

VOL IX

Estudos em Ciências Agrárias e Ambientais

Eduardo Spers
(Organizador)



EDITORA
ARTEMIS

2026

VOL IX

Estudos em Ciências Agrárias e Ambientais

Eduardo Spers
(Organizador)



EDITORA
ARTEMIS

2026



O conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons Atribuição-Não-Comercial NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0). Direitos para esta edição cedidos à Editora Artemis pelos autores.

Permitido o download da obra e o compartilhamento, desde que sejam atribuídos créditos aos autores, e sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

A responsabilidade pelo conteúdo dos artigos e seus dados, em sua forma, correção e confiabilidade é exclusiva dos autores. A Editora Artemis, em seu compromisso de manter e aperfeiçoar a qualidade e confiabilidade dos trabalhos que publica, **conduz a avaliação cega pelos pares de todos manuscritos publicados, com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.**

Editora Chefe	Prof. ^a Dr. ^a Antonella Carvalho de Oliveira
Editora Executiva	M. ^a Viviane Carvalho Mocellin
Direção de Arte	M. ^a Bruna Bejarano
Diagramação	Elisangela Abreu
Organizador	Prof. Dr. Eduardo Eugênio Spers
Imagem da Capa	Bruna Bejarano, Arquivo Pessoal
Bibliotecário	Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

Conselho Editorial

Prof.^a Dr.^a Ada Esther Portero Ricol, *Universidad Tecnológica de La Habana “José Antonio Echeverría”*, Cuba
Prof. Dr. Adalberto de Paula Paranhos, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil
Prof. Dr. Agustín Olmos Cruz, *Universidad Autónoma del Estado de México*, México
Prof.^a Dr.^a Amanda Ramalho de Freitas Brito, Universidade Federal da Paraíba, Brasil
Prof.^a Dr.^a Ana Clara Monteverde, *Universidad de Buenos Aires*, Argentina
Prof.^a Dr.^a Ana Júlia Viamonte, Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), Portugal
Prof. Dr. Ángel Mujica Sánchez, *Universidad Nacional del Altiplano*, Peru
Prof.^a Dr.^a Angela Ester Mallmann Centenaro, Universidade do Estado de Mato Grosso, Brasil
Prof.^a Dr.^a Begoña Blandón González, *Universidad de Sevilla*, Espanha
Prof.^a Dr.^a Carmen Pimentel, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil
Prof.^a Dr.^a Catarina Castro, Universidade Nova de Lisboa, Portugal
Prof.^a Dr.^a Cirila Cervera Delgado, *Universidad de Guanajuato*, México
Prof.^a Dr.^a Cláudia Neves, Universidade Aberta de Portugal
Prof.^a Dr.^a Cláudia Padovesi Fonseca, Universidade de Brasília-DF, Brasil
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos, Universidade Federal da Grande Dourados, Brasil
Dr. Cristo Ernesto Yáñez León – New Jersey Institute of Technology, Newark, NJ, Estados Unidos
Prof. Dr. David García-Martul, *Universidad Rey Juan Carlos de Madrid*, Espanha



Prof.^a Dr.^a Deuzimar Costa Serra, Universidade Estadual do Maranhão, Brasil

Prof.^a Dr.^a Dina Maria Martins Ferreira, Universidade Estadual do Ceará, Brasil

Prof.^a Dr.^a Edith Luévano-Hipólito, *Universidad Autónoma de Nuevo León*, México

Prof.^a Dr.^a Eduarda Maria Rocha Teles de Castro Coelho, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal

Prof. Dr. Eduardo Eugênio Spers, Universidade de São Paulo (USP), Brasil

Prof. Dr. Eloi Martins Senhoras, Universidade Federal de Roraima, Brasil

Prof.^a Dr.^a Elvira Laura Hernández Carballido, *Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo*, México

Prof.^a Dr.^a Emilias Darlene Carmen Lebus, *Universidad Nacional del Nordeste*, Argentina

Prof.^a Dr.^a Erla Mariela Morales Morgado, *Universidad de Salamanca*, Espanha

Prof. Dr. Ernesto Cristina, *Universidad de la República*, Uruguay

Prof. Dr. Ernesto Ramírez-Briones, *Universidad de Guadalajara*, México

Prof. Dr. Fernando Hitt, *Université du Québec à Montréal*, Canadá

Prof. Dr. Gabriel Díaz Cobos, *Universitat de Barcelona*, Espanha

Prof.^a Dr.^a Gabriela Gonçalves, Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), Portugal

Prof.^a Dr.^a Galina Gumovskaya – Higher School of Economics, Moscow, Russia

Prof. Dr. Geoffroy Roger Pointer Malpass, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Brasil

Prof.^a Dr.^a Gladys Esther Leoz, *Universidad Nacional de San Luis*, Argentina

Prof.^a Dr.^a Glória Beatriz Álvarez, *Universidad de Buenos Aires*, Argentina

Prof. Dr. Gonçalo Poeta Fernandes, Instituto Politécnico da Guarda, Portugal

Prof. Dr. Gustavo Adolfo Juarez, *Universidad Nacional de Catamarca*, Argentina

Prof. Dr. Guillermo Julián González-Pérez, *Universidad de Guadalajara*, México

Prof. Dr. Håkan Karlsson, *University of Gothenburg*, Suécia

Prof.^a Dr.^a Iara Lúcia Tescarollo Dias, Universidade São Francisco, Brasil

Prof.^a Dr.^a Isabel del Rosario Chiyon Carrasco, *Universidad de Piura*, Peru

Prof.^a Dr.^a Isabel Yohena, *Universidad de Buenos Aires*, Argentina

Prof. Dr. Ivan Amaro, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

Prof. Dr. Iván Ramon Sánchez Soto, *Universidad del Bío-Bío*, Chile

Prof.^a Dr.^a Ivânia Maria Carneiro Vieira, Universidade Federal do Amazonas, Brasil

Prof. Me. Javier Antonio Albornoz, *University of Miami and Miami Dade College*, Estados Unidos

Prof. Dr. Jesús Montero Martínez, *Universidad de Castilla - La Mancha*, Espanha

Prof. Dr. João Manuel Pereira Ramalho Serrano, Universidade de Évora, Portugal

Prof. Dr. Joaquim Júlio Almeida Júnior, UniFIMES - Centro Universitário de Mineiros, Brasil

Prof. Dr. Jorge Ernesto Bartolucci, *Universidad Nacional Autónoma de México*, México

Prof. Dr. José Cortez Godínez, Universidad Autónoma de Baja California, México

Prof. Dr. Juan Carlos Cancino Díaz, Instituto Politécnico Nacional, México

Prof. Dr. Juan Carlos Mosquera Feijoo, *Universidad Politécnica de Madrid*, Espanha

Prof. Dr. Juan Diego Parra Valencia, *Instituto Tecnológico Metropolitano de Medellín*, Colômbia

Prof. Dr. Juan Manuel Sánchez-Yáñez, *Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, México

Prof. Dr. Juan Porras Pulido, *Universidad Nacional Autónoma de México*, México

Prof. Dr. Júlio César Ribeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil



Prof. Dr. Leinig Antonio Perazolli, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil

Prof.^a Dr.^a Livia do Carmo, Universidade Federal de Goiás, Brasil

Prof.^a Dr.^a Luciane Spanhol Bordignon, Universidade de Passo Fundo, Brasil

Prof. Dr. Luis Fernando González Beltrán, *Universidad Nacional Autónoma de México*, México

Prof. Dr. Luis Vicente Amador Muñoz, *Universidad Pablo de Olavide*, Espanha

Prof.^a Dr.^a Macarena Esteban Ibáñez, *Universidad Pablo de Olavide*, Espanha

Prof. Dr. Manuel Ramiro Rodriguez, *Universidad Santiago de Compostela*, Espanha

Prof. Dr. Manuel Simões, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Portugal

Prof.^a Dr.^a Márcia de Souza Luz Freitas, Universidade Federal de Itajubá, Brasil

Prof. Dr. Marcos Vinicius Meiado, Universidade Federal de Sergipe, Brasil

Prof.^a Dr.^a Mar Garrido Román, *Universidad de Granada*, Espanha

Prof.^a Dr.^a Margarida Márcia Fernandes Lima, Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil

Prof.^a Dr.^a María Alejandra Arecco, *Universidad de Buenos Aires*, Argentina

Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida José de Oliveira, Universidade Federal da Bahia, Brasil

Prof.^a Dr.^a Maria Carmen Pastor, *Universitat Jaume I*, Espanha

Prof.^a Dr.^a Maria da Luz Vale Dias – Universidade de Coimbra, Portugal

Prof.^a Dr.^a Maria do Céu Caetano, Universidade Nova de Lisboa, Portugal

Prof.^a Dr.^a Maria do Socorro Saraiva Pinheiro, Universidade Federal do Maranhão, Brasil

Prof.^a Dr.^a M^aGraça Pereira, Universidade do Minho, Portugal

Prof.^a Dr.^a Maria Gracinda Carvalho Teixeira, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil

Prof.^a Dr.^a María Guadalupe Vega-López, *Universidad de Guadalajara*, México

Prof.^a Dr.^a Maria Lúcia Pato, Instituto Politécnico de Viseu, Portugal

Prof.^a Dr.^a Maritza González Moreno, *Universidad Tecnológica de La Habana*, Cuba

Prof.^a Dr.^a Mauriceia Silva de Paula Vieira, Universidade Federal de Lavras, Brasil

Prof. Dr. Melchor Gómez Pérez, Universidad del Pais Vasco, Espanha

Prof.^a Dr.^a Ninfa María Rosas-García, Centro de Biotecnología Genómica-Instituto Politécnico Nacional, México

Prof.^a Dr.^a Odara Horta Boscolo, Universidade Federal Fluminense, Brasil

Prof. Dr. Osbaldo Turpo-Gebera, *Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa*, Peru

Prof.^a Dr.^a Patrícia Vasconcelos Almeida, Universidade Federal de Lavras, Brasil

Prof.^a Dr.^a Paula Arcoverde Cavalcanti, Universidade do Estado da Bahia, Brasil

Prof. Dr. Rodrigo Marques de Almeida Guerra, Universidade Federal do Pará, Brasil

Prof. Dr. Saulo Cerqueira de Aguiar Soares, Universidade Federal do Piauí, Brasil

Prof. Dr. Sergio Bitencourt Araújo Barros, Universidade Federal do Piauí, Brasil

Prof. Dr. Sérgio Luiz do Amaral Moretti, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil

Prof.^a Dr.^a Silvia Inés del Valle Navarro, *Universidad Nacional de Catamarca*, Argentina

Prof.^a Dr.^a Solange Kazumi Sakata, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN)- USP, Brasil

Prof.^a Dr.^a Stanislava Kashtanova, *Saint Petersburg State University*, Russia

Prof.^a Dr.^a Susana Álvarez Otero – Universidad de Oviedo, Espanha

Prof.^a Dr.^a Teresa Cardoso, Universidade Aberta de Portugal

Prof.^a Dr.^a Teresa Monteiro Seixas, Universidade do Porto, Portugal

Prof. Dr. Valter Machado da Fonseca, Universidade Federal de Viçosa, Brasil

Prof.^a Dr.^a Vanessa Bordin Viera, Universidade Federal de Campina Grande, Brasil

Prof.^a Dr.^a Vera Lúcia Vasilévski dos Santos Araújo, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil

Prof. Dr. Wilson Noé Garcés Aguilar, *Corporación Universitaria Autónoma del Cauca*, Colômbia

Prof. Dr. Xosé Somoza Medina, *Universidad de León*, Espanha

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

E82 Estudos em Ciências Agrárias e Ambientais IX [livro eletrônico] / Organizador Eduardo Eugênio Spers. – 1. ed. – Curitiba, PR: Editora Artemis, 2026.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Edição bilíngue.

Inclui bibliografia.

ISBN 978-65-82858-34-5

DOI 10.37572/EdArt_250926345

1. Ciências agrárias. 2. Ciências ambientais. 3. Agricultura
– Pesquisa. I. Spers, Eduardo Eugênio.

CDD 630

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422



PRÓLOGO

A produção agropecuária contemporânea depende de uma compreensão cada vez mais precisa das relações entre organismos, ambiente, manejo, nutrição e tecnologia. O desenvolvimento de sistemas produtivos mais eficientes exige não apenas aumentar rendimentos, mas compreender os mecanismos fisiológicos que condicionam a adaptação das plantas, aprofundar o conhecimento sobre os fatores relacionados à ocorrência de pragas e doenças, aprimorar a nutrição animal e incorporar práticas capazes de favorecer o bem-estar, a reprodução e a saúde dos animais.

O nono volume de ***Estudos em Ciências Agrárias e Ambientais*** reúne quatorze capítulos organizados em três eixos temáticos: **Produção vegetal, fisiologia e adaptação; Sanidade vegetal e manejo de pragas e doenças; e Produção, nutrição, bem-estar e saúde animal**. Essa organização acompanha diferentes dimensões da produção agropecuária, partindo das respostas fisiológicas e produtivas das plantas, passando pelos fatores que afetam sua sanidade e chegando aos processos relacionados à produção animal.

O primeiro eixo reúne investigações sobre produção vegetal, adaptação e respostas fisiológicas diante de diferentes condições de cultivo e fatores ambientais. A interação entre genótipos de milho e ambientes de produção evidencia a importância de compreender a estabilidade e a adaptabilidade dos materiais vegetais diante de diferentes condições de semeadura e disponibilidade hídrica. Outros estudos analisam os efeitos do estresse salino em oliveiras, as respostas fisiológicas de *Zinnia elegans* cultivada em sistema hidropônico e as alterações fenotípicas e fitoquímicas de *Agave salmiana* submetido ao estresse por zinco. O eixo contempla ainda a aplicação da técnica in vitro de duplo-haploide como estratégia para acelerar a obtenção de linhagens homozigóticas e apoiar o melhoramento de plantas cultivadas. Em conjunto, esses estudos evidenciam como fatores ambientais, nutricionais, fisiológicos e biotecnológicos podem contribuir para a compreensão e o aprimoramento da produção vegetal.

O segundo eixo concentra-se na sanidade vegetal e no manejo de pragas e doenças. O controle microbiológico da broca-do-café por meio de *Beauveria bassiana* exemplifica a aplicação de agentes biológicos no manejo fitossanitário. O estudo epidemiológico do manchado de cálice de jamaica investiga as relações entre patógenos, condições climáticas e severidade da doença, enquanto a análise da abundância de *Oebalus spp.* em cultivos de arroz relaciona dinâmica populacional, temperatura e monitoramento como suporte ao manejo integrado de pragas. Esses trabalhos evidenciam a importância de conhecer tanto os agentes causadores de danos quanto as condições ambientais que favorecem sua ocorrência.

O terceiro eixo amplia o olhar para a produção animal, reunindo estudos sobre nutrição, metabolismo, desempenho produtivo, bem-estar, reprodução e saúde. As pesquisas sobre absorção e retenção de fósforo em ovinos e sobre a utilização de fontes gluconeogênicas diante do estresse térmico abordam processos metabólicos associados à eficiência nutricional e à adaptação dos animais. A utilização de cúrcuma na alimentação de cuyes é investigada como alternativa para melhorar o desempenho produtivo, enquanto o estudo realizado com galinhas poedeiras compara sistemas de criação a partir de indicadores de bem-estar animal.

O eixo também incorpora abordagens relacionadas à biotecnologia reprodutiva e à medicina veterinária. A avaliação de um diluidor quimicamente definido, originalmente desenvolvido para sêmen equino, na conservação refrigerada de sêmen caprino evidencia o potencial das tecnologias reprodutivas para o aprimoramento dos programas de inseminação artificial e a conservação de recursos zoogenéticos. Já o estudo clínico e *post mortem* de *Coendou rufescens* amplia o escopo do volume ao campo da medicina de fauna silvestre, demonstrando a relevância do diagnóstico clínico e anatomopatológico também para espécies não domésticas.

Os capítulos que compõem este volume evidenciam a diversidade de fatores biológicos, ambientais e tecnológicos que interferem na produção vegetal e animal. Ao reunir pesquisas experimentais, revisões e estudos aplicados provenientes de diferentes contextos, Estudos em Ciências Agrárias e Ambientais IX oferece um panorama de diferentes frentes de investigação, desde as respostas fisiológicas das plantas e os desafios fitossanitários até a nutrição, o bem-estar, a reprodução e a saúde animal. Essa diversidade reafirma a importância da produção científica para a compreensão dos processos que sustentam os sistemas agropecuários e para o aprimoramento contínuo das práticas de produção, manejo e conservação.

Boa leitura!

Eduardo Eugênio Spers

SUMÁRIO

PRODUÇÃO VEGETAL, FISIOLOGIA E ADAPTAÇÃO

CAPÍTULO 1..... 1

INTERACCIÓN GENOTIPO - AMBIENTE EN MAÍZ EN EL VALLE DE TOLUCA, MÉXICO

Micaela de la O Olán
Alfredo Josué Gámez Vázquez
Miguel Angel Avila Perches
Francisco Paúl Gámez Vázquez
Mirna Hernández Pérez
Mirna Bobadilla-Meléndez
Juan Francisco Buenrostro Rodríguez
Rocio Edelmira Hernández Caldera



https://doi.org/10.37572/EdArt_2509263451

CAPÍTULO 2..... 16

FOLIAR BEHAVIOR OF OLIVE TREES (*Olea europaea* L.) GRAFTED AND CUT UNDER THE EFFECT OF SALT STRESS

Dhia Gharabi
Maghni Benchohra
Muhammad Arif
Salih Karabörklüb
Teggar Naima
Naceur Benamor
Samira Kacha
Laidia Zerkaoui
Mohamed Abdelhaq Abbes
Boulenouar Houari
Malika Zoubeidi
Imane Derouiche



https://doi.org/10.37572/EdArt_2509263452

CAPÍTULO 3..... 33

COMPONENTES FISIOLÓGICOS DE ZINNIA (*Zinnia elegans* L.) EN HIDROPONÍA BAJO EL MÉTODO KRATKY

Edgar Javier Morales Morales
Itzel Guadalupe Núñez Andrade

Gabriela Berenice Vilchis Granados

Edgar Jesús Morales Rosales

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2509263453

CAPÍTULO 4..... 43

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ESTRÉS POR ZINC EN EL PERFIL FENOTÍPICO Y FITOQUÍMICO DE AGAVE SALMIANA CULTIVADO EN SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL

Jorge Quiroz Casanova

Ian Abigail Estrada Castilla

Ivanna Guillen Barraza

Karla Lizbeth Chávez Rivera

César Armando Puente Garza

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2509263454

CAPÍTULO 5..... 56

MEJORANDO LAS PLANTAS CON LA TÉCNICA IN VITRO DE DOBLE HAPLOIDE (DH)

Lisi Cerna-Rebaza

Eswin Hernandez-Obregón

Luis Gonzales-Llontop

Luis Llenque-Díaz

Julio Chico Ruiz

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2509263455

SANIDADE VEGETAL E MANEJO DE PRAGAS E DOENÇAS

CAPÍTULO 6..... 85

CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LA BROCA DE CAFÉ (*Hypothenemus hampei* (FERRARI) CON *Beauveria bassiana* (BALSAMO) VUILLEMIN

Antonio Gutiérrez-Martínez

Diana Jaren Cruz González

Jesús Antonio Gutiérrez Utrilla

Ramiro Eleazar Ruiz Nájera

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2509263456

CAPÍTULO 7..... 105

EPIDEMIOLOGÍA DEL MANCHADO DE CÁLIZ DE JAMAICA EN GUERRERO

David Heriberto Noriega Cantú

Roció Toledo Aguilar

José Luis Arispe Vázquez

Romualdo Vásquez Ortiz

Régulo Jiménez Guillen

Rafael Ariza Flores

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2509263457

CAPÍTULO 8..... 114

ESTIMACIÓN DE LA ABUNDANCIA DE *Oebalus* spp. (Hemiptera: Pentatomidae) EN CULTIVOS COMERCIALES DE ARROZ DEL LITORAL ECUATORIANO

María Esmeralda Cuzco Cruz

William Eribert Vasquez Ledesma

Luis Damiani Sánchez Campoverde

Eulices Orlando Mendoza Carriel

María Leticia Vivas Vivas

Amalia Marisol Vera Oyague

Nicolás Alberto Vasconcellos Fernández

Fabian Alberto Gordillo Manssur

María Gabriela Delgado Macías

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2509263458

PRODUÇÃO, NUTRIÇÃO, BEM-ESTAR E SAÚDE ANIMAL

CAPÍTULO 9..... 131

ABSORCIÓN Y RETENCIÓN DE FÓSFORO EN CORDEROS SUPLEMENTADOS CON FÓSFORO Y COLECALCIFEROL

Ignacio Mejía Haro

Dennis R. Brink

Iván Mejía Devora

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2509263459

CAPÍTULO 10.....143

FUENTES GLUCONEOGENICAS PARA CONTRARRESTAR LOS EFECTOS DEL ESTRÉS TÉRMICO EN EL BALANCE ENERGÉTICO NEGATIVO EN OVINOS DE PELO

Cinthia Daniela Noriega-Espinoza

Jehieli Hanani Montes-Hernández

Emma Victoria Sánchez-Rivera

Jesús David Urías-Estrada

Elizama Ponce-Barraza

Ana Mireya Romo-Valdez

Jesús José Portillo-Loera

Javier Alonso Romo-Rubio

 https://doi.org/10.37572/EdArt_25092634510

CAPÍTULO 11.....158

EFFECTO DE DIFERENTES NIVELES DE CÚRCUMA (*Curcuma longa*) EN EL DESEMPEÑO PRODUCTIVO DE CUYES (*Cavia porcellus*)

Verónica de los Ángeles Bónifaz Ramos

Ketty Beatriz Murillo Cano

John Javier Arellano Gómez

Yesenia Ivonne Malta García

Silvia Verónica Tinoco Cabrera

María José Salinas Hinojosa

 https://doi.org/10.37572/EdArt_25092634511

CAPÍTULO 12174

BIENESTAR ANIMAL EN GALLINAS PONEDORAS EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN PISO Y PASTOREO EN EL MAGDALENA MEDIO SANTANDEREANO

Yazmin Andrea Calvo Rodríguez

Darwin Antonio García Rojas

Elkin Orlando Romero Cárdenas

Neidy Canchila Roa

Ricci Terraza Martínez

 https://doi.org/10.37572/EdArt_25092634512

CAPÍTULO 13.....187

EVALUATION OF A CHEMICALLY DEFINED EQUINE SEMEN EXTENDER FOR
PROLONGED REFRIGERATED PRESERVATION OF BUCK SEMEN

Elvira Matilla-Pinto

Andreia Agostinho

Gema Vara

Isaac Torrado

Olvido Blanco

Andrés Domingo

Carolina Silva

 https://doi.org/10.37572/EdArt_25092634513

CAPÍTULO 14.....215

PRESENTACIÓN CLÍNICA Y POST MORTEM DE *COENDOU RUFESCENS* CON
PERITONITIS SÉPTICA Y LESIONES MULTIORGÁNICAS

Oscar Daniel Zapata-Zapata

Juliana Jaramillo-Cárdenas

Camilo Muñoz-Collazos

Jesús David Echeverri-López

Viviana Elena Castillo-Vanegas

Laura María Laverde-Trujillo

 https://doi.org/10.37572/EdArt_25092634514

SOBRE O ORGANIZADOR..... 227

ÍNDICE REMISSIVO228

CAPÍTULO 5

MEJORANDO LAS PLANTAS CON LA TÉCNICA IN VITRO DE DOBLE HAPLOIDE (DH)

Data de aceite: 24/09/2026

Lisi Cerna-Rebaza

Laboratorio de Fisiología y
Cultivos Celulares
Universidad Nacional de Trujillo (UNT)
Trujillo, Perú
<https://orcid.org/0000-0001-7654-3464>

Eswin Hernandez-Obregón

Instituto Nacional de Investigación
Agraria (INIA)
Perú
<https://orcid.org/0009-0001-8395-5464>

Luis Gonzales-Llontop

Laboratorio de Biología
Universidad Nacional Toribio
Rodríguez de Mendoza (UNTRM)
Chachapoyas, Perú
<https://orcid.org/0000-0001-7944-2642>

Luis Llenque-Díaz

Laboratorio de Fisiología Bacteriana
Universidad Nacional de Trujillo (UNT)
Trujillo, Perú
<https://orcid.org/0000-0003-1143-7868>

Julio Chico Ruiz¹

Laboratorio de Fisiología y
Cultivos Celulares
Universidad Nacional de Trujillo (UNT)
Trujillo, Perú
<https://orcid.org/0000-0002-7287-321X>

¹ Autor para correspondencia

RESUMEN: La actividad agrícola requiere variedades de cultivos mejoradas con características de calidad, rendimiento y resistencia a estreses ambientales principalmente. El uso de haploides es una estrategia clave para el mejoramiento de las plantas cultivadas, debido a que poseen un único juego de cromosomas en la fase esporofítica, se han convertido en una fuente para seleccionar rasgos deseados o introducir mutaciones en su material genético. Además, se pueden obtener doble haploides (DH) mediante la duplicación cromosómica, ya sea espontánea o inducida, con características de homocigotos en todos los loci y pueden propagarse por semilla. La homocigosis se completa en una sola generación; por el contrario, el método de mejoramiento convencional *in situ* requiere de seis a siete generaciones de autofecundación. La producción **in vitro** de haploides con fines de mejoramiento se ha logrado en numerosos cultivos, como arroz, trigo, cebada, maíz, tomate, papa, brasicáceas, vid y girasol, entre otros. Además, los DH son una fuente para el mapeo génico, la citogenética y los estudios evolutivos.

PALABRAS CLAVE: haploides; doble haploide; mejoramiento vegetal; cultivo in vitro; homocigosis; duplicación cromosómica.

1. INTRODUCCIÓN

La productividad agrícola se ve, frecuentemente, afectada por factores

de estrés abiótico y biótico que provocan una grave reducción en el rendimiento de los cultivos. Por ello, es necesario mejorar los cultivos para una mayor resistencia al estrés biótico y abiótico, una mayor tolerancia a plagas de insectos y herbicidas, un mejor rendimiento y valor nutricional. Antiguamente, los agricultores llevaban a cabo el mejoramiento seleccionando plantas con características deseables para recolectar sus semillas y utilizarlas en siembras posteriores. Desde entonces, se han empleado diversas técnicas de fitomejoramiento para optimizar los cultivos. Con el tiempo, se comenzó a practicar la hibridación dirigida –fitomejoramiento clásico– un proceso en el que se identifican dos plantas progenitoras con rasgos deseables y se cruzan entre sí para generar una nueva variedad que reúna dichas características.

Las leyes de la genética de Mendel y los estudios avanzados de biología molecular revelaron que los genes determinan los rasgos de un organismo. La mayoría de las plantas son diploides ($2n$), es decir, contienen dos juegos de cromosomas. Sin embargo, también son comunes las plantas con tres o más juegos de cromosomas (**poliploides**).

En los últimos años, se ha practicado la introducción de mutaciones en el contenido genético de las plantas mediante el tratamiento con agentes químicos mutagénicos, como el metanosulfonato de etilo (EMS), o mediante radiaciones, como la radiación gamma, seleccionando posteriormente los rasgos deseados. Este método se conoce comúnmente como genética directa (**forward genetics**). Pero, estos mutágenos suelen introducir muchas mutaciones no deseadas y, en ocasiones, resultan perjudiciales para la descendencia. Por ello, la descendencia se cruza con líneas parentales seleccionadas (**retrocruzamiento**) para eliminar las mutaciones no deseadas y obtener **líneas isogénicas** (NIL, por sus siglas en inglés) las cuales son homocigotas para una de las líneas parentales, pero portan la mutación deseada.

En el fitomejoramiento, es necesario obtener líneas homocigotas para fijar los rasgos agronómicos, de modo que no se pierdan las características deseadas obtenidas en el cruce. La **homocigosis** puede lograrse cruzando las plantas consigo mismas (**autopolinización** o **endogamia**) durante varias generaciones; las plantas o líneas obtenidas mediante estos cruces se denominan variedades “**endogámicas**”. Sin embargo, alcanzar la homocigosis requiere varios retrocruzamientos o, al menos, seis generaciones de endogamia. Por tanto, estos procedimientos consumen mucho tiempo y requieren mucha mano de obra. Una técnica más rápida para lograr la homocigosis es el uso de plantas haploides.

Los **haploides** contienen un único juego de cromosomas y, a menudo, poseen rasgos deseables. En las plantas diploides, la presencia del alelo dominante puede

enmascarar dichos rasgos. Además, es necesario producir doble haploides (DH) para su cultivo. Los DH pueden obtenerse de forma espontánea o tratando haploides con colchicina para inducir la duplicación cromosómica. Los DH son totalmente homocigotos en todos los loci y pueden producir semillas mediante recombinación, también alcanzan la homocigosis en una sola generación, con lo cual reduce considerablemente el tiempo necesario para obtener líneas totalmente homocigotas en comparación con el método de mejora convencional explicado anteriormente.

2. TIPOS DE EMBRIOGÉNESIS EN PLANTAS

La condición haploide se presenta de forma natural, pero es poco frecuente y limitado a unas pocas especies. Por ello, la mejora genética requiere la producción *in vitro* y una etapa crítica consiste en seleccionar el tejido haploide en el estadio de desarrollo adecuado y conferirle carácter embriogénico (la capacidad de producir embriones) mediante su cultivo en medios específicos y bajo condiciones de crecimiento apropiadas. En consecuencia, la producción *in vitro* de haploides plantea desafíos y exige conocimientos sobre la embriogénesis.

2.1. EMBRIOGÉNESIS CIGÓTICA

El proceso de formación del embrión a partir del cigoto se define como embriogénesis cigótica. Una planta típica consta de raíces, tallos, hojas y órganos reproductores (flor y fruto), y se denomina esporofito, el cual es diploide ($2n$). Durante el ciclo reproductivo, el esporofito produce gametófitos masculinos y femeninos multicelulares dentro de la flor. Los gametófitos son haploides (n), ya que son el resultado de la división celular meiótica, posteriormente experimentan divisiones mitóticas para producir gametos maduros haploides. El gameto masculino es un grano de polen maduro (espermatozoide) producido por las anteras, mientras que el gameto femenino (saco embrionario) es producido dentro del ovario. La fusión de los gametos masculinos y femeninos genera un cigoto diploide mediante un proceso conocido como fecundación. El cigoto experimenta posteriormente varias divisiones celulares mitóticas para formar el embrión y dar lugar al desarrollo de la semilla. El embrión contenido en la semilla posee todas las características básicas necesarias para generar una planta completa. De este modo, cada planta presenta un ciclo vital caracterizado por la alternancia entre generaciones haploides y diploides.

2.2. EMBRIOGÉNESIS APOMÍCTICA

La apomixis se define como la formación asexual de semillas a partir de los tejidos maternos del óvulo, eludiendo los procesos de meiosis y fecundación, y dando lugar al desarrollo del embrión (Bicknell y Koltunow, 2004).

Existen dos tipos de apomixis en las plantas: esporofítica y gametofítica. En la **apomixis esporofítica**, el embrión se desarrolla directamente a partir de una célula somática no reducida (diploide) del óvulo (p. ej., del tegumento o de la nucela); este fenómeno también se conoce como *embrión adventicio*. En la **apomixis gametofítica**, el embrión se desarrolla a partir de un saco embrionario no reducido. Dicho saco puede originarse a partir de una célula madre de la megaspora que no ha realizado la división reduccional –proceso denominado *diplosporía*– o bien a partir de una célula somática que actúa como espora para producir el saco embrionario, proceso denominado *aposporía*. El saco embrionario no reducido continúa su desarrollo y forma una ovocélula diploide, así como sinérgidas y células antípodas diploides. La ovocélula diploide acaba desarrollándose hasta formar un embrión sin necesidad de fecundación, proceso conocido como *partenogénesis*. Las sinérgidas y las antípodas también pueden formar embriones mediante un proceso llamado *apogamia*. En la apomixis gametofítica, la célula central se desarrolla de forma autónoma para formar un endospermo funcional; sin embargo, en algunas especies la apomixis requiere polinización para iniciar el desarrollo del endospermo, fenómeno denominado *pseudogamia*.

2.3. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Las células vegetales son totipotentes por naturaleza. La totipotencia celular se define como la capacidad de las células vegetales para regenerarse en una planta completa. Por lo tanto, las plantas pueden iniciar la embriogénesis a partir de muchas células somáticas distintas del cigoto –proceso denominado *embriogénesis somática*–, lo que genera descendientes genéticamente idénticos (*propagación clonal*) a la planta madre (salvo que se produzca variación somaclonal). Las plantas poseen una totipotencia celular única que permite cultivar tejidos de casi cualquier parte de la planta para generar un nuevo individuo, una práctica conocida como *cultivo de tejidos vegetales*. La posibilidad de regenerar una planta completa a partir de una sola célula o de unas pocas células no cigóticas fue propuesta por **Gottlieb Haberlandt** (1854–1945) en 1902. En 1958, Frederick C. **Steward** (1904–1993) y sus colegas de la Universidad de Cornell lograron producir plantas a partir de segmentos obtenidos de la raíz principal de zanahoria mediante

técnicas de cultivo de tejidos. Estos pequeños explantos estaban constituidos por células diferenciadas del floema secundario.

2.4. EMBRIOGÉNESIS GAMÉTICA

En condiciones normales, las células gaméticas producen gametos (polen o saco embrionario) a través de la vía gametofítica. Sin embargo, en ciertas etapas, debido a condiciones ambientales desfavorables, las células gaméticas producen directamente embriones o estructuras similares a embriones en lugar de gametos. Estos embriones se desarrollan posteriormente en esporofitos haploides que contienen un único conjunto de cromosomas.

Por lo tanto, los haploides son “un esporofito que contiene un único conjunto de cromosomas ($2n = x$)”. Las plantas haploides son estériles, ya que no pueden experimentar la recombinación meiótica para emparejar sus cromosomas. Por consiguiente, ya no producen semillas y no pueden cultivarse mediante propagación. Sin embargo, esto no limita el uso de haploides en el mejoramiento genético, ya que los haploides duplicados (DH) pueden generarse mediante duplicación cromosómica espontánea o inducida (Burk et al., 1979; Kochhar et al., 1971; Sunderland y Wicks, 1971).

Los DH son fértiles y se propagan por semillas. Además, son completamente homocigotos, en todos los loci, en una generación, lo que acorta el tiempo de mejoramiento y permite una selección fácil y rápida de rasgos agronómicos. En contraste con la producción de líneas homocigotas mediante procedimientos de mejoramiento convencionales que requiere mucho tiempo y mano de obra, ya que exige varias generaciones de retrocruzamiento o autopolinización.

La **embriogénesis gamética** es de dos tipos: embriogénesis androgénica (androgénesis) y embriogénesis ginógena (ginogénesis). En la androgénesis, una célula gamética masculina (microspora) produce embriones directamente, en lugar de diferenciarse en granos de polen o gametos maduros a través de una vía gametofítica. Es posible la formación de un callo previamente en este caso se llama embriogénesis indirecta (Touraev et al., 1997).

La embriogénesis ginogénica (ginogénesis) consiste en la producción de embriones exclusivamente a partir de un gametofito femenino (óvulos, óvulos unidos a la placenta, ovarios o botones florales completos).

3. ASPECTOS CELULARES DE LA ANDROGÉNESIS

Durante el desarrollo normal del polen, la célula madre del polen (**CMP**) experimenta meiosis para producir cuatro microsporas haploides (**microesporogénesis**).

Las microsporas son uninucleadas (poseen un solo núcleo) y contienen una gran vacuola. Las microsporas experimentan una división asimétrica (mitosis de la microspora) que da lugar a una célula **generativa** pequeña y a una célula **vegetativa** grande; este producto bicelular se denomina **polen**. La célula **generativa dentro del polen joven se divide nuevamente (segunda mitosis) para producir dos células espermáticas**, mientras que la célula vegetativa se detiene en la fase G1 del ciclo celular y cesa su división. En esta etapa, el grano de polen acumula gránulos de almidón y otros productos de reserva hasta alcanzar su tamaño completo (Bedinger, 1992; Gresshoff y Doy, 1972; Maraschin et al., 2005; McCormick, 1993). Por tanto, el polen en esta etapa es una célula gametofítica altamente diferenciada y está listo para participar en el proceso de reproducción sexual.

En algunos casos, las microsporas producen embriones de forma asexual; estos embriones se denominan embriones androgénicos y el proceso se conoce como embriogénesis androgénica. Así, el embrión androgénico resulta de una reprogramación completa del desarrollo gametofítico normal de la microspora hacia un crecimiento esporofítico. Diversas evidencias experimentales sugieren que la transición entre la microesporogénesis y la microgametogénesis es un punto crítico para determinar la vía de desarrollo, ya que una alteración en la primera mitosis (mitosis de la microspora) basta para desviar la microspora hacia la vía esporofítica y producir embriones en lugar de polen. Existen tres fases superpuestas durante el mecanismo de acción de la androgénesis (Maraschin et al., 2005):

Fase I: Adquisición del potencial embriogénico. Esta fase conlleva la represión de la capacidad de la célula agamética para participar en el desarrollo gametofítico y conduce a la desdiferenciación celular para adquirir capacidad androgénica. Diversos factores fisiológicos y ambientales influyen en esta fase del desarrollo.

Fase II: Inicio de la división celular. Esta fase implica la segmentación temprana de las microsporas, lo que conduce a la formación de estructuras multicelulares (EMC) en el interior de la pared del polen (exina).

Fase III: Formación de patrones. En esta fase, se produce la liberación de las EMC mediante la ruptura de la pared del polen y tiene lugar la formación de patrones para generar estructuras similares a embriones, también denominadas *embrioides androgénicos*.

3.1. DIFERENTES RUTAS QUE CONDUCEN A LA ANDROGÉNESIS

Para la androgénesis son necesarios dos pasos: el cambio del programa gametofítico para inducir la vía embriogenética y el desarrollo del embriode

(Sangwan y Camefort, 1983). La embriogénesis androgenética solo se ha observado experimentalmente *in vitro* cuando las microsporas se cultivan en una etapa específica de desarrollo (Bhojwani et al., 1973). El cultivo *in vitro* de anteras en la etapa de tétrada o en la etapa binucleada puede utilizarse para inducir la androgenesia (Kameya y Hinata, 1970); sin embargo, se demostró que las microsporas que se encuentran justo antes o en el momento de la primera mitosis (mitosis de la microspora) poseen un mayor potencial androgenético (Nitsch y Nitsch, 1969).

Vía I. La microspora uninucleada, en lugar de experimentar la división asimétrica para formar el núcleo generativo y vegetativo, se divide simétricamente dando lugar a dos núcleos idénticos (Nitsch y Norreel, 1973) o bien se produce una segmentación directa (Rashid y Street, 1974). La división simétrica se observó en *Brassica napus* (Indrianto et al., 2001; Zaki y Dickinson, 1991), donde las microsporas se dividen simétricamente para producir dos células hijas, y ambas conducen a un desarrollo esporofítico.

Vía II. La microspora uninucleada se divide asimétricamente para producir células generativa y vegetativa, tal como ocurre durante el desarrollo normal del polen. La célula generativa degenera tras una o dos divisiones, pero la célula vegetativa se divide repetidamente para formar un embrión o callo haploide. La vía se observa comúnmente en *Nicotiana*, *Datura*, *Zea mays*, *Hordeum vulgare* y *Triticum aestivum* (Clapham, 1971; Iyer y Raina, 1972; Pescitelli y Petolino, 1988; Sunderland y Wicks, 1971).

Vía III. La microspora uninucleada se divide asimétricamente para formar una célula vegetativa y una generativa; sin embargo, los embriones polínicos se forman principalmente a partir de la célula generativa por sí sola. La célula vegetativa no se divide o lo hace de manera limitada, formando una estructura similar a un suspensor (p. ej., en *H. niger*).

Vía IV. La microspora uninucleada se divide asimétricamente para formar células vegetativa y generativa. Ambas células se dividen repetidamente y producen embriones en desarrollo. Este fenómeno se ha observado en cultivos de anteras de *Datura innoxia*.

Vía V. En *B. napus*, la primera división es simétrica y los embriones polínicos se desarrollan exclusivamente a partir de la célula vegetativa independientemente de los diferentes modos de acción en el patrón de división de la microspora, todos estos granos de polen deben desdiferenciarse para formar una estructura multicelular (MCS, por sus siglas en inglés). Estas MCS finalmente rompen la pared del polen y experimentan una diferenciación posterior para regenerar una plántula completa. La regeneración de una plántula a partir de una MCS puede ocurrir mediante embriogénesis directa o indirecta. Durante la embriogénesis directa, las MCS rompen la pared en el estadio globular y

adquieren estructuras similares a embriones, de las cuales emergen plántulas en un plazo de 4 a 8 semanas. En el caso de la embriogénesis indirecta, las MCS se dividen unas pocas veces para formar un callo, el cual rompe la pared del polen. Posteriormente, el callo se diferencia para formar embriones o regenerar raíces y brotes. Las plantas derivadas de callos presentan variaciones genéticas y, por lo general, no son deseables para la producción de haploides homocigotos.

3.2. TEORIAS SOBRE LA INDUCCIÓN DE LA ANDROGÉNESIS

La formación de embriones androgenéticos se produce debido a un cambio del desarrollo gametofítico al esporofítico; sin embargo, el momento preciso en que esto ocurre sigue siendo objeto de debate. La teoría *indeterminista* sostiene que dicho cambio tiene lugar tras la separación del botón floral de la planta donante y que las condiciones de cultivo son las responsables de este. Según esta hipótesis, todos los granos de polen cultivados tienen potencial androgénico si se cultivan antes de que se desactiven los genes que determinan el desarrollo gametofítico (Vasil, 1973).

Por otro lado, la teoría *determinista* establece que el entorno influye en la diferenciación de los gametos masculinos durante la meiosis de las células madre del polen (CMP). Durante una meiosis normal, se mantienen los determinantes gametofíticos y se eliminan los esporofíticos. Si los determinantes esporofíticos persisten debido a una meiosis anómala de las CMP, la célula adquiere un potencial androgénico. Según Heberle-Bors (1985), la capacidad androgénica de las microsporas se determina únicamente durante la meiosis; una vez finalizada esta, solo la viabilidad de dicho polen predeterminado puede verse afectada. Se propone que, tras la meiosis, el grano de polen dispone de una oportunidad adicional para volverse embriogénico durante la etapa de polen uninucleado.

3.3. FACTORES QUE AFECTAN LA ANDROGÉNESIS

Diversos factores endógenos y exógenos influyen en la embriogénesis de las microsporas, siendo los más determinantes el genotipo de la planta donante y sus condiciones de crecimiento. A menudo, dos cultivos distintos del mismo genotipo muestran una variación considerable al utilizar el mismo medio de cultivo; por ello, suele recomendarse modificar los protocolos establecidos para adaptarlos al nuevo sistema.

3.3.1. Genotipo de las plantas donadoras

El éxito de la androgénesis depende del potencial genético de la planta donante. Pueden existir variaciones intraespecíficas (dentro de la misma especie) o interespecíficas

(entre especies distintas). La variación *intraespecífica* observada es tan elevada que algunas líneas (cultivares) de una especie muestran una buena respuesta androgénica, mientras que otras presentan una respuesta extremadamente pobre o nula. Por ejemplo, en *T. aestivum*, de un total de 21 cultivares, solo 10 son capaces de producir haploides. En el caso del arroz, la respuesta a la androgénesis es mayor en los cultivares de tipo *Japonica* que en los de tipo Indica (Bajaj, 1990; Cho y Zapata, 1990; Miah et al., 1985; Raina y Zapata, 1997).

Las variaciones genóticas podrían minimizarse mediante el desarrollo de protocolos específicos para cada genotipo; sin embargo, esto requiere un estudio detallado de los factores fisiológicos y una amplia manipulación de las condiciones de cultivo *in vitro* (Dunwell et al., 1987). Como método alternativo, se puede transferir el carácter androgénico desde líneas con alta capacidad androgénica hacia material de mejora que originalmente presentaba un comportamiento recalcitrante (sin respuesta al cultivo de anteras). Este enfoque se ha probado con éxito en papa, cebada y maíz (Foroughi-Wehr et al., 1982; Jacobsen y Sopory, 1978; Petolino et al., 1988; Wenzel y Uhrig, 1981). El carácter androgénico (o la capacidad de cultivo de anteras) es un carácter cuantitativo controlado por genes de herencia nuclear (Miah et al., 1985). Por consiguiente, la selección de los loci de caracteres cuantitativos (QTL) responsables de la capacidad de cultivo de anteras resultará útil para seleccionar progenitores destinados al mejoramiento de haploides. En arroz, se identificaron QTL relacionados con la capacidad de cultivo de anteras en una población derivada del cultivo de anteras de una línea de doble haploide (DH). Se identificaron cinco QTL en los cromosomas 6, 7, 8, 10 y 12 asociados a la frecuencia de inducción de callos. Asimismo, se hallaron dos QTL para la diferenciación de plántulas verdes en los cromosomas 1 y 9, y un QTL para la diferenciación de plántulas albinas, pero no se encontró ningún QTL independiente para la frecuencia de obtención de plántulas verdes. Por tanto, la respuesta al cultivo de anteras no es un carácter simple o único; más bien, consta de varios componentes que corresponden a mecanismos independientes y con patrones de herencia distintos, según se detalla a continuación:

1. **Inducción de callos:** la capacidad de las microsporas presentes en las anteras cultivadas para iniciar divisiones y dar lugar a una acumulación celular en proliferación.
2. **Estabilización del callo:** la preservación de células completas y plenamente funcionales dentro del callo.
3. **Inducción de plántulas:** la capacidad de las células de los callos para dar lugar a embriones y plantas.

- 4. Formación de plántulas verdes frente a albinas:** la producción de plantas haploides y DH verdes plenamente funcionales.

3.3.2. Estado fisiológico de las plantas donadoras

La respuesta androgénica está muy influenciada por la fisiología y las condiciones ambientales de las plantas donantes. Las anteras de plantas donantes débiles producen solo unos pocos embriones o callos *in vitro*. Sin embargo, las condiciones fisiológicas óptimas varían de una especie a otra. Se observa que el primer conjunto de botones florales da una mejor respuesta que los que nacen más tarde (Sunderland y Wicks, 1971; Sato et al., 1989). Por lo tanto, las anteras deben cultivarse a partir de los primeros botones florales durante la floración. También se observa que la formación de plántulas falla a partir de anteras de *D. metel* que han superado la etapa de máxima floración (Narayanswamy y Chandy, 1971). Por el contrario, las microsporas aisladas de plantas más viejas de *B. napus* produjeron más embriones que las de plantas más jóvenes (Takahata et al., 1996). Se ha informado que las anteras de plantas tardías dan una mejor respuesta.

Los niveles endógenos de hormonas y el estado nutricional de la antera también afectan a la androgenesis. El aumento del ácido abscísico (ABA) durante el estrés hídrico incrementa la frecuencia de microsporas androgénicas en *H. vulgare* (Wang et al., 1999). Las plantas cultivadas en condiciones de deficiencia de nitrógeno producen un mayor número de embriones derivados de microsporas que aquellas a las que se les suministra fertilizante (Sunderland, 1978). Se sugiere que las características del polen embriogénico – tales como una estructura de la exina más fina, una tinción débil con acetocarmin, la presencia de una vacuola y la ausencia de granos de almidón – son consecuencia de la carencia de nitrógeno (Heberle-Bors, 1982).

Las condiciones ambientales – como el fotoperiodo, la calidad e intensidad de la luz, la temperatura, la nutrición y los fertilizantes, la concentración de CO₂ y diversos tipos de estrés biótico y abiótico – influyen en el proceso de androgenesis. Las anteras recolectadas de plantas cultivadas en campo ofrecieron una mejor respuesta que las provenientes de plantas cultivadas en invernadero (Vasil, 1980). La duración del día y la temperatura durante la meiosis provocan una desviación en el equilibrio sexual y, por consiguiente, un aumento en la frecuencia de polen embriogénico en *N. tabacum* (Heberle-Bors, 1982). Algunos estudios también han demostrado que tanto el fotoperiodo como la intensidad lumínica influyen en la androgenesis (Dunwell, 1976). En el caso de las especies de Brassica, las plantas donantes se cultivan inicialmente a 20 °C/15 °C, reduciéndose la temperatura a 10 °C/5 °C justo antes de la emisión del tallo floral. Los botones florales

recolectados en el momento oportuno de estas plantas sometidas a estrés dieron lugar a una mayor frecuencia de embriones derivados de microsporas (Ferrie et al., 1995). Sin embargo, el mismo enfoque de tratamiento por frío no funcionó en otras especies como el espárrago (Wolyn y Nichols, 2003), el pimiento (Lantos et al., 2009) o *Saponaria vaccaria* L. (Kernan y Ferrie, 2006).

3.3.3. Estado de desarrollo de la microspora

La etapa de desarrollo apropiada de la microspora para la androgénesis varía entre especies y también según el tratamiento utilizado para la inducción. Básicamente, se pueden obtener haploides cultivando el polen en diferentes etapas de desarrollo (p. ej., tétrada de polen, polen joven uninucleado, polen intermedio uninucleado, polen tardío uninucleado, polen binucleado y polen maduro). Generalmente, las microsporas presentan una alta competencia androgénica alrededor de la primera mitosis (etapa uninucleada) o granos de polen bicelulares en estadios temprano o intermedio); sin embargo, pierden su capacidad androgénica una vez que acumulan granos de almidón (Heberle-Bors, 1989). En *B. napus*, los granos de polen uninucleados tardíos y los bicelulares tempranos mostraron una mayor respuesta, mientras que en *N. tabacum* respondieron mejor los granos de polen uninucleados más jóvenes. No obstante, en *Arabidopsis thaliana*, se demostró que las células madre de las microsporas en las primeras etapas de la meiosis poseían una alta competencia embriogénica (Gresshoff y Doy, 1972). En *Lycopersicon esculentum* (tomate), las microsporas presentes en las anteras en estadio de meiocito – justo antes de la compartimentación de la tétrada – mostraron una mejor respuesta (Seguí-Simarro y Nuez, 2005). El estadio de desarrollo de la microspora también puede influir en el nivel de ploidía de la planta resultante. Las anteras con microsporas uninucleadas dan lugar a plantas haploides, mientras que las microsporas binucleadas (y aquellas en estadios binucleados más avanzados) generaron plantas diploides y triploides, respectivamente (Engvild et al., 1972). Por consiguiente, la recolección de las anteras en el estadio adecuado para obtener polen con competencia embriogénica resulta crucial para la androgenesis. El estadio de desarrollo del polen puede examinarse mediante tinción con acetocarmin (acetocarmin al 1 % en ácido acético al 45 %), aplastando las anteras directamente en la solución colorante.

3.3.4. Pretratamientos

Numerosas investigaciones demuestran que la microespora uninucleada, justo antes de la primera mitosis, es la más propicia para la inducción de la androgénesis.

Durante este proceso, la microespora experimenta diversos cambios bioquímicos y fisiológicos, que se han utilizado como marcadores para determinar la capacidad embriogénica de la microespora. No obstante, estos marcadores no son universales para todas las especies, ya que cada una presenta cambios distintos durante la androgénesis. La microespora uninucleada sometida a estrés adquiere una estructura «estrellada», con un núcleo central rodeado de filamentos citoplasmáticos radiales (Touraev et al., 1996). Se ha observado que esta morfología estrellada es indicativa de microsporas embriogénicas en diversas especies, como el trigo, el tabaco, el arroz y el manzano (Hofer, 2004).

Se han aplicado distintos tipos de estrés (frío, calor, privación de nutrientes y agentes químicos) como tratamientos previos en plantas donantes, espigas o botones florales aislados y anteras cultivadas (Shariatpanahi et al., 2006).

A. FRIO

El tratamiento en frío se lleva a cabo a una temperatura de entre 4 y 10 °C durante un periodo que oscila entre unos pocos días y varias semanas, dependiendo del genotipo de la planta donante. La aplicación de este tratamiento se describió por primera vez en cultivos de anteras y microsporas de *Datura* (Nitsch y Norreel, 1973). Posteriormente, otros estudios informaron sobre la inducción de embriogénesis de microsporas mediante bajas temperaturas en cebada, arroz, trigo harinero, trigo duro, avena, triticale, *Citrus clementina* y lino (Shariatpanahi et al., 2006). También se aplicó el tratamiento en frío a cultivos de anteras de tabaco para inducir la embriogénesis. El pretratamiento de cultivos de anteras a 5 °C durante los dos primeros días favoreció la androgénesis en *Cyclamen persicum* Mill. (Ishizaka y Uematsu, 1993). Diversos estudios demuestran que las plantas sometidas a tratamiento en frío producen plantas doble-haploides (DH) de forma espontánea debido a un aumento de la endoreduplicación.

B. CALOR

El pretratamiento térmico es muy eficaz en el desarrollo de la embriogénesis del polen. Generalmente se realiza a 33–37 °C durante un periodo que varía de varias horas a varios días. El tratamiento térmico se ha utilizado en microsporas aisladas de colza, trigo, tabaco, berenjena y otros cultivos (Shariatpanahi et al., 2006). La temperatura óptima para el tratamiento térmico varía según el genotipo. La androgénesis se vio favorecida en *B. campestris* L. mediante el cultivo de las anteras a 35 °C durante 1 a 3 días antes de su cultivo a 25 °C.

C. AYUNO

El estrés por privación de nutrientes se ha utilizado para inducir la embriogénesis del polen en muchos cultivos. En el caso del tabaco, se ha empleado la privación de azúcares y de nitrógeno. Sin embargo, la privación de azúcares dio lugar a una elevada embriogenicidad en microsporas aisladas de tabaco, arroz, cebada, manzano y centeno (Shariatpanahi et al., 2006a).

D. COLCHICINA

Se empleó un tratamiento con colchicina en cultivos de microsporas aisladas de *B. napus* y café. El cultivo de microsporas de *B. napus* tratado con concentraciones de 50 y 500 mg/l produjo un elevado número de embriones, y la eficiencia de la duplicación cromosómica osciló entre el 83 % y el 91 %. La colchicina es un fármaco que altera los microtúbulos; su aplicación provoca la despolimerización de estos durante la división celular, lo que impide la formación del huso mitótico (proceso necesario para desplazar los cromosomas hacia los polos opuestos antes de que la célula entre en la fase G2) y da lugar a la endoreduplicación o endomitosis.

La respuesta de las microsporas a la colchicina parece depender de su estadio de desarrollo. En colza, la mayor frecuencia de embriogénesis se ha obtenido en microsporas vacuoladas, un estadio ligeramente anterior al de la población que responde a la inducción por calor (Zhao et al., 1996).

E. ESTRÉS (RADIOACTIVO, QUÍMICO)

Se utilizó **irradiación gamma** para inducir la embriogénesis en cultivos de anteras de colza y tomate (Shtereva et al., 1998). La combinación de radiación seguida de un tratamiento de frío (10 °C durante nueve días) aumentó la embriogénesis en los cultivos de anteras de tomate. Asimismo, se ha empleado la radiación para obtener plantas androgénicas a partir de variedades recalcitrantes de arroz, cebada y *Solanum nigrum* (Aldemita y Zapata, 1991; Kopecký y Vagera, 2005; Vagera et al., 2004). La irradiación altera los niveles de auxinas y citoquininas en el tejido somático, pero no está claro si este cambio es la causa de la androgenesis. Otros tipos de estrés menos estudiados –tales como la presión atmosférica reducida, el ABA, el etanol, el choque hipertónico y el tratamiento centrífugo– solo se han evaluado en unas pocas especies (Imamura y Harada, 1980; Pechan y Keller, 1989; Tanaka, 1973; Wang et al., 1981). Apenas existen informes recientes que amplíen la aplicación de estos tratamientos de estrés a otras especies. Se

utilizó un pH elevado del medio o medios que contenían metales pesados, como el litio, para inducir la embriogénesis en microsporas de *N. tabacum* (Barinova et al., 2004; Zonia y Tupý, 1995). Las microsporas de **B. napus** se cultivaron en presencia de sustancias químicas inductoras (Liu et al., 2003). No obstante, todos estos nuevos tipos de estrés requieren ser evaluados detalladamente en otras especies.

4. CULTIVO DE MICROSPORAS

La base de este método consiste en aislar microsporas de las anteras y cultivarlas para producir plantas haploides o doble-haploides (DH). Si bien la mayoría de los estudios iniciales preferían el cultivo de anteras intactas para la producción de plantas haploides, recientemente se prefiere el cultivo de microsporas aisladas, ya que este aporta diversas ventajas al campo. Mediante la técnica de cultivo de microsporas aisladas es posible obtener callos haploides con pureza genética (donde todas las células del callo sean haploides). Esta técnica exige un mayor nivel de equipamiento y destreza para eliminar la pared somática de la antera y liberar los granos de polen individuales. La eliminación del tejido somático durante el aislamiento del polen es crucial, ya que su presencia puede dar lugar a callos, embriones y plantas diploides, resultando en una mezcla de callos haploides y diploides. El cultivo de polen aislado se realizó por primera vez en *Petunia hybrida* (Binding, 1972), inoculando una gran cantidad de granos de polen en un medio nutritivo para obtener masas de tejido multicelular a partir de granos individuales. Posteriormente, se estableció el cultivo de microsporas para numerosas especies, tales como *Nicotiana tabacum*, *B. napus*, cebada y tabaco. En el caso de **B. napus**, los botones florales se incubaron a 4 °C durante varios días antes de aislar el polen. A continuación, los granos de polen se cultivaron en un medio que contenía ácido 1-naftalenacético (ANA) y 6-bencilaminopurina (BAP), además de extractos de patata, para obtener embrioides y plantas. Este estudio demostró con éxito la producción de haploides mediante la técnica de cultivo de microsporas aisladas.

4.1. AISLAMIENTO DE POLEN

Se emplearon diversos métodos para aislar las microsporas. Se utilizaron principalmente la centrifugación en gradiente, el método de liberación espontánea de microsporas y el método de compresión de anteras.

4.1.1. Método de liberación

En este enfoque, las anteras se colocan directamente en un medio líquido y se permite que liberen sus microsporas. Posteriormente, estas microsporas se cultivan para el desarrollo de callos y la regeneración de plantas. El método de liberación se demostró inicialmente en cultivos de anteras de tabaco y más tarde se aplicó extensamente al trigo (Wei, 1982) y a la cebada (Ziauddin et al., 1990). Se recomienda pretratar las anteras con manitol 0,3 M y macronutrientes durante aproximadamente una semana para aumentar la liberación durante el cultivo (Kasha et al., 2001). La técnica de liberación ha sido el método preferido para la producción de haploides en *Capsicum annuum* L. (pimiento) (Supena et al., 2006). En el caso del pimiento, es fundamental seleccionar botones florales que contengan más de un 50 % de microsporas en estadio unicelular tardío y someterlos a un pretratamiento a 4 °C durante un día. A continuación, las anteras se cultivan en un sistema de medio de doble capa (descrito más adelante) durante una semana a 9 °C y, posteriormente, se incuban a 28 °C en oscuridad continua.

4.1.2. Método de agitación con barra magnética

Se trata simplemente de una extensión del método de liberación espontánea. Las anteras no pueden liberar todas las microsporas al medio líquido, y una cantidad considerable de polen permanece encerrada en el interior de la pared de la antera. La aplicación de agitación mediante una barra magnética ayuda a liberar las microsporas por completo y, por consiguiente, influye considerablemente en el rendimiento de microsporas obtenido mediante la liberación natural (Cho y Zapata, 1990). Los procedimientos de liberación y agitación no resultaron eficaces en los cultivos de microsporas de trigo.

4.1.3. Método de aislamiento mecánico

Este método puede llevarse a cabo mediante maceración, trituración o prensado.

1. Maceración

En esta técnica, las anteras se presionan a través de un filtro de malla utilizando una varilla de vidrio o de teflón para recolectar las microsporas. Esta técnica se estableció inicialmente para el aislamiento de microsporas en *B. napus* (Lichter, 1982). Recientemente se ha comenzado a practicar la maceración seguida de centrifugación en gradiente. En este método, los botones florales esterilizados superficialmente se Trituran con mortero y mano de mortero para liberar las microsporas de las anteras. El homogeneizado resultante se pasa luego por papel de filtro para separar las microsporas de los tejidos somáticos

de la pared de la antera y del botón floral, y posteriormente se centrifuga utilizando un gradiente (de Percoll, maltosa o sacarosa) para separar los estadios de desarrollo de las microsporas. Alternativamente, se pueden triturar directamente las anteras (en lugar de los botones florales) utilizando mortero y mano de mortero; esto reduce la cantidad de tejido somático que debe separarse de las microsporas.

2. Trituración mecánica (Blending)

Las anteras suspendidas en manitol 0,3 M se colocan en una microtrituradora y se someten a alta velocidad (20.000 rpm) durante 30 segundos. La microtrituradora emplea cuchillas afiladas a velocidad moderada y, por tanto, es capaz de cortar rápidamente las anteras en fragmentos y liberar las microsporas. La suspensión resultante se filtra a través de una malla de nailon de 100 µm para separar los restos de tejido somático de las microsporas. La técnica de trituración mecánica se estableció inicialmente para aislar microsporas de cebada (Olsen, 1992) y posteriormente se adaptó al trigo (Mejza et al., 1993). Las microsporas liberadas mediante este método suelen presentar menos daños y una mayor capacidad embriogénica y reproducibilidad que las obtenidas por maceración o por cualquiera de los otros métodos explicados anteriormente. No obstante, el aislamiento por trituración mecánica también puede dañar las microsporas, especialmente cuando la velocidad y la duración del proceso no están optimizadas.

5. PROTOCOLO BÁSICO PARA EL CULTIVO DE POLEN

5.1. CULTIVO NODRIZA

El uso de la técnica de cultivo nutricional se demostró por primera vez en *L. esculentum* (Sharp et al., 1972). En este método, las anteras intactas del botón floral se colocan horizontalmente sobre el medio basal semisólido o sólido dentro de un matraz cónico (las anteras intactas actúan como tejido nutricional). Un pequeño disco de papel de filtro se coloca sobre las anteras intactas. Mientras tanto, se debe preparar una suspensión separada de polen –proveniente de las anteras de otro capullo similar– en un medio líquido (aproximadamente diez granos de polen por cada 5 ml de medio). A continuación, se deposita mediante pipeta una gota de dicha suspensión sobre un disco de papel (transfiriendo unos 10 granos de polen a cada disco). En el caso de *L. esculentum*, el cultivo nodriza generó numerosos clones en el plazo de un mes, los cuales resultaron ser uniformemente haploides.

Otros estudios han empleado diferentes partes florales como tejido nodriza. En la técnica de cultivo nodriza aplicada a *N. tabacum*, el tejido nodriza estaba constituido

por estambres, pétalos, sépalos e incluso hojas adultas de la misma planta en la etapa de mitosis del polen. También se practica la adición de un extracto acuoso de anteras de *Nicotiana* al cultivo de microsporas de *Datura* y *Lycopersicum* para actuar como nodriza del cultivo (Acharya & Ramji, 1977).

5.2. SISTEMA DE MEDIO DE DOBLE CAPA

Este método deriva del cultivo de liberación de microsporas y es el sistema de elección, especialmente para el cultivo de microsporas en *C. annuum* L. (Supena et al., 2006). El sistema de doble capa consta de dos capas de medio: una inferior y una superior. La capa inferior es un medio sólido que contiene los componentes de Nitsch, un 2 % de maltosa y un 1 % de carbón activado. La capa superior es un medio líquido que contiene 2,5 μM de zeatina y 5 μM de ácido indol-3-acético. Las anteras se suspenden en el medio líquido para que liberen sus microsporas. Este sistema se evaluó con diez genotipos de pimiento picante y todos ellos respondieron al protocolo. Asimismo, se recomienda este método para la obtención de líneas doble-haploides (DH) en programas de mejora genética de pimiento picante.

6. VENTAJAS DEL CULTIVO DE MICROSPORAS SOBRE EL CULTIVO DE ANTERAS

El cultivo de anteras es una técnica relativamente sencilla para producir haploides, pero su aplicación se limita a unos pocos cultivos. Muchos cultivos siguen siendo recalcitrantes y no responden al cultivo de anteras. A menudo, el rendimiento de embriones en el cultivo de anteras es relativamente bajo, a pesar de la presencia de miles de microsporas en su interior. Esta dificultad para obtener rendimientos significativos mediante el cultivo de anteras impulsó el uso del cultivo de microsporas aisladas para la producción de haploides.

El cultivo de microsporas presenta varias **ventajas** frente al cultivo de anteras:

1. En el cultivo de microsporas, las microsporas aisladas quedan expuestas de manera uniforme al medio nutritivo, lo que facilita que los embriones en desarrollo accedan a una mejor disponibilidad de nutrientes. En el cultivo de anteras, las microsporas se encuentran hacinadas dentro de la pared de la antera y, por tanto, no quedan expuestas uniformemente al medio nutritivo.
2. En el cultivo de microsporas, es posible lograr la pureza genética del callo haploide. En el cultivo de anteras, la pared de la antera puede producir callo somático diploide, lo que provoca impureza genética en el callo. Además, las secreciones de la pared de la antera (capa del tapete) afectan negativamente

a la embriogénesis de las microsporas y a menudo perturban el control estricto de las condiciones de cultivo.

3. El cultivo de microsporas permite obtener un rendimiento significativo de embriones. Es posible conseguir cientos o incluso miles de embriones a partir de las microsporas aisladas de una sola antera. El cultivo de anteras tiene una eficiencia limitada, ya que produce pocos embriones por antera cultivada.
4. En el cultivo de microsporas, los factores in vitro pueden afectar directamente a la microspora y a los embriones derivados de ella. En el cultivo de anteras, las microsporas están encerradas en el interior de las anteras y, por consiguiente, no quedan expuestas directamente a las condiciones in vitro; el efecto se transmite a través de la pared de la antera.
5. En el cultivo de microsporas, es posible monitorizar el proceso de androgenesis – como la maduración de la microspora y el desarrollo del embrión – desde la etapa de célula individual. Esto ayuda a regular los diversos factores que rigen la androgénesis.
6. El cultivo de microsporas es adecuado para comprender los procesos celulares, fisiológicos, bioquímicos y moleculares implicados en la androgénesis.
7. El cultivo de microsporas es ideal para estudios de mutagenia, ya que un grano de polen individual puede exponerse de manera uniforme a agentes mutagénicos químicos y físicos.
8. El cultivo de microsporas es la única opción para algunas especies que siguen siendo recalcitrantes a la androgenesis.

Algunas de las **desventajas** del cultivo de microsporas:

1. El cultivo de microsporas aisladas requiere un mejor equipamiento y una mayor cualificación técnica.
2. La viabilidad y la desecación de la microspora aislada son factores cruciales que deben tenerse en cuenta.
3. Los rendimientos son variables. En algunos casos, casi todas las microsporas del cultivo produjeron embrioides y, en otros, ninguna de ellas mostró respuesta.

7. PRODUCCIÓN DE PLANTAS HAPLOIDES Y DOBLE-HAPLOIDES

El desarrollo espontáneo de haploides se describió por primera vez en el algodón Sea Island (Harland, 1920). Desde entonces, se ha informado de la aparición de embriones

haploides naturales – derivados de células del saco embrionario por vía apomíctica – en más de 71 especies pertenecientes a 39 géneros y 16 familias de angiospermas (Acharya y Ramji, 1977). Sin embargo, los haploides naturales no se producen con frecuencia y, por tanto, su importancia práctica es menor. Esta limitación impulsó a los mejoradores a inducir la producción de haploides mediante diversos métodos. Inicialmente (antes de la década de 1960), los haploides se obtenían mediante técnicas *in vivo*, tales como la hibridación interespecífica o amplia, la eliminación cromosómica y la polinización con polen irradiado. Estas técnicas *in vivo* producían haploides con poca frecuencia y en cantidades muy reducidas, por lo que, en aquella época, su uso se destinaba principalmente a estudios genéticos más que al mejoramiento vegetal.

7.1. PRODUCCIÓN DE HAPLOIDES *IN VIVO*

La producción de haploides *in vivo* puede lograrse modificando el método de polinización; por ejemplo, mediante la polinización con polen de la misma especie (p. ej., maíz), con polen irradiado, o con polen de una especie pariente-lejana (p. ej., cebada y papa) o no emparentada (p. ej., trigo). La polinización mediante estos métodos provoca la eliminación de los cromosomas paternos durante las primeras etapas de la embriogénesis, lo que da lugar a embriones haploides. Asimismo, estos métodos inducen la fecundación de los núcleos polares y el desarrollo de un endospermo funcional, lo que conduce al desarrollo partenogenético de los embriones haploides. La partenogénesis es el proceso de formación de un embrión sin que se produzca la fecundación de la ovocélula

7.1.1. Polinización con polen de la misma especie (cruzamiento intraespecífico)

Este método implica el cruzamiento legítimo dentro de la misma especie utilizando genotipos inductores seleccionados. Dicho cruzamiento intraespecífico da lugar a una mezcla de embriones híbridos normales y embriones maternos haploides con endospermos triploides normales. La primera línea inductora de haploidía identificada mediante este método se describió en la cepa genética de maíz «Stock 6». Los granos que contienen embriones haploides producen plántulas haploides viables; por consiguiente, este método evita el cultivo *in vitro* de embriones haploides para regenerar una planta completa.

La polinización con polen irradiado de la misma especie también puede producir haploides de origen materno. En este método, la polinización estimula el desarrollo del embrión, pero el polen irradiado no logra fecundar la ovocélula. Esta técnica se ha utilizado con éxito en diversas especies, como el manzano, la mora, el pepino, la cebolla, el melón, el girasol, el kiwi y algunas otras (Murovec & Bohanec, 2011). El método requiere una

emasculación eficiente –proceso laborioso– y la aplicación de una dosis de irradiación adecuada es crucial para inducir la producción de haploides. El polen expuesto a dosis más bajas aún puede fecundar los óvulos, dando lugar a embriones híbridos y, posteriormente, a fenotipos anómalos. Las dosis más elevadas reducen el rendimiento de embriones, pero generan mayoritariamente embriones haploides.

7.1.2. Hibridación amplia (cruzamiento interespecífico o intergenérico)

El cruzamiento entre especies se denomina hibridación amplia y se ha utilizado eficazmente en diversas especies cultivadas para la producción de haploides. La polinización (cruzamiento) puede ser interespecífica o intergenérica. En el método de hibridación amplia, se produce una eliminación preferencial de los cromosomas paternos, lo que da lugar a haploides con cromosomas maternos.

7.1.2.1. Polinización interespecífica

La cebada haploide se produjo mediante hibridación interespecífica entre la cebada cultivada (*H. vulgare*, $2n = 2x = 14$) como progenitor femenino y la cebada silvestre (*H. bulbosum*, $2n = 2x = 14$) como progenitor masculino (Forster et al., 2007). La eliminación preferencial de los cromosomas paternos de la cebada silvestre *H. bulbosum* del embrión en desarrollo da como resultado embriones haploides. Este método también se conoce como «método bulbosum». Los embriones haploides obtenidos mediante el método bulbosum presentaban defectos en el endospermo funcional, y se recuperaron cultivándolos in vitro.

También se obtuvieron haploides en trigo mediante hibridación interespecífica trigo-bulbosum, pero se limitó a unos pocos cultivares de trigo (*T. aestivum*) compatibles para el cruzamiento con la cebada bulbosum. Posteriormente, se desarrolló un nuevo método de hibridación en el que se obtuvieron plántulas de trigo haploides mediante cruces interespecíficos entre trigo (*T. aestivum*) y maíz (*Z. mays*). La polinización dio lugar a embriones híbridos, pero en etapas posteriores del desarrollo embrionario, la eliminación preferencial de cromosomas de maíz resultó en haploides de trigo. Más tarde, los embriones fueron tratados con ácido 2,4-diclorofenoxiacético in planta, para rescatarlos. Posteriormente, se aislaron los embriones en el estadio adecuado y se cultivaron *in vitro* para obtener plántulas. Esta técnica se aplicó con éxito a numerosos cultivares e híbridos comerciales de trigo (Niu et al., 2014). La polinización con maíz resulta eficaz en otras especies, como la cebada, el triticale (x *Triticosecale*), el centeno (*Secale cereale*) y la avena (*Avena sativa*) (Wędzony et al., 2009).

Se empleó la polinización intergenérica para producir individuos haploides en la patata cultivada (**S. tuberosum** L. subsp. **tuberosum**, $2n = 4x$; tetraploide) mediante el cruce con **S. phureja** ($2n = 2x$, diploide). Tras la polinización, se obtienen embriones haploides. Cabe señalar que los embriones haploides resultantes de este cruce son dihaploides ($2n = 2x$).

La hibridación amplia resultó especialmente útil para la obtención de haploides a partir de cultivares de trigo, en los que el cultivo de anteras no ofrecía buenos resultados debido a las elevadas tasas de albinismo, la baja respuesta de algunos genotipos y la prolongada duración de los procesos de inducción y regeneración.

7.2. PRODUCCIÓN IN VITRO DE HAPLOIDES

Los haploides pueden inducirse mediante el cultivo in vitro de gametófitos masculinos (androgénesis) o femeninos (ginogénesis).

7.2.1. Ginogénesis

La ginogénesis se define como la inducción *in vitro* de haploides de origen materno a partir del cultivo del gametofito femenino. Puede inducirse mediante el cultivo *in vitro* de diversas partes florales no polinizadas, tales como óvulos, óvulos unidos a la placenta, ovarios o botones florales completos. Existen dos tipos de ginogénesis: directa e indirecta. En la ginogénesis directa, el cultivo del gametofito femenino produce directamente embrioides. En la ginogénesis indirecta, el cultivo del gametofito femenino forma un callo que, finalmente, se desarrollará dando lugar a embrioides. La ginogénesis está controlada por varios factores, como los estadios de desarrollo de los gametos, el pretratamiento de los botones florales, los medios de cultivo y las condiciones de cultivo. Durante el cultivo *in vitro*, el gametofito femenino se desarrolla hasta convertirse en un saco embrionario maduro. Esto contrasta con la androgenización, proceso en el que las microsporas siguen una vía esporofítica; por lo general, no se prefieren las microsporas maduras para la producción de haploides. Los sacos embrionarios maduros contienen varias células haploides – como la ovocélula, las sinérgidas, las células antipodales y los núcleos polares no fusionados – capaces de formar embriones haploides. Las ovocélulas son las que presentan mayor potencial ginogenético entre ...todas las demás células, y pueden desarrollarse directamente en plantas haploides – sin riesgo de variaciones gametoclonales – o bien a través de la formación de callos.

La ginogénesis se ha empleado con éxito en diversas especies, tales como la cebolla, la remolacha azucarera, el pepino, la calabaza, el girasol, el trigo y la cebada, entre

otras (Murovec & Bohanec, 2011); sin embargo, en el fitomejoramiento solo se utilizan los haploides de cebolla y remolacha azucarera.

La ginogénesis presenta varias ventajas. Los haploides ginogenéticos muestran una estabilidad genética relativamente mayor y una menor tasa de albinismo; de hecho, la ginogénesis en especies de cereales no produjo plantas albinas. No obstante, debido a ciertas limitaciones, esta técnica siempre se ha considerado una alternativa a la androgenesis o a otros métodos de inducción. La principal limitación radica en la falta de protocolos establecidos para la mayoría de las especies y en la obtención de plantas diploides o mixoploides durante el proceso. Además, el rendimiento de plantas haploides es bajo, ya que solo se dispone de un ovario por flor. La disección de ovarios y óvulos no fecundados exige destrezas especiales, lo que dificulta la aplicación de la ginogénesis.

7.2.2. Androgénesis

La androgénesis se define como la producción *in vitro* de individuos haploides a partir de células gaméticas masculinas. Este proceso puede inducirse mediante el cultivo *in vitro* de anteras o microsporas inmaduras. El primer informe sobre el aislamiento de tejido haploide de angiospermas a partir de cultivos de anteras se realizó en *Tradescantia reflexa*. Guha y Maheshwari observaron estructuras similares a embriones al cultivar *in vitro* anteras de *Datura innoxia* (androgénesis). Posteriormente, confirmaron la naturaleza haploide de estos embrioides y determinaron que su origen eran las microsporas (Guha & Maheshwari, 1967). Este trabajo se extendió más tarde al género *Nicotiana*, lográndose la obtención de embriones haploides a partir de diferentes cepas de *N. tabacum* y *N. sylvestris* (Nitsch & Nitsch, 1969). Hasta la fecha, se ha reportado la producción de haploides mediante cultivo de anteras o microsporas (androgénesis) en más de 250 especies vegetales.

8. ENFOQUE GENERAL PARA EL CULTIVO DE ANTERAS DESTINADO A LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS HAPLOIDES Y DOBLE-HAPLOIDES

No existe una regla general para establecer las condiciones óptimas en el cultivo de anteras o microsporas; los protocolos pueden variar según la especie y también entre distintos cultivares de una misma especie. Por lo general, las etapas de la androgenia incluyen: selección del genotipo, determinación del estadio de desarrollo del polen, evaluación del estado fisiológico y las condiciones de crecimiento de las plantas donantes, y pretratamiento.

8.1. ESTERILIZACIÓN SUPERFICIAL Y EXCISIÓN DE ANTERAS

Tras el pretratamiento de los botones florales, se procederá a su esterilización superficial para obtener anteras libres de contaminantes. Por lo general, los botones florales se sumergen en alcohol etílico al 70 % (v/v) durante unos minutos; a continuación, se sumergen en una solución de hipoclorito de sodio (aproximadamente 1,5 % de cloro activo en agua) con unas gotas de un detergente suave, como Tween 20, durante 10 a 15 minutos. Posteriormente, se realiza un lavado de 3 a 5 minutos con agua destilada estéril, seguido de la escisión aséptica de las anteras de los filamentos y su colocación en el medio de cultivo.

8.2. COMPOSICIÓN DEL MEDIO

Por lo general, en la androgenesis se utilizan medios basales como el medio N6 (Chu, 1978), el medio MS (Murashige y Skoog, 1962), el medio de Nitsch y Nitsch (Nitsch y Nitsch, 1969) y el medio B5 (Gamborg et al., 1968). Se recomienda el medio MS a media concentración para las solanáceas y el medio N6 para los cereales (Chu, 1978). Para inducir la producción de embriones, se prefiere una fuente de carbohidratos, como la sacarosa en concentraciones elevadas o, en algunas especies, la maltosa (Powell, 1990). La aplicación exógena de reguladores del crecimiento vegetal facilitó la androgenesis. Se ha determinado que los reguladores del crecimiento vegetal – tales como auxinas, citoquininas o una combinación de ambas – son cruciales para la androgenesis en muchas especies. La adición de carbón activado (0,5–2 g/l) al medio favoreció la androgenesis en diversas especies (Bajaj, 1990). La suplementación con otras sustancias, como glutamina, caseína, prolina, biotina, inositol, agua de coco, nitrato de plata, polivinilpirrolidona (PVP) y poliaminas alifáticas (PA), facilitó la embriogénesis a partir de microsporas (Reinert et al., 1977; Tiainen, 1992). El pH del medio influye en la androgenesis y, habitualmente, se ajusta a un valor de 5,7–5,8. El uso de agentes solidificantes como el agar está ampliamente documentado; no obstante, se han empleado otros agentes solidificantes – como almidón (de papa, trigo, maíz o cebada), Gelrite, agarosa y Ficoll – con beneficios adicionales.

8.2.1. Condiciones de cultivo

Las condiciones óptimas para el cultivo de anteras consisten en incubarlas a 24–27 °C y exponerlas a una intensidad lumínica de unos 2000 lux durante 14 horas diarias (Reinert et al., 1977). Sin embargo, es necesario determinar las condiciones óptimas para cada sistema de cultivo. Por ejemplo, Vasil (1973) informó sobre el uso de periodos de luz alternos (12–18 h; 5000–1000 lux/m²).

8.2.1.1. Determinación del nivel de ploidía y análisis de homocigosis

El cultivo de anteras o microsporas no solo genera plantas haploides puras, sino que también produce plántulas heterocigotas no deseadas (diploides, triploides, tetraploides, etc.). En ocasiones, el cultivo haploide da lugar a una duplicación cromosómica espontánea que genera plantas doble-haploides (DH) homocigotas, las cuales resultan más útiles. Por ello, es importante determinar el nivel de ploidía de las plantas regeneradas para distinguir los individuos haploides o DH de aquellos no haploides no deseados. Antiguamente, los mejoradores empleaban métodos indirectos para determinar la ploidía, tales como la comparación entre las plantas regeneradas y las donantes en cuanto a morfología (altura, dimensiones foliares y morfología floral), vigor y fertilidad; sin embargo, estos métodos carecen de fiabilidad, ya que dichos marcadores pueden verse influidos por factores ambientales. El nivel de ploidía puede determinarse mediante técnicas citológicas convencionales, como el recuento de cromosomas en células de los ápices radiculares y la medición del contenido de ADN por citometría de flujo. Inicialmente, la evaluación de las plantas regeneradas dependía en gran medida de marcadores fenotípicos, del análisis de la descendencia tras la autopolinización y del análisis de isoenzimas. Los recientes avances en biotecnología han permitido desarrollar técnicas más rápidas y fiables para verificar la homocigosis y determinar el origen de las plantas. Entre las técnicas más utilizadas se encuentran el polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), el ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), las regiones amplificadas caracterizadas por su secuencia (SCAR) y las secuencias simples repetidas (SSR).

8.2.1.2. Duplicación cromosómica

En los haploides, la meiosis no puede ocurrir debido a la ausencia de un juego de cromosomas homólogos, por lo que no se produce formación de semillas. Por consiguiente, la mayoría de las veces los haploides son estériles y a menudo muestran un vigor reducido. Para restaurar la fertilidad en plantas haploides, es necesario que se produzca una duplicación espontánea durante el cultivo *in vitro*; de lo contrario, esta debe inducirse químicamente. Se ha reportado la duplicación espontánea de cromosomas en cultivos de anteras de cebada (70–90 %), trigo harinero (25–70 %), arroz (50–60 %), centeno (50–90 %) y maíz (20 %). La duplicación espontánea es altamente preferible, ya que la inducción química puede provocar mutaciones no deseadas durante el proceso de duplicación. Sin embargo, en aquellas especies donde la frecuencia de duplicación espontánea es muy baja, resulta necesario inducir la duplicación cromosómica. Se han

empleado diversos métodos para inducir la duplicación cromosómica tanto *in vivo* como *in vitro*. Se ha reportado el uso de fármacos que alteran los microtúbulos, como la colchicina y la orizalina, en concentraciones milimolares para lograr la duplicación cromosómica (Castillo et al., 2009). Adicionalmente, también se han utilizado algunos herbicidas, tales como la trifluralina y la pronamida. Los fármacos antimicrotúbulos pueden aplicarse en diversas etapas de la androgénesis; pueden añadirse a los medios de pretratamiento de microsporas o a los medios de cultivo de anteras. Los tratamientos farmacológicos se aplican tras la regeneración, ya sea en la fase de embrión, brote o plántula. Se indujo la duplicación cromosómica mediante un tratamiento con óxido nítrico (N_2O) en plántulas de maíz. Las plántulas fueron tratadas a una presión elevada de 600 kPa durante dos días, en el estadio de seis hojas, momento en el que las plantas desarrollan los primordios florales.

9. APLICACIÓN DE HAPLOIDES Y DH EN EL MEJORAMIENTO DE CULTIVOS

Las líneas doble-haploides (DH) han aportado diversas ventajas y beneficios a los programas de mejoramiento genético. La obtención rápida de homocigosis en una sola generación acelera el proceso de mejoramiento. Por el contrario, el método convencional requiere varias generaciones de autofecundación para obtener cultivares homocigotos de línea pura con vigor híbrido. Por consiguiente, las líneas DH reducen el tiempo necesario para el mejoramiento y minimizan los costos de mano de obra. Actualmente, las líneas DH constituyen una parte integral del mejoramiento vegetal y se han utilizado en la producción de cultivares comerciales de muchas especies, tales como espárrago, cebada, *B. juncea*, berenjena, melón, pimiento, colza, arroz, tabaco, triticale, trigo, entre otras. Ya se han lanzado más de 290 variedades (<http://www.scri.ac.uk/assoc/COST851/COSThome.htm>). Además, el 50 % de los cultivares de cebada disponibles en Europa y tres de las cinco clases de trigo *Canada Western Red Spring* (CWRS) en Canadá se han producido mediante el sistema DH (Dunwell, 2010). La tecnología DH resulta útil en especies que sufren depresión por consanguinidad, en las cuales es difícil producir ...líneas homocigotas fértiles mediante autopolinización, por ejemplo, en el centeno y las gramíneas. La aplicación de la tecnología de doble haploidía (DH) a plantas medicinales y aromáticas está despertando gran interés actualmente (Ferrie, 2009).

La producción de dobles haploides resulta especialmente útil en especies arbóreas. Estas especies se caracterizan por ciclos reproductivos largos, una mayor heterocigosidad, gran tamaño y autoincompatibilidad. Por consiguiente, resulta

difícil obtener líneas homocigotas con mejores características mediante métodos convencionales, incluso tras varias generaciones de autofecundación (Germanà, 2006). La reducción de tamaño de las plantas DH en comparación con las diploides heterocigotas puede resultar de interés hortícola; por ejemplo, para plantas ornamentales o portainjertos enanizantes en cultivos frutales. Investigadores chinos, empleando sistemas haploides, obtuvieron un ejemplar de árbol del caucho de seis metros de altura que pudo multiplicarse posteriormente mediante propagación asexual para generar diversos clones. Otra aplicación del sistema de doble haploidía es la obtención de plantas triploides a través del cultivo de anteras. Las plantas triploides tienen fines comerciales, ya que producen frutos sin semillas. Se ha logrado producir triploides mediante cultivo de anteras en especies como el manzano (Hofer, 2004), *Pyrus pyrifolia* Nakai (Kadota & Niimi, 2004), *Carica papaya* L. y *C. clementine* (Germanà, 2009).

El sistema haploide facilita la inducción de mutaciones y, con ello, la selección de los rasgos mutantes deseados. Por ejemplo, se introdujeron con éxito mutaciones durante la embriogénesis de microsporas en colza para conferir resistencia a herbicidas, enfermedades y salinidad, así como para mejorar la calidad de la semilla. Esto permite ahorrar tiempo y espacio en la obtención de cultivos con las características deseadas. Mediante la técnica de cultivo de anteras, se seleccionaron mutantes de tabaco resistentes a la enfermedad del tallo negro (shank disease) y líneas de trigo resistentes a la fusariosis de la espiga (*Fusarium graminearum*). El fitomejoramiento por mutagénesis es otra área de mejora de cultivos en la que el sistema de doble haploidía puede contribuir a acelerar el proceso. Es posible obtener líneas mutantes homocigotas en la primera generación tras el tratamiento mutagénico. Todos los rasgos mutados se expresan de inmediato, lo que permite identificar mutantes recesivos y dominantes en la primera generación sin necesidad de recurrir a la autopolinización. Existen dos opciones para el tratamiento mutagénico. La primera opción es el tratamiento de semillas latentes que, tras la germinación y la floración, producen gametos M1, los cuales se utilizan para el cultivo de haploides. Este método se ha empleado con éxito en cebada, arroz y trigo, aumentando la eficiencia de la selección de rasgos deseados en una población mutada de doble haploide (Forster et al., 2007). La segunda opción es el tratamiento de células haploides *in vitro*. por lo general, el agente mutagénico se aplica a la microspora en el estadio uninucleado, antes de la primera división nuclear. El tratamiento posterior a la primera división nuclear dará lugar a plantas quiméricas y heterocigotas, resultado de una diploidización espontánea a través de la división nuclea. El tratamiento mutagénico in vitro puede ir seguido de una selección in vitro de rasgos deseados, como la resistencia a enfermedades y herbicidas.

Además de su uso en el mejoramiento de cultivos, las líneas doble haploides (DH) han sido útiles en el mapeo genético y la genómica, así como dianas para la transformación. Las DH son útiles para análisis genéticos como el estudio de QTL (Datta, 2005). Los QTL influyen en rasgos agronómicos importantes en diversos cultivos. El estudio de QTL requería tradicionalmente líneas endogámicas recombinantes (RIL) para realizar análisis fenotípicos, pero el desarrollo de poblaciones RIL conlleva mucho tiempo. Recientemente, se utilizan DH para construir mapas genéticos y localizar QTL, ya que las DH son homocigotas y pueden propagarse sin segregación adicional. Por tanto, las DH permiten una medición precisa de los rasgos cuantitativos. Se han empleado DH en estudios de QTL relacionados con características de la raíz del arroz, altura de la planta, días hasta la espigazón, rendimiento de grano y tolerancia al frío. A partir del mapa de ligamiento construido con una población DH derivada de un progenitor femenino de porte extendido y un progenitor masculino de porte compacto, se detectaron dos QTL principales en los cromosomas 9 y 11 asociados al fenotipo del ángulo de los macollos. El ángulo de los macollos tiene gran importancia en el mejoramiento del arroz. Las poblaciones de arroz DH también se han utilizado en estudios de QTL sobre calidad y forma del grano, características aromáticas y resistencia a la chicharrita parda (*Nilaparvata lugens*).

El sistema de doble haploidía ofrece ventajas para aplicar la selección asistida por marcadores con el fin de identificar una línea casi isogénica deficiente en un rasgo específico; lograr esto mediante retrocruzamientos combinados con selección asistida por marcadores requeriría varias generaciones de cruces. Las DH desempeñan un papel fundamental en la integración de mapas genéticos y físicos, proporcionando así precisión para identificar genes candidatos (Künzel et al., 2000; Wang et al., 2001). Las DH han sido clave para establecer mapas cromosómicos en diversas especies, como cebada, arroz, colza y trigo (Forster & Thomas, 2005).

El sistema DH resulta especialmente útil para generar líneas transgénicas homocigotas estables. La transformación de microsporas uninucleadas o embriones haploides con un transgén generará líneas transgénicas homocigotas estables en una sola generación. Por el contrario, las células o plantas diploides heterocigotas transformadas con un transgén requerirán al menos tres generaciones de autofecundación para alcanzar la homocigosis respecto a dicho transgén. Se han empleado diversos protocolos de transformación, tales como la microinyección, la electroporación, el bombardeo de partículas y la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Touraev et al., 2001). Se ha descrito la obtención del primer arroz *indica* transgénico mediante el uso de cultivos de microsporas haploides. Asimismo, se ha utilizado el método de bombardeo

de partículas para regenerar plantas de cevada transgênicas férteis a partir de cultivos de microsporas (Datta, 2005).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acharya, B. C.; Ramji, M. V. Experimental Androgenesis in Plants – A Review. In *Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Section B*; Springer India, **1977**; pp 337–360.

Bajaj, Y. P. S. In vitro Production of Haploids and Their Use in Cell Genetics and Plant, 1990.

Castillo, A.; Cistué, L.; Vallés, M.; Soriano, M. Chromosome Doubling in Monocots. In *Advances in Haploid Production in Higher Plants*; Springer, **2009**; pp 329–338.

Chu, C.-C. The N6 Medium and Its Applications to Anther Culture of Cereal Crops. In *Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture*; Science Press: Beijing, China, **1978**; pp 43–50.

Datta, S. K. Androgenic Haploids: Factors Controlling Development and Its Application in Crop Improvement. *Current Science-Bangalore*, **2005**, 89, 1870.

Dunwell, J. M. Haploids in Flowering Plants: Origins and Exploitation. *Plant. Biotech. J.* **2010**, 8, 377–424.

Ferrie, A. Current Status of Doubled Haploids in Medicinal Plants. In *Advances in Haploid Production in Higher Plants*; Springer, **2009**; pp 209–217.

Forster, B. P.; Heberle-Bors, E.; Kasha, K. J.; Touraev, A. The Resurgence of Haploids in Higher Plants. *Trends Plant Sci.* **2007**, 12, 368–375.

Forster, B. P.; Thomas, W. T. Doubled Haploids in Genetics and Plant Breeding. *Plant Breed Rev.* **2005**, 25, 57–88.

Gamborg, O. L.; Miller, R. A.; Ojima, K. Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. *Exp. Cell. Res.* **1968**, 50, 151–158.

Germanà, M. Haploids and Doubled Haploids in Fruit Trees. In *Advances in Haploid Production in Higher Plants*; Springer, **2009**; pp 241–263.

Guha, S.; Maheshwari, S. Development of Embryoids from Pollen Grains of *Datura* In vitro. *Phytomorphology*, **1967**, 17, 454–461.

Hofer, M. In vitro Androgenesis in Apple – Improvement of the Induction Phase. *Plant Cell Rep.* **2004**, 22, 365–370.

Kadota, M.; Niimi, Y. Production of Triploid Plants of Japanese Pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) by Anther Culture. *Euphytica*, **2004**, 138, 141–147.

Künzel, G.; Korzun, L.; Meister, A. Cytologically Integrated Physical Restriction Fragment Length Polymorphism Maps for the Barley Genome Based on Translocation Breakpoints. *Genetics*, **2000**, 154, 397–412.

Mejza, S. J.; Morgant, V.; DiBona, D. E.; Wong, J. R. Plant Regeneration from Isolated Microspores of *Triticum aestivum*. *Plant Cell Rep.* **1993**, 12, 149–153.

Murashige, T.; Skoog, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, **1962**, *15*, 473–497.

Murovec, J.; Bohanec, B. Haploids and Doubled Haploids in Plant Breeding. *Plant Breeding. Rijeka, Croatia: In Tech*, **2011**, 87–106.

Nitsch, J.; Nitsch, C. Haploid Plants from Pollen Grains. *Science*, **1969**, *163*, 85–87.

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.

Olsen, F. Isolation and Cultivation of Embryogenic Microspores from Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Hereditas*, **1992**, *115*, 255–266.

Reinert, J.; Bajaj, Y. P. S.; Nitsch, C.; Clapham, D.; Jensen, C. *Haploids*; Springer, 1977.

Sharp, W.; Raskin, R.; Sommer, H. The Use of Nurse Culture in the Development Haploid Clones in Tomato. *Planta*, **1972**, *104*, 357–361.

Supena, E. D. J.; Suharsono, S.; Jacobsen, E.; Custers, J. Successful Development of a Shedmicrospore Culture Protocol for Doubled Haploid Production in Indonesian Hot Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Rep.* **2006**, *25*, 1–10.

Tiainen, T. (1992). The Role of Ethylene and Reducing Agents on Anther Culture Response.

Touraeu, A.; Tashpulatov, A.; Indrianto, A.; Barinova, I.; Katholnigg, H.; Akimcheva, S.; Ribarits, A.; Voronin, V.; Zhexsembekova, M.; Heberle-Bors, E. Fundamental Aspects of Microspore Embryogenesis. In *Biotechnological Approaches for Utilisation of Gametic Cells*, COST 824: Final Meeting, Bled, Slovenia, July 1–5, 2000 (Office for Official Publications of the European Community); **2001**, pp 205–214.

Wang, Z.; Taramino, G.; Yang, D.; Liu, G.; Tingey, S.; Miao, G.; Wang, G. Rice ESTs with Disease-resistance Gene or Defense-response Gene-like Sequences Mapped to Regions Containing Major Resistance Genes or QTLs. *Mol. Genet. Genomics*. **2001**, *265*, 302–310.

Wędzony, M.; Forster, B.; Żur, I.; Golemieć, E.; Szechyńska-Hebda, M.; Dubas, E.; Gotębiowska, G. Progress in Doubled Haploid Technology in Higher Plants. In *Advances in Haploid Production in Higher Plants*; Springer, **2009**; pp 1–33.

SOBRE O ORGANIZADOR

Eduardo Eugênio Spers realizou pós-doutorado na Wageningen University (WUR), Holanda, e especialização no IGIA, França. Possui doutorado em Administração pela Universidade de São Paulo (USP). Foi Professor do Programa de Mestrado e Doutorado em Administração e do Mestrado Profissional em Comportamento do Consumidor da ESPM. Líder do tema Teoria, Epistemologia e Métodos de Pesquisa em Marketing na Associação Nacional de Pós-Graduação e Pesquisa em Administração (ANPAD). Participou de diversos projetos de consultoria e pesquisa coordenados pelo PENSA e Markestrat. É Professor Titular no Departamento de Economia, Administração e Sociologia, docente do Mestrado em Administração e Coordenador do Grupo de Extensão MarkEsalq no campus da USP/Esalq. Proferiu palestras em diversos eventos acadêmicos e profissionais, com diversos artigos publicados em periódicos nacionais e internacionais, livros e capítulos de livros sobre agronegócios, com foco no marketing e no comportamento do produtor rural e do consumidor de alimentos.

ÍNDICE REMISSIVO

A

Absorción 40, 48, 131, 132, 134, 135, 136, 140, 144, 152

Ácido giberélico 33, 34, 36, 39, 40, 41, 42

Agave 43, 44, 45, 46, 53, 54, 55

Alfalfa 32, 152, 159

Alimentación 42, 54, 91, 117, 125, 126, 133, 137, 145, 150, 158, 159, 160, 162, 163, 169, 172, 173, 175, 177, 178

B

Beauveria bassiana 85, 86, 88, 89, 99, 101, 102, 103, 104

Bienestar animal 152, 174, 175, 176, 177, 178, 185, 186

C

Café 68, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103

Callo córneo 216, 217, 218, 221, 223, 224

Cinco libertades 175, 176

Componentes principales 2, 3, 5, 7, 9, 11, 161

Coniella 105, 106, 109, 110, 111, 112

Conservação seminal 188

Corynespora 105, 106, 109, 110, 111, 112

Cultivo in vitro 46, 55, 56, 62, 64, 74, 76

Cúrcuma 158, 159, 161, 162, 163, 164, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173

Cuyes 158, 159, 160, 162, 163, 169, 170, 172, 173

D

Diluidor 187, 188

Doble haploide 56, 64, 81

Duplicación cromosómica 56, 58, 60, 68, 79, 80

E

Estrés abiótico 44, 45, 57

Estrés por calor 143, 144, 149, 152, 157

F

Fauna silvestre 215, 216, 217, 218, 224, 225

G

Gallinas ponedoras 174, 175, 176, 177, 178, 185, 186

H

Haploides 56, 57, 58, 60, 63, 64, 65, 66, 67, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 79, 80, 81, 82

Hibiscus sabdariffa 105, 106, 113

Homocigosis 56, 57, 58, 79, 80, 82

Hypothenemus hampei 85, 86, 90, 102, 103, 104

M

Mejoramiento vegetal 56, 74, 80

Metabolismo secundario 44, 45

Minerales 39, 131, 139

Monitoreo de Oebalus 115

Morfología 44, 67, 79, 108, 171

N

Nutrición vegetal 34, 38, 42

O

Olive-tree 17

P

Parâmetros climáticos 115, 119, 121, 122, 123

Parâmetros productivos 158, 159, 161, 169, 172, 173, 185

Propilenglicol 143, 144, 145, 147, 152, 155

Propionato 143, 144, 145, 147, 149, 150, 151, 152, 153, 154

Puercoespín 216, 217

R

Refrigeração 188

Rendimiento de grano 3, 5, 8, 82

Reprodução assistida 188

Rumiantes 132, 135, 137, 144, 145, 146, 147, 149, 150, 151, 154
RWC 17, 19, 21, 22, 25, 27, 28, 29, 30

S

Salt stress 16, 17, 18, 19, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32
Sémen caprino 187, 188
Sistema de pastoreo 174, 175, 177, 180, 181, 182, 183, 184, 185
Sistema de piso 174, 175, 179, 180, 181, 183, 184, 185
Sistemas de inmersión temporal 43, 44, 46
Solución steiner 33, 34, 35, 36, 37, 40, 42
SREG 2, 3, 4, 7, 15
Stomatal density 17, 22, 23, 24, 28, 29

U

Úlcera duodenal 216, 221
Umbrales de tratamiento 115, 119, 126, 127

V

Varieties 17, 18, 19, 21, 24, 25, 26, 28, 29, 30
Vitamina D 131, 132, 135, 138, 139

W

Wax rate 17, 20, 22, 24, 27

Z

Zea Mays L. 3



EDITORA
ARTEMIS

2026