), y alto (> 95 Gy), con porcentajes promedio de germinación de polen de 32.16, 26.49 y 18.62, respectivamente. En solanáceas como *Nicotiana glauca* la célula generativa detiene su división con 300 Gy, aunque el tubo polínico crece hasta con 2000 Gy. En la presente investigación se consideró que 100 Gy corresponde al nivel mínimo necesario para inducir apogamia en frutos de tomate, porque con esta dosis las semillas normales solo representan 19 %; en contraste, dosis bajas o intermedias no desactivaron el material genético por completo y solo indujeron mutaciones, debido a que Contant et al. (1977) indicaron que en tomate la formación de semillas es normal

con 50 y 60 Gy, pero con estas dosis se induce una tasa de mutaciones de 0.10% y 10.3×10^{-6} , respectivamente.

Según, el análisis de varianza (Cuadro 4.1) tanto radiación gamma como edad de planta ejercieron efectos diferentes en polen. La capacidad de formación de frutos y semillas difirieron con respecto a la del testigo ($p > 0.05$); así, los caracteres asociados con desarrollo de fruto fueron afectados por la interacción entre ambos factores ($p > 0.05$), por lo cual es necesario determinar el factor de mayor importancia para disminuir su efecto en pro de mejorar esta técnica. Los coeficientes de variación fueron altos en NTS y PFN, debido a la aleatoriedad con que rayos gamma afectaron al grano de polen y fecundación de óvulos. En este contexto, el uso de radiación para inducción de ginogénesis tiene efectos similares a los observados en otras especies; por ejemplo, en *Cucurbita pepo* ssp. *pepo* var. *styriaca*, se observaron diferentes respuestas del polen a distintos niveles de radiación (Košmrlj, Murovec & Bohanec, 2013); también, Sauton (1988) encontró que el factor ambiente de desarrollo de genotipos de *Cucumis melo* L. generó variación en su respuesta ginogénica.

Cuadro 4. 1. Significancia estadística de las fuentes de variación en características evaluados en frutos de tomate generados con polen irradiado

FV	GL	PGP	NTF	FA	NTS	PFN	PFA	DP	DE
DRAD	11	0.90 *	253.2 1	0.74	418.92*	121719.29 *	3.11	108.48 *	69.47*
EP	2	0.26 *	213.1 2	3.57*	1099.08 *	934875.15 *	10.83 *	867.31 *	802.15 *
DRAD*E P	22	0.03	190.9 1	0.46	60.80*	55134.78*	3.18*	47.18*	33.41*
Error	10 8								
Lamda		0.70	0.50		0.50		0.25		
CV		4.87	13.39	13.7 5	23.11	35.02	25.61	6.89	7.38

FV: Fuente de variación, DRAD: dosis de radiación-γ, EP: edad de planta, CV: coeficiente de variación. GL: grados de libertad. PGP: porcentaje de germinación de polen, NTF: número total de frutos. FA: porcentaje de amarre de fruto anormal. NTS: número total de semillas, PFN: peso total de frutos normales. PFA: peso total de frutos anormales. DP: diámetro polar de frutos normales. DE: diámetro ecuatorial de frutos normales. *:significancia estadística con $p \leq 0.05$.

Las dosis de radiación produjeron efectos significativos en la capacidad germinativa del polen (Cuadro 4.2), al respecto, se observó que las dosis bajas e intermedias causaron efectos similares entre sí, y solo con dosis altas se identificaron efectos diferentes entre dosis. Los resultados son congruentes con lo reportado en tomate por Akbudak & Seniz (2009) quienes indicaron que a partir de 300 Gy la germinación disminuye de manera significativa. Así, en *Linum usitatissimum* la germinación de polen se redujo 60 % con 400 Gy, y con dosis menores se generó una radio estimulación en su capacidad germinativa (Pandey & Kumar, 2013).

Cuadro 4. 2. Valores promedios del efecto de la polinización con polen irradiado y sin irradiar en características de frutos de tomate

DRAD	PGP	NTF	FA	NTS	PFN	PFA	DP	DE
0	36.00a	9.08a	2.00a	332.25a	625.33ab	23.66a	63.33a	55.06a
20	30.19ab	8.92a	2.08a	291.00a	614.25ab	33.67a	61.66ab	54.62a
40	30.31ab	9.25a	1.58a	298.33a	711.75a	22.42a	63.39a	54.22ab
60	27.44bc	8.50a	2.83a	148.42bc	466.33a-c	41.67a	58.42a-c	50.31a-c
80	25.54b-d	9.33a	2.50a	133.25bc	550.08a-c	34.25a	60.75ab	50.86a-c
100	23.12c-e	9.17a	2.75a	167.83b	490.67a-c	40.00a	58.81a-c	51.14a-c
120	19.33e-g	9.67a	3.08a	146.83bc	484.67a-c	36.83a	57.64bc	50.67a-c
140	20.67d-f	8.50a	2.33a	122.08bc	478.67a-c	36.33a	58.54a-c	50.19a-c
160	16.77g	9.42a	2.25a	153.42bc	508.08a-c	32.92a	57.78bc	50.64a-c
180	17.10fg	8.58a	3.25a	88.58c	393.00a-c	47.08a	55.06c	49.18bc
200	16.64g	9.50a	2.58a	168.42b	530.25a-c	38.83a	57.31bc	50.33a-c
220	16.78g	8.50a	3.00a	91.67bc	343.92c	40.33a	53.60c	46.65c
DMSH	4.64	1.65	1.70	102.66	246.70	26.93	5.53	5.15

FV: Fuente de variación, DRAD: dosis de radiación-γ, EP: edad de planta, CV: coeficiente de variación. GL: grados de libertad. PGP: porcentaje de germinación de polen, NTF: número total de frutos. FA: porcentaje de amarre de fruto anormal. NTS: número total de semillas, PFN: peso total de frutos normales. PFA: peso total de frutos anormales. DP: diámetro polar de frutos normales. DE: diámetro ecuatorial de frutos normales. DMSH: diferencia mínima significativa honesta

La cantidad de semillas con embrión extraídas de los frutos formados disminuyó conforme la radiación gamma se incrementó (Cuadro 4.2); así, con dosis menores a 60 Gy se obtuvieron hasta 460 semillas con embrión (Cuadro 4.3), estadísticamente similar al testigo. A partir de 60 Gy la producción de semillas con embrión disminuyó ($p \leq 0.05$); con las dosis de 80 a 140 Gy disminuyeron a 26 y con 220 Gy se generaron solo 2 semillas con embrión (Figura 4.2, Cuadro

4.3). En *Morus indica* L. la formación de semillas por fruto fue menor con radiación alta (Madhuita & Padmaja, 2015), y en germoplasma élite de *Helianthus annuus* L. se obtuvieron más embriones con 600 Gy comparado con 900 Gy (Todorova et al., 2004). Lo anterior fue generado porque el efecto de rayos gamma es la eliminación de núcleo generativo (Grubka et al., 2018; Stephan, 2021), y en consecuencia, el tubo polínico solo puede generar embrión o endospermo, por lo que para formar semillas normales (con embrión y endospermo) es necesario la presencia de dos granos de polen (polispermia) (Peixe et al., 2000), lo cual implica que obtener este tipo de semillas mediante polen irradiado sea un evento raro.

Cuadro 4. 3. Efecto de la pseudopolinización con polen irradiado en formación de semillas normales y anormales en tomate

DRAD	Semillas normales				Semillas anormales			
	$\bar{X}$	SD	MIN	MAX	$\bar{X}$	SD	MIN	MAX
0	307.17	155.94	70.00	668.00	25.08	19.69	6.00	76.00
20	246.83	133.98	48.00	460.00	44.16	19.45	10.00	85.00
40	234.33	66.54	74.00	406.00	64.00	26.70	36.00	130.00
60	71.75	66.54	5.00	210.00	76.66	46.39	6.00	145.00
80	38.83	22.54	8.00	74.00	94.41	37.52	40.00	156.00
100	16.83	10.19	5.00	34.00	151.00	91.44	18.00	330.00
120	6.58	3.42	0.00	12.00	140.25	70.57	66.00	300.00
140	7.25	8.73	0.00	26.00	114.83	46.05	34.00	195.00
160	2.00	2.33	0.00	6.00	151.42	56.95	6.00	262.00
180	1.25	1.60	0.00	4.00	87.33	76.86	6.00	262.00
200	1.91	2.53	0.00	4.00	166.50	62.48	77.00	289.00
220	0.16	0.57	0.00	2.00	91.50	51.33	18.00	171.00

DRAD: dosis de radiación, $\bar{X}$: media aritmética, SD: desviación estándar, MIN: número mínimo de semillas, MAX: número máximo de semillas.

Las características asociadas al tamaño de fruto (PFN, DP y DE) mostraron correlación intermedia y significativa con NTS (0.76, 0.68 y 0.73) y respuesta similar al efecto de radiación gamma en NTS, es decir, frutos de mayor tamaño (92.69 g) fueron obtenidos con dosis menores de 40 Gy, y frutos pequeños (62.53 g) con 220 Gy (Figura 4.3). El efecto observado fue similar al obtenido en otras especies; por ejemplo, en *L. pimpinellifolium* la pseudopolinización con polen tratado con rayos gamma a 100 Gy generó frutos de mayor tamaño y menor

cantidad de semillas anormales comparado con emplear 300 Gy (Nishiyama & Tsukuda, 1961). Kundu & Dubey (2017) indicaron que al usar polen tratado con 200-300 Gy en *Citrus* encontraron que se obtuvieron frutos de tamaño comercial sin semillas.



Figura 4. 2. Semillas maduras de tomate obtenidas por pseudopolinización con polen irradiado. A: 0 Gy, B: 40 Gy, C: 80 Gy, D: 160 Gy, E: 180 Gy, F: 220 Gy. Barra escala = 5 cm.

El ambiente de desarrollo de ambos progenitores afectó de manera significativa la inducción de ginogénesis en tomate, mostrado por las diferencias debidas a la edad de planta (Cuadro 4.4). Así, PFN, NTS y DE obtenidos en plantas con 60 DDT mostraron valores inferiores; además la presencia de frutos anormales y su tamaño fue mayor, debido a que el desarrollo inicial que ocurrió con temperatura promedio de 19.22 ° C, mientras que en plantas con 30 y 70 DDT, las temperaturas fueron 22.36 y 21.15 ° C, respectivamente. Dicho efecto se generó

porque esta hortaliza se desarrolla en forma óptima bajo condiciones de invernadero con régimen térmico día/noche de 28/22 ° C (Yang et al., 2016), y durante los primeros 60 días después de siembra es sensible a temperaturas bajas (12/7 °C y 10/3 °C), que disminuyeron el estado fisiológico de planta y generaron que crecimiento vegetativo, contenido de clorofila y tasa fotosintética sean menores, lo cual conlleva a pérdida frutos y disminución del rendimiento total (Khan et al., 2015).

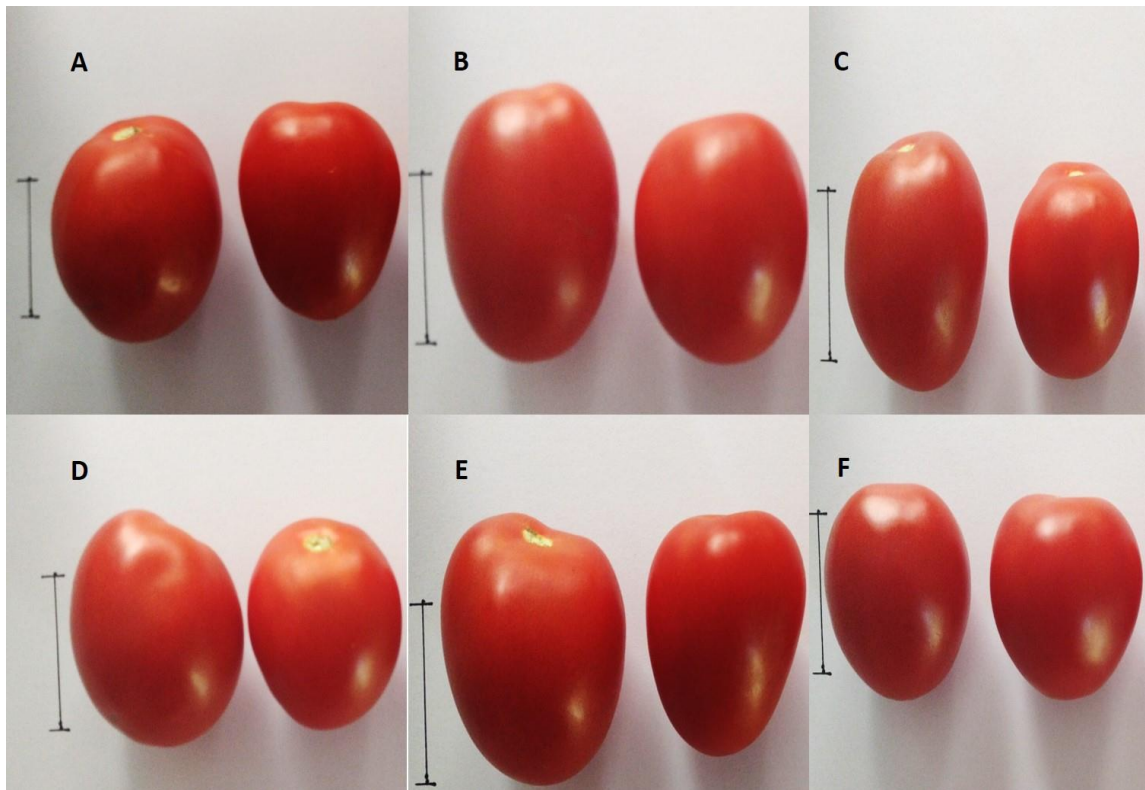


Figura 4. 3. Frutos maduros de tomate obtenidos por pseudopolinización con polen irradiado. A: 0 Gy, B: 40 Gy, C: 100 Gy, D: 120 Gy, E: 200 Gy, F: 220 Gy. Barra escala = 5 cm.

La interacción dosis de radiación x edad de planta ($p \leq 0.05$) modificó el comportamiento de NTS, PFN, PFA, DP y DE (Cuadro 4.5), es decir que el efecto relativo entre los niveles de irradiación no fue estadísticamente consistente a través de las edades de planta. Esto fue generada por el efecto aleatorio de la radiación gamma, además tanto el régimen de temperatura como la sanidad de genotipos fueron diferentes en cada ambiente y oportunidad de polinización.

También se encontró que el uso del primer racimo del progenitor hembra (30 DDT) desarrollado en primavera disminuye variación entre dosis de radiación, mientras que emplear plantas con 60 DDT durante invierno genera mayor variación en los caracteres evaluados. Al respecto, Dong et al (2016) sugirieron que las condiciones de desarrollo de ambos progenitores tienen efecto en el grado de éxito de inducción de partenogénesis con polen irradiado en cucurbitáceas, por lo cual es necesario reducir su impacto para mejorar de manera significativa esta metodología.

Cuadro 4. 4. Valores promedios del efecto de la polinización con polen irradiado y sin irradiar en características de frutos de tomate

EP	TP	PGP	NTF	FA	NTS	PFN	PFA	DP	DE
30	22.36	22.31b	9.23a	2.90a	174.17b	511.35b	39.35a	54.15c	52.49b
60	19.22	21.99b	9.15a	2.69a	118.75c	379.46c	39.25a	59.99b	46.56c
70	21.15	25.66a	8.73a	1.98b	242.60a	658.44a	28.40b	62.42a	54.41a
DMSH	-	1.65	0.59	0.61	36.51	87.74	9.58	1.97	1.83

EP: edad de planta (días después de trasplante). TP: temperatura promedio (° C). PGP: porcentaje de germinación de polen, NTF: número total de frutos. FA: porcentaje de amarre de fruto anormal. NTS: número total de semillas, PFN: peso total de frutos normales. PFA: peso total de frutos anormales. DP: diámetro polar de frutos normales. DE: diámetro ecuatorial de frutos normales. DMSH: diferencia mínima significativa honesta

4.5 Conclusiones

La pseudofertilización con polen irradiado mediante ^{60}Co con dosis bajas (< 53 Gy) producen semillas normales en cantidad similar al testigo. Por lo tanto, este nivel de radiación debe ser útil para inducir variabilidad genética en la especie; en contraste, dosis altas generan efecto negativo durante embriogénesis, lo cual sugiere que se deben emplear dosis mayores a 100 Gy para inducir ginogénesis.

El ambiente de desarrollo es un factor que afecta la inducción de ginogénesis. Es mejor que ambos progenitores al menos desarrollen con temperaturas promedio superiores a 20 ° C, para disminuir aborto de embriones, e incrementar formación de semillas normales con dosis de radiación alta.

Cuadro 4. 5. Interacción entre niveles de radiación y edad de planta en cinco características de semillas y tamaño de frutos de tomate.

DRAD	EP	NTS	PFN	PFA	DP	DE
0	30	318.50a-d	585.25a-f	25.00ab	64.50a-d	56.75a-d
0	60	187.00b-g	432.00a-f	34.00ab	58.33a-h	49.25b-g
0	70	491.25a	858.75ab	12.00b	67.16a	59.16ab
20	30	280.25a-e	563.00a-f	52.50ab	61.58a-f	55.24a-e
20	60	170.50c-h	397.00a-f	32.50ab	57.33a-h	48.58c-h
20	70	422.25ab	882.75a	16.00ab	66.05a-c	60.01a
40	30	261.25a-e	681.25a-e	20.00ab	63.16a-f	52.50a-f
40	60	286.25a-e	755.00a-c	29.25ab	64.41a-d	52.83a-f
40	70	347.50a-c	699.00a-d	18.00ab	62.58a-f	57.33a-c
60	30	174.00b-g	467.50a-f	46.75ab	61.16a-f	52.75a-f
60	60	30.25hi	187.00ef	53.50ab	47.66hi	41.50gh
60	70	241.00a-e	744.50a-c	24.75ab	66.41ab	56.66a-d
80	30	175.50b-g	634.75a-e	23.00ab	62.25a-f	52.58a-f
80	60	68.75f-i	324.50c-f	42.00ab	56.00a-h	45.33e-h
80	70	155.50c-h	691.00a-e	37.75ab	64.00a-e	54.66a-e
100	30	123.50d-i	393.00a-f	43.50ab	57.33a-h	51.50a-g
100	60	117.75d-i	400.00a-f	48.75ab	55.66b-h	47.08c-h
100	70	262.25a-e	679.00a-e	27.75ab	63.41a-f	54.83a-e
120	30	90.50e-i	319.00c-f	66.00a	54.75c-i	49.58a-g
120	60	130.00c-i	482.00a-f	14.00ab	55.16b-i	48.91b-h
120	70	220.00a-f	653.00a-e	30.50ab	63.00a-f	53.50a-f
140	30	127.75c-i	519.00a-f	39.00ab	61.16a-f	51.75a-g
140	60	101.50e-i	428.50a-f	37.00ab	56.75a-h	49.50a-g
140	70	137.00c-i	488.50a-f	33.00ab	57.70a-h	49.33b-g
160	30	154.00c-h	480.25a-f	42.75ab	58.83a-h	53.16a-f
160	60	114.00d-i	397.00a-f	34.50ab	52.75e-i	45.92e-h
160	70	192.25b-g	647.00a-e	21.50ab	61.75a-f	52.83a-f
180	30	117.50d-i	469.25a-f	43.50ab	58.91a-h	53.33a-f
180	60	17.500i	116.00f	59.00ab	43.95i	38.71h
180	70	130.75d-i	593.75a-f	38.75ab	62.30a-f	55.50a-e
200	30	162.00c-h	649.25a-e	34.50ab	58.99a-g	51.16a-g
200	60	153.00c-h	401.50a-f	49.00ab	52.25f-i	47.08c-h
200	70	190.25b-g	540.00a-f	33.00ab	60.66a-g	52.74a-f
220	30	105.25e-i	374.75b-f	35.75ab	57.25a-h	49.58a-g
220	60	48.50g-i	233.00d-f	37.50ab	49.54g-i	44.08f-h
220	70	121.25d-i	424.00a-f	47.75ab	54.00d-i	46.29d-h

DRAD: dosis de radiación-γ, EP: edad de planta, NTS: número total de semillas, PFN: peso total de frutos normales. PFA: peso total de frutos anormales. DP: diámetro polar de frutos normales. DE: diámetro ecuatorial de frutos normales

4.6 Literatura consultada

- Abdul-Baki, A. A. (1992). Determination of pollen viability in tomatoes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117 (3), 473-476. <https://doi.org/10.21273/JASHS.117.3.473>
- Akbudak, N. & Seniz, V. (2009). *In vitro* and *in vivo* behavior of gamma irradiated tomato (*Lycopersicon esculentum*) pollen. *New Zealand Journal Crop Horticulture Science*, 37 (4), 361-367. <https://doi.org/10.1080/01140671.2009.9687591>.
- Baguma, J. K., Kawuki, R., Mukasa, S. B., Buttibwa, M. Nalela, P., Eyokia, M., Oshaba, B., Lentini, Z., & Baguma, Y. (2019). Exploring the induction of doubled haploids in cassava through gynogenesis. *African Journal of Agricultural Research*, 14 (23), 975-985. <https://doi.org/10.5897/AJAR2018.13779>
- Brock, R.D. & Franklin, I.R. (1966). The effect of desiccation, storage and radiation intensity on mutation rate in tomato pollen. *Radiation Botany*, 6 (2), 171-179. [https://doi.org/10.1016/S0033-7560\(66\)80014-5](https://doi.org/10.1016/S0033-7560(66)80014-5).
- Cadahía L., C., Segura, M. L. & Massaguer R, A.M. (2005). Apéndice 1: Fertirrigación de cultivo hortícola. In C. Cadahía L., (Ed.) *Fertirrigación: Cultivos hortícolas, frutales y ornamentales* (pp. 355-428). Editorial Mundi-Prensa. ISBN: 84-8476-247-5.
- Chumakov, M.I. & Mazilov, S.I. (2022). Genetic control of maize gynogenesis. *Russian Journal of Genetics*, 58 (4), 384–392, <https://doi.org/10.1134/S1022795422040044>
- Contant, R.B., Devreux, M., Ecochard, R.M., Monti, L.M., De Nettancourt, D., Scarascia M., G.T. & Verkerk, K. (1971). Radiogenetic effects of gamma- and fast neutron irradiation on different ontogenetic stages of the tomato. *Radiation Botany*, 11 (2), 119-136. [https://doi.org/10.1016/S0033-7560\(71\)90653-3](https://doi.org/10.1016/S0033-7560(71)90653-3).
- Domblides E.A., Shmykova N.A., Belov S.N., Korottseva I.B. & Soldatenko, A.V (2019). DH-plant production in culture of unpollinated ovules of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Vegetable crops of Russia*, 6, 3-9. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2019-6-3-9>
- Dong, YQ., Zhao, WX., Li, XH., Liu, XC., Gao, NN., Huang, JH., Wang, WY., Xu, XL. & Tang, ZH. (2016). Androgenesis, gynogenesis, and parthenogenesis haploids in cucurbit species. *Plant Cell Reports*, 35, 1991–2019. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2018-7>
- Drumeva, M., Berville, A., Ivanov, P., Nenova, N. & Encheva, J. (2005). Molecular investigations on the doubled haploid origin of sunflower lines (*Helianthus annuus* L.) developed through gamma-induced parthenogenesis. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 19 (3), 46-50, <https://doi.org/10.1080/13102818.2005.10817226>

El-Mahrouk, M. E., Maamoun, M. K., EL-Banna, A. N., Omran, S. A., Dewir, Y. H., & El-Hendawy, S. (2018). *In vitro* gynogenesis and flow cytometry analysis of the regenerated haploids of black cumin (*Nigella sativa*), *HortScience*, 53 (5), 681-686. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI12877-18>

Ermolaev A.S. & Domblides, E.A (2022). Optimization of steps in the technology of obtaining doubled haploids of summer squash (*Cucurbita pepo* L.) in the culture of unpollinated ovules *in vitro*. *Vegetable crops of Russia*, 5, 5-14, <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2022-5-5-14>

Food and Agriculture Data (FaoStat). (2022). Crops and livestock products Available online: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (accessed on 3 November 2022).

Fayos, O, Vallés, M.P., Garcés-Claver, A., Mallor, C. & Castillo, A.M. (2015). Doubled haploid production from Spanish onion (*Allium cepa* L.) germplasm: embryogenesis induction, plant regeneration and chromosome doubling. *Frontiers in Plant Sciences*, 6, 384. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00384>

Germana, M.A. (2012). Use of irradiated pollen to induce parthenogenesis and haploid production in fruit crops. In Q.Y. Shu, B.P. Forster & H. Nakagawa (Eds.) *Plant mutation breeding and biotechnology* (pp. 411-421) CAB International and FAO. ISBN: 978-178064-085-3.

Godbole, M. & Murthy, H.N (2012). Parthenogenetic haploid plants using gamma irradiated pollen in snapmelon (*Cucumis melo* var. *momordica*). *Plant Cell, and Tissue Organ Culture*, 109, 167–170. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0066-9>

Grubska, L., Gudkov, I., Klepko, A. & Andreychenko, S. (2018). Analysis of growing and fertilizing properties of *Nicotiana glauca* gamma-irradiated pollen. *Biological Systems: Theory and Innovation*, 287, 192-200. <http://dx.doi.org/10.31548/biologiya2018.287.192>

Hazarika, R., Mishra, V. & Chaturvedi, R. (2013). *In vitro* haploid production—a fast and reliable approach for crop improvement. In N. Tuteja & S. Gill (Eds.) *Crop improvement under adverse conditions* (pp. 171-212). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4633-0_8

Hooghvorst, I. & Nogués, S. (2021). Chromosome doubling methods in doubled haploid and haploid inducer-mediated genome-editing systems in major crops. *Plant Cell Reports*, 40, 255–270. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02605-0>

Hosseini G., M. S., Vahdati, K., Lotfi, M., Hassani, D. & Biranvand, N.P. (2011). Production of haploids in persian walnut through parthenogenesis induced by gamma-irradiated pollen. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 136 (3), 198-204, <https://doi.org/10.21273/JASHS.136.3.198>

Heidmann I., Schade-Kampmann G., Lambalk J., Ottiger M. & Di Berardino, M. (2016). Impedance flow cytometry: a novel technique in pollen analysis. *PLOS ONE*, 11 (11), e0165531. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165531>.

- Jacquier, N.M.A., Gilles, L.M., Pyott, D.E., Martinant, J.-P., Rogowsky, P.M. & Widiez, T. (2020). Puzzling out plant reproduction by haploid induction for innovations in plant breeding. *Nature Plants*, 6, 610–619. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0664-9>
- Khan, T.A., Fariduddin, Q. & Yusuf, M. (2015). *Lycopersicon esculentum* under low temperature stress: an approach toward enhanced antioxidants and yield. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 14178–14188. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4658-5>
- Kimura, S., & Sinha, N. (2008). Crossing tomato plants. Cold Spring Harbor protocols, pdb.prot5082. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5082>
- Kolesnikova, E. O., Donskikh, E. I., & Berdnikov, R.V (2021). Haploid biotechnology as a tool for creating a selection material for sugar beets. *Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii*, 25 (8), 812–821. <https://doi.org/10.18699/VJ21.094>
- Košmrlj, K., Murovec, J., & Bohanec, B. (2013). Haploid induction in hull-less seed pumpkin through parthenogenesis induced by x-ray-irradiated pollen. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 138 (4), 310-316. <https://doi.org/10.21273/JASHS.138.4.310>
- Kurtar, E. S., Seymen, M. & Kal, Ü. (2020). An overview of doubled haploid plant production in *Cucurbita* species. *YYU Journal of Agricultural Sciences*, 30, 510-520, <https://doi.org/10.29133/yyutbd.741087>
- Kundu, M. & Dubey, A. (2017). Effect of γ -ray irradiated pollen technique on fruit growth in *Citrus*. *Journal of Applied Horticulture*, 19 (2), 143-146. <https://doi.org/10.37855/jah.2017.v19i02.26>
- Kundu M. & Dubey, A. (2020). Effect of gamma ray irradiated pollen technique on seed development pattern in *Citrus*. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 80 (4), 450-458. <https://doi.org/10.31742/IJGPB.80.4.11>
- Lagoda, P.J.L. (2012). Effects of radiation on living cells and plants. In Q.Y. Shu, B.P. Forster & H. Nakagawa (Eds.) *Plant mutation breeding and biotechnology* (pp. 387-410) CAB International and FAO. ISBN: 978-178064-085-3
- Lim, W. & Earle, E.D (2008). Effect of *in vitro* and *in vivo* colchicine treatments on pollen production and fruit set of melon plants obtained by pollination with irradiated pollen. *Plant Cell, and Tissue Organ Culture*, 95, 115–124. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9422-9>
- Madhuita, B. & Padmaja, G. (2015). Zpollen γ -ray irradiation: a novel technique in mulberry (*Morus indica* L.) breeding. *International. Journal of Science, Technology & Management*, 4 (1), 624-635. <https://doi.org/10.3199/iscb.8.31>.
- Marin-Montes, I.M., Rodríguez-Pérez, J.E., Robledo-Paz, A., de la Cruz-Torres, E., Peña-Lomelí, A. & Sahagún-Castellanos, J. (2022). Haploid induction in

tomato (*Solanum lycopersicum* L.) via gynogenesis. *Plants*, 11, 1595. <https://doi.org/10.3390/plants11121595>

Nishiyama, I. & Tsukuda, S. (1959). Radiobiological studies in plant, I. Effects of X-rays upon pollen germination and fertility. *The Japanese Journal of Genetics*, 34, 363–370. <https://doi.org/10.1266/jjg.34.363>

Nishiyama, I. & Tsukuda, S. (1961). Effects of X- and gamma-irradiations on pollen fertility of *Lycopersicum pimpinellifolium*. *The Japanese Journal of Genetics*, 36 (11), 423-427. <https://doi.org/10.1266/jjg.36.423>.

Pandey, S. & Kumar, G. (2013) Hazardous effect of gamma-rays on *in vitro* pollen germination and pollen tube growth in *Linum usitatissimum* L. *Chromosome Botany*, 8 (2), 31-34. <https://doi.org/10.3199/iscb.8.31>.

Peixe, A., Camposa, M.D., Cavaleiroa, C., Barrosoa, J. & Paisb, M.S. (2000). Gamma-irradiated pollen induces the formation of 2n endosperm and abnormal embryo development in European plum (*Prunus domestica* L., cv. “Rainha Cláudia Verde”). *Scientia Horticulturae*, 86 (4), 267-278, [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(00\)00156-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(00)00156-4).

Piosik, Ł., Zenkteler, E. & Zenkteler, M. (2016). Development of haploid embryos and plants of *Lactuca sativa* induced by distant pollination with *Helianthus annuus* and *H. tuberosus*. *Euphytica*, 208, 439–451. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1578-x>

Rajcan, I., Boersma, J.G., & Shaw, E.J. (2011). Plant genetic techniques: plant breeder’s toolbox. In M. Moo-Young (Ed.) *Comprehensive biotechnology* (pp:133-147), Elsevier B.V. ISBN: 978-0-08-088504-9.

Sauton, A. (1988). Effect of season and genotype on gynogenetic haploid production in muskmelon (*Cucumis melo* L.) *Scientia Horticulturae*, 35 (1–2), 71-75. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(88\)90038-6](https://doi.org/10.1016/0304-4238(88)90038-6)

Seguí-Simarro, J.M., Jacquier, N.M.A. & Widiez, T. (2021). Overview of *in vitro* and *in vivo* doubled haploid technologies. In J.M. Seguí-Simarro (Ed.) *Doubled haploid technology. Methods in molecular biology* (pp: 3-22), Humana. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1315-3_1

Stephan, O.O.H. (2021). Implications of ionizing radiation on pollen performance in comparison with diverse models of polar cell growth. *Plant, Cell & Environment*, 44 (3), 665– 691. <https://doi.org/10.1111/pce.13929>

Song, J., Nada, K. & Tachibana, S. (2001). The early increase of S-adenosylmethionine decarboxylase activity is essential for the normal germination and tube growth in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pollen, *Plant Science*, 161 (3), 507-515. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00435-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00435-6).

Szarejko, I (2012). Haploid mutagenesis. In Q.Y. Shu, B.P. Forster & H. Nakagawa (Eds.) Plant mutation breeding and biotechnology (pp. 387-410) CAB International and FAO. ISBN: 978-178064-085-3

Tel-Zur, N. (2022) Breeding an underutilized fruit crop: a long-term program for *Hylocereus*. *Horticulture Research*, 9, uhac078. <https://doi.org/10.1093/hr/uhac078>

Todorova, M., Ivanov, P., Nenova, N. & Encheva, J. (2004). Effect of female genotype on the efficiency of γ -induced parthenogenesis in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *HELIA*, 27 (41), 67-74. <https://doi.org/10.2298/hel0441067t>

Underwood, C.J., Vijverberg, K., Rigola, D., Okamoto, S., Oplaat, C., Op den Camp, R. H. M., Radoeva, T., Schauer, S. E., Fierens, J., Jansen, K., Mansveld, S., Busscher, M., Xiong, W., Datema, E., Nijbroek, K., Blom, E.-J., Bicknell, R., Catanach, A., Erasmuson, S., Winefield, C., van Tunen, A. J., Prins, M., Schranz, M. E. & van Dijk, P. J. (2022). A PARTHENOGENESIS allele from apomictic dandelion can induce egg cell division without fertilization in lettuce. *Nature Genetics*, 54, 84–93. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00984-y>

Vitsenia, T., & Sergiyenko, O. (2015). Regeneration of plants from gynogenetic carrot calluses. *Agricultural Science and Practice*, 2 (3), 49-54. <https://doi.org/10.15407/agrisp2.03.049>

Yan, G., Liu, H., Wang, H., Lu, Z., Wang, Y., Mullan, D., Hamblin, J. & Liu, C. (2017). Accelerated generation of selfed pure line plants for gene identification and crop breeding. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1786. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01786>

Yang, Z. Li, Y., Li, P., Zhang, F. & Thomas, B. W. (2016). Effect of difference between day and night temperature on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) root activity and low molecular weight organic acid secretion. *Soil Science and Plant Nutrition*, 62, 423-431. <https://doi.org/10.1080/00380768.2016.1224449>

Zayachkovskaya, T., Domblides, E., Zayachkovsky, V., Kan, L., Domblides, A., & Soldatenko, A. (2021). Production of gynogenic plants of red beet (*Beta vulgaris* L.) in unpollinated ovule culture *in vitro*. *Plants*, 10 (12), 2703. <http://dx.doi.org/10.3390/plants10122703>

Zargar, M., Zavarykina, T., Voronov, S., Pronina, I., & Bayat, M. (2022). The recent development in technologies for attaining doubled haploid plants *in vivo*. *Agriculture*, 12 (10), 1595. <https://doi.org/10.3390/agriculture12101595>

Zhu, Y., Sun, D., Deng, Y., Li, W., An, G., Si, W., Gao, P. & Liu, J. (2019). Regeneration of double haploid plants from unpollinated ovary cultures of watermelon, <https://doi.org/10.21203/rs.2.14098/v1>

Zhong, Y., Chen, B., Wang, D., Zhu, X., Li, M., Zhang, J., Chen, M., Wang, M., Riksen, T., Liu, J., Qi, X., Wang, Y., Cheng, D., Liu, Z., Li, J., Chen, C., Jiao, Y., Liu, W., Huang, S., Liu, C., Boutilier, K. & Chen, S. (2022). *In vivo* maternal haploid

induction in tomato. *Plant Biotechnology Journal*, 20, 250–252,
<https://doi.org/10.1111/pbi.13755>

CAPÍTULO V

5.2 DISCUSIÓN GENERAL

La obtención de líneas dobles haploides es una de las principales técnicas para acelerar el mejoramiento genético vegetal. Sin embargo, la presencia de genotipos haploides en la naturaleza es escasa (Forster et al., 2007) lo que obliga a desarrollar metodologías que incrementen la frecuencia de individuos haploides que, mediante un agente químico dupliquen su número cromosómico para alcanzar 100 % de homocigosis (Shariatpanahi, Niazian & Ahmadi, 2021). La técnica más empleada a nivel mundial es androgénesis por su facilidad y buenos resultados en distintas especies; no obstante, en tomate su uso no es posible debido a su recalcitrancia hacia el cultivo *in vitro* de anteras (Seguí-Simarro, 2016), por lo cual es necesario emplear otra metodología (Marin-Montes et al., 2022).

La principal alternativa para inducir haploidía es la ginogénesis que, aun cuando su porcentaje de éxito es bajo, es la única opción viable en especies recalcitrantes, donde la inducción de partenogénesis con polen irradiado, complementada con rescate *in vitro* de embriones inmaduros, es la mejor técnica para obtener haploides (Asif, 2013). Para desarrollar esta metodología se requiere determinar la dosis letal 50 (DL₅₀), el efecto de la radiación sobre polen y el nivel de radiación adecuado que permita desarrollar embriones haploides (Kundu & Dubey, 2020).

Al respecto, la presente investigación determinó que la capacidad germinativa del polen y la formación de embriones a partir de polen se reducen 50 % con 95 y 53 Gy, respectivamente; y que el uso de dosis altas (> 95 Gy) podría inducir semillas con embriones haploides. En este sentido, al tratar polen con dosis de 160, 180, 200 y 220 Gy de rayos gamma se determinó que el polen irradiado promueve el aborto del embrión antes de 14 DDP, pero es posible producir frutos maduros con 54.17 % de amarre de frutos normales (< 45 g), donde se generan pocas semillas con embrión que son capaces de formar plantas normales en condiciones *in vitro*.

El segundo factor que afecta el éxito de ginogénesis con polen irradiado es el ambiente de desarrollo de ambos progenitores (Dong et al., 2016). Así, a partir de los resultados obtenidos en el presente estudio se observó una respuesta mejor en formación de semillas y tamaño de frutos con polen irradiado cuando los genotipos empleado se desarrollan en condiciones de primavera-verano, con temperatura promedio al menos de 20 ° C. Además, es recomendable emplear los racimos formados antes de 70 DDT porque las plantas tienen mejor sanidad y poseen mayor vigor para producción de frutos y semillas producidas con polen irradiado, esto asegura respuesta favorable al inducir partenogénesis con polen irradiado.

En los resultados obtenidos se incluye el primer reporte de obtención de frutos y semillas maduras mediante pseudopolinización con polen irradiado tratado a dosis altas. Al respecto, la literatura consultada indica la caída de los frutos en etapas tempranas de desarrollo (Bal & Abak, 2007; Marin-Montes et al., 2022). Además, la formación de semillas fue aleatoria debido a que en todas las oportunidades de polinización la presencia de semillas normales fue distinta. Esto sugiere el uso de tamaños de muestra grandes para incrementar la probabilidad de obtener semilla haploide. También, es necesario continuar con el estudio sobre este tema para determinar si las semillas y plantas obtenidas son haploides para en su caso, proceder a la fase de duplicación de material cromosómico y generar líneas dobles haploides.

5.3 Literatura consultada

Asif M. (2013). Progress and Opportunities of Doubled Haploid Production, Springer International Publishing. ISBN: 978-3-319-00732-8.

Bal, U. & Abak, K. (2007). Haploidy in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): a critical review. *Euphytica*, 158, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9427-1>

Dong, YQ., Zhao, WX., Li, XH., Liu, XC., Gao, NN., Huang, JH., Wang, WY., Xu, XL. & Tang, ZH. (2016). Androgenesis, gynogenesis, and parthenogenesis haploids in cucurbit species. *Plant Cell Reports*, 35, 1991–2019. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2018-7>

Forster, B.P., Heberle-Bors, E., Kasha, K. J. & Touraev, A. (2007). The resurgence of haploids in higher plants. *TRENDS in Plant Science*, 12(8), 1360–1375. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.06.007>

Kundu M. & Dubey, A. (2020). Effect of gamma ray irradiated pollen technique on seed development pattern in *Citrus*. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 80 (4), 450-458. <https://doi.org/10.31742/IJGPB.80.4.11>

Marin-Montes, I.M., Rodríguez-Pérez, J.E., Robledo-Paz, A., de la Cruz-Torres, E., Peña-Lomelí, A. & Sahagún-Castellanos, J. (2022). Haploid induction in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) via gynogenesis. *Plants*, 11, 1595. <https://doi.org/10.3390/plants11121595>

Seguí-Simarro, J.M. (2016). Androgenesis in Solanaceae. In M. Germana, & M. Lambardi (Eds.). *In vitro embryogenesis in higher plants. methods in molecular biology* (pp. 209-244). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_9

Shariatpanahi, M.E., Niazian, M. & B. Ahmadi (2021). Methods for chromosome doubling. In J. M. Segui-Simarro (Ed.) *Doubled haploid technology. Methods in molecular biology* (pp. 127-148), Humana. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1315-3_5

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES GENERALES

La ginogénesis con polen irradiado en tomate es una vía potencial para la inducción de haploidía materna; sin embargo, antes de ser empleada como alternativa en dobles haploides es necesario determinar la radiosensibilidad del polen, las condiciones ambientales de desarrollo de ambos progenitores, el efecto del genotipo donador de polen y progenitor hembra, la etapa adecuada para el rescate y cultivo *in vitro* de embriones para obtener un protocolo eficiente para generar plantas haploides.

La radiación gamma afecta el material genético en granos de polen. Los efectos observados están asociados con el nivel de irradiación. Al tratar polen normal con dosis altas (< 95 Gy) la formación de semillas con embriones es casi nula y aleatoria; así, la cantidad de semillas sin embrión y con endospermo inmaduro aumenta. En cambio, con dosis bajas (< 45 Gy) la generación de semillas es igual a la del testigo sin radiación, lo cual significa que el material genético no fue inactivado por completo y que la inducción de ginogénesis solo es posible si se emplean dosis altas de irradiación.

Es recomendable emplear las primeras etapas de desarrollo del cultivo de tomate, y que sean desarrolladas con temperaturas promedio superiores a 20 ° C, porque las plantas muestran mejor estado fisiológico y sanidad, que se traduce en mayor porcentaje de amarre de frutos normales y mayor producción de semillas con embrión en todos los niveles de radiación evaluados.