

## El uso de la haploidía en el mejoramiento genético del trigo (*Triticum aestivum* L.)

Lassaga, S.<sup>1</sup>; Bessone, V.<sup>2</sup>; Acosta, M.G.<sup>1</sup>; Dalzotto, M.<sup>1</sup>; Acosta, M.X.<sup>1</sup>; Niz, M.B.<sup>1</sup>

Autores: **1.** Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Entre Ríos. Ruta provincial N°11, km 10,5. Oro Verde, Entre Ríos, Argentina. **2.** Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA, EEA, Ruta provincial N°11, km 12,5 (CP: 3101) Entre Ríos, Argentina.

Contacto: [sergio.lassaga@uner.edu.ar](mailto:sergio.lassaga@uner.edu.ar)

ARK: <https://id.caicyt.gov.ar/ark:/s22504559/3i5waw7si>

### Resumen

Generar dobles haploides (DH) es una herramienta que brinda innumerables ventajas a los programas de mejoramiento en varios cultivos. Lograr homocigosis en una sola generación, incrementa la ganancia genética y la tasa de rendimiento de los cultivos. Además, permite la fijación de alelos raros, logrando se incremente la diversidad genética. En este proyecto se ajustaron diferentes etapas claves para esta metodología que permitirán aumentar la eficiencia de obtención de DH. Se ajustó la sincronización de fechas de floración de trigo y maíz. Para el tratamiento hormonal, la doble dosis de spray con 2,4-D 100 mg/l fue la óptima. El medio de cultivo para embriones más eficiente resultó ser adicionando 2 g/l de carbón activado. La duplicación cromosómica resultó con colchicina 0,1% en plantas con 4-5 macollos durante 6 horas. Además, se optimizaron las condiciones para el desarrollo de la planta tanto haploide como DH. En el último año se lograron obtener 30 líneas DH, las cuales se encuentran en etapa de multiplicación para su próxima evaluación tanto molecular como agronómica. Se está evaluando como polinizador maíz dulce, el cual podría mostrar ventajas en cuanto a la cantidad y viabilidad del polen, favoreciendo la obtención de trigos DH.

**Palabras clave:** Trigo. Maíz. Embriones. Doble Haploides.

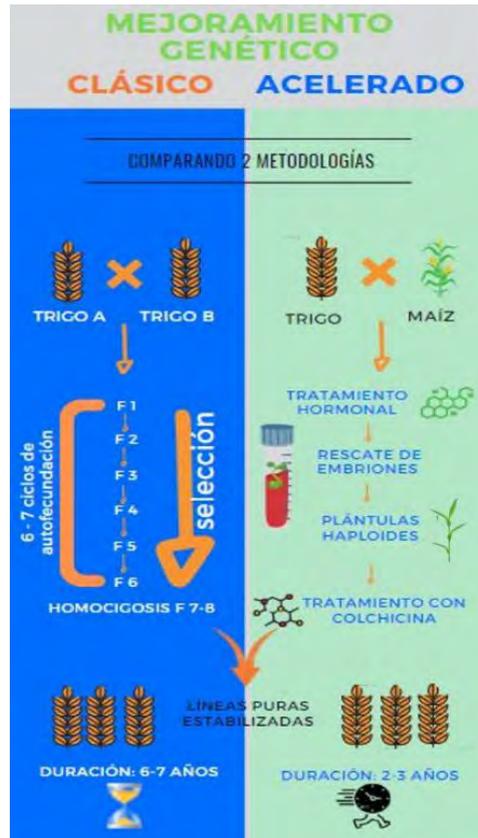
## INTRODUCCIÓN

Una planta con un número cromosómico gamético se llama planta haploide (del término griego “haplous”, que significa “único”). Pueden surgir de manera natural o como resultado de diferentes procedimientos de inducción (Watts *et al.*, 2018). Este fenómeno puede ocurrir espontáneamente en la naturaleza, pero es raro, o puede ser inducido mediante métodos *in vitro* o *in vivo* (Dwivedi *et al.*, 2015). Las plantas haploides fueron descubiertas por primera vez en 1922 por Blakeslee y sus colegas cuando estudiaban *Datura stramonium*. En 1964, Guha y Maheshwari produjeron *in vitro* plantas haploides de *Datura* a partir de anteras, lo que aumentó el potencial de la haploidía en la mejora de plantas. Desde entonces, se han publicado muchos informes sobre muchas otras especies de plantas incluyendo su uso para la producción de nuevos cultivares. Muchas características diferencian a las plantas haploides de sus equivalentes diploides. Las plantas haploides tienen un tamaño pequeño, hojas estrechas y un crecimiento relativamente lento, lo cual se debe en parte a su tamaño celular reducido; en general, el volumen celular en las plantas está directamente relacionado con su nivel de ploidía (Dunwell, 2010).

Las plantas haploides proporcionan información valiosa sobre la recombinación y el control genético del apareamiento cromosómico. Quizás el uso más significativo de las plantas haploides fue para la mejora de cultivos y la producción de haploides dobles en la mejora de plantas, lo que acorta significativamente los ciclos de reproducción mediante la fijación genética simultánea en cada locus dentro de un solo paso generacional (Kalinowska *et al.*, 2019).

En el trigo pan (*Triticum aestivum* L.) cuyo fórmula genómica es  $2n = 6x = 42$ , es un poliploide con meiosis completamente equilibradas, por su comportamiento meiótico disómico regulado genéticamente. Por lo tanto, sus gametos poseen una fórmula genómica  $2n = 3x = 21$  cromosomas con la composición genómica integrada por tres genomas ABD (Basu *et al.*, 2011).

Una de las metodologías que se ha desarrollado en la última década, es la de cruzamientos amplios de trigo por maíz (Cuadro 1). Si bien las etapas de este proceso están disponibles, su aplicación depende de una diversidad de factores que deben ser evaluados, ajustados y probados localmente para su utilización en un programa de mejoramiento. Esta técnica consiste en usar el trigo como progenitor femenino y el maíz como progenitor masculino.



**Cuadro 1.** Diferencias entre mejoramiento clásico y acelerado por generación de doble haploides.

El presente trabajo presenta los resultados más importantes alcanzados por el Proyecto PID UNER 2218 y sus posibles líneas de continuidad a partir de los mismos. Los objetivos del presente proyectos han sido cumplidos en su totalidad y se han investigado algunas líneas de acuerdo con los resultados parciales obtenidos durante la ejecución de este.

### Descripción general de la metodología desarrollada

En el presente proyecto se trabajó en el desarrollo de una plataforma que permita generar plantas haploides de trigo en coordinación con un programa de mejoramiento convencional, con la finalidad de acelerar el proceso de crianza de nuevo germoplasma para Entre Ríos. Los recursos presupuestarios limitados han definido algunas formas de trabajo que se pueden detallar brevemente como sigue.

#### A-Siembra

Para no tener sobrecarga de castraciones y polinizaciones en un corto periodo de tiempo, se tomó la decisión de realizar siembras escalonadas, tanto de trigo como de maíz, de manera de tener un número manejable de plantas para realizar los cruza-mientos. De esta manera, la siembra de ambos cultivos comenzó a mediados de cada diciembre, momento en el que ya se contaba con las plantas de trigo de F2 con un buen número de semillas. Las siembras comenzaron en invernáculo (con radiador de agua y ventiladores para bajar la temperatura) tanto de maíz como de trigo. Las mismas se sembraron cada 10-15 días, de manera de que al momento de floración poder tener tanto ovarios maduros y receptivos como polen de maíz disponible. Esto, se llevó ade-

lante hasta mediados de agosto, momento en que se detuvieron las siembras, ya que las floraciones de ambos cultivos se vieron afectadas por las elevadas temperaturas y por diferentes tipos de plagas fúngicas e insectiles, especialmente el trigo.

Esta forma de siembra conllevó al desafío de lograr las mejores condiciones ambientales para cada cultivo. Durante los meses de mayo, junio y julio, se aplicó un fotoperiodo de 16 horas, para evitar el engrosamiento de la pared del pericarpio en el trigo y evitar los efectos adversos que tiene este hecho sobre la producción de embriones (Abdollahzadeh et al. 2017; Bento et al., 2013; Li et al. 2021; Pérez-Gianmarco et al. 2018).

La siembra de maíz se realizó únicamente en invernáculo con la finalidad de tener un mejor control de las temperaturas mínimas. En cuanto a las siembras de trigo, se encontró que las realizadas en fechas óptimas en el campo tuvieron un buen desarrollo en comparación con las sembradas en invernáculo. Sin embargo, las siembras tardías en el campo presentaron un período vegetativo más corto y dificultades para obtener espigas y flores óptimas debido a las condiciones ambientales. Cuanto más avanzado se encontró el año calendario, se observaron la presencia de enfermedades y plagas, como carbón, roya y trips, que afectaron la calidad de las plantas y la producción de embriones haploides.

Se utilizaron 3 macetas de 10 litros por población F2 de trigo, con 5 semillas cada una por época de siembra y 10 macetas con 2 plantas de maíz cada una por fecha de siembra. La tierra utilizada fue mezcla de tierra de un suelo molisol con tierra de turba y perlita en una mezcla de 4:4:2 partes, respectivamente. Se fertilizó a la semana de siembra con N:P:K.



**Figura 1.** Macetas en invernáculo con poblaciones F2 de trigo

En junio, las siembras de trigo se continuaron en recinto, el cual se corresponde una estructura metálica de considerables dimensiones y recubierta por una malla antiáfidos, que permite detener parcialmente el ataque de insectos y pájaros (Figura 2a). De esta manera se disminuyeron el número de aplicaciones de productos contra insectos, lo que permitió un menor riesgo en la manipulación de las plantas en el momento de castración y polinización, además cuenta con un sistema de pulverización de agua, que permite mantener las plantas con adecuada provisión de agua. La siembra se extendió hasta fines de octubre, momento en que las condiciones ambientales ya no favorecían el desarrollo de los cariopses por las elevadas temperaturas, el ataque de enfermedades fúngicas (Ej. Carbón) y el ataque de insectos. Las condiciones adversas de estas

épocas extremas dieron como resultado baja producción de embriones y muchas veces nula producción.



**Figura 2.** a) Siembra de poblaciones F2 de trigo en recinto b) Siembra de maíz en invernáculo de manera escalonada

La siembra de maíz se realizó únicamente en invernáculo con la finalidad de tener un mejor control de las temperaturas mínimas (Figura 2b).

### B-Castración, polinización y tratamiento hormonal

La castración se realizó 24 horas antes de la polinización. La emasculación se llevó a cabo cuando las plantas se encontraban en el estadio Z5.0 (Zadoks *et al.* 1974) (Figura 3 a), luego las espigas fueron cubiertas con sobres de papel para evitar la desecación y la polinización con polen ilegítimo. En cada polinización se utilizó polen fresco de maíz (Figura 5b) y las espigas se cubrieron nuevamente con sobres (Figura 5c).



**Figura 3.** a) Espiga de trigo en condiciones de ser castrada. b) Panoja de maíz con sus anteras llenas de polen para ser extraído. c) Espigas de trigo castradas y polinizadas con sobres hasta 48 horas después de la polinización

Posteriormente al cruzamiento, los cromosomas de maíz degeneran y el embrión formado posee solo el complemento cromosómico del trigo, sin producción de endosperma. La frecuencia de formación y retención de embriones haploides generados, está altamente influenciada por la aplicación externa de reguladores de crecimiento como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Marshall *et al.*, 1983) cuando se aplica post-fecundación, y permite la sobrevivencia de los embriones hasta el momento de ser rescatados *in vitro*. Se probaron tres formas de aplicación hormonal para lograr la retención embrionaria

como sigue:

- 1) Inyección en el entrenudo superior de espigas polinizadas (Srivastava & Bains, 2018; Brazauskas, et al., 2005; Wedzony & Van Lammeren, 1996)
- 2) Triple spray en las espigas (Meenakshi Santra et al., 2017)
- 3) Gota en cada una de las espiguillas (Hanif Khan et al., 2017; Arzu & Savaşkan, 2014).

Cada tratamiento se realizó a las 24 y 48 horas después de su polinización, con una solución de 100 mg/l 2,4-D+DMSO (2%) (Figura 4).



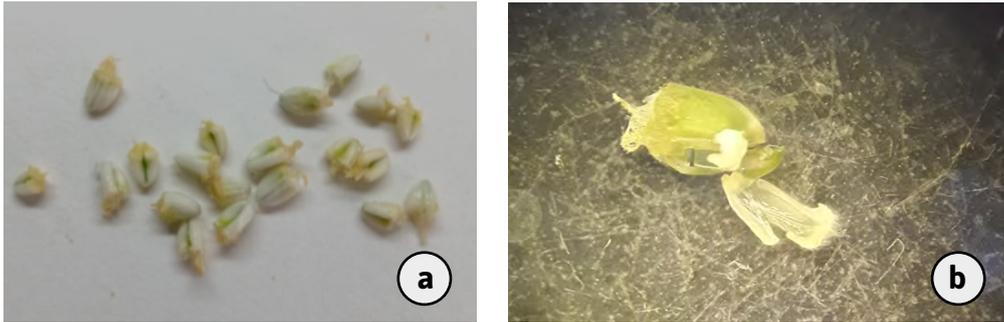
**Figura 4. Métodos de aplicación hormonal.** a) Inyección en el entrenudo superior. b) Triple spray en las espigas. c) Gota en cada una de las espiguillas.

Los mejores resultados se obtuvieron con la aplicación a las 24 y 48 horas después de la polinización con el método de spray. Esto podría deberse a una mejor dosificación en el tiempo, sin mojar excesivamente las espiguillas, permitiendo una mejor oxigenación de los tejidos y una mayor supervivencia de los embriones.

### **C- Rescate de embriones de los cariopses**

Luego de 15-20 días pos-polinización se cortaron las espigas y se extrajeron los cariopses. Los cariopses fueron esterilizados con alcohol 70% por 1 minuto y lavandina comercial (52 g/l hipoclorito de sodio) al 20% durante 10 minutos en cámara de flujo laminar, y se realizaron cinco enjuagues con agua bidestilada estéril.

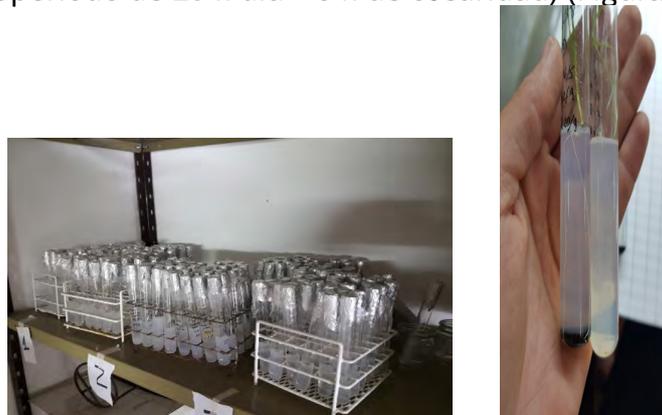
Fueron transferidos a placas de Petri estériles para su disección bajo lupa con bisturí. Se fijó el cariopse por el cepillo con pinza, se abrió con bisturí para ver los embriones. Se consideraron embriones haploides cuando se observó el embrión suelto en y sin endosperma. Se registró el número de embriones por espiga. La Figura 5 muestra cariopses obtenidos y el embrión producido por uno de los cariopses.



**Figura 5.** a) Cariopses extraídos de una espiga y b) embrión haploide obtenido de un cariopse sin endosperma

Investigaciones realizadas por Johansson *et al.* (1982) indican que la adición de carbón activado (CA) al medio mejora la embriogénesis a partir de microsporas en algunas plantas. Estudios de Genovesi & Collins (1982) indican que la adición de CA al medio basal mejora la respuesta en la producción de callos o embriones. Además, la adición de CA en asociación con el gel de agarosa en el medio de cultivo causa un aumento significativo en la inducción de embriones en el cultivo de microsporas de *Brassica juncea* (Kott, *et al.* 1988; Gland, *et al.* 1988; Prem *et al.* 2008).

Los embriones rescatados fueron sembrados en condiciones estériles dentro de tubos con 1/2 Murashige & Skoog (1962) + 30 g/L de sacarosa + 8 g/L de agar, pH 5,8, solo o con el agregado de carbón activado (2g/L) hasta observar desarrollo de la radícula y/o coleoptile (1-2 semanas). Luego fueron transferidos a cámara de incubación con luz, a  $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$  (fotoperiodo de 16 h día - 8 h de oscuridad) (Figura 6a).



**Figura 6.** a) Embriones rescatados en tubos de ensayo, uno por tubo b) Plántulas creciendo en medio con carbón activado (izquierda) y sin carbón activado (derecha).

Como puede observarse en la Figura 6b, el tubo que contiene medio con carbón activado (izquierda) posee una estructura más desarrollada de raíz, la que posee ramificaciones proximales y pelos radiculares más profusos. La plántula en el medio sin carbón activado (derecha), no posee ramificaciones, posee una conformación más delgada, con menos pelos radiculares y de aspecto más débil. Estas diferencias se han observado al momento de la duplicación (Figura 7). Se puede observar una diferencia notable de desarrollo. A la izquierda una planta que creció en medio sin carbón, la cual

1. Syn. de *Carduus nutans* subsp. *leiophyllus* (Petrovič) Arènes

tiene un buen desarrollo, pero mucho menor que la que estuvo en el medio con carbón. La planta que creció en el medio con carbón, aunque aparentemente es más corta, se ve arrollada en el extremo, ya que fue limitada su longitud por la base de la maceta, y el agregado de poliacrilato provocó que fuera muy difícil separar las raíces unas de otra. Por ese motivo se produjo una maraña de raicillas que se mostraban como una conglomeración, muy difícil de separar y por temor a dañarla en el intento de separarlas, se las dejó tal como se las sacó de la maceta. Este hecho, deja ver el mayor número de ramificaciones, dando una estructura diferente, más densa y fuerte en el medio con carbón.



**Figura 7.** Raíces de plantas haploides crecidas en medio sin carbón activado (izquierda) y con carbón activado (derecha).

Estas diferencias se vieron en el desarrollo posterior, permitiendo un mejor establecimiento de la planta en aquellas que germinaron y pasaron sus primeros estadios en un medio con carbón activado, una vez duplicadas las plantas, lo que estaría permitiendo que estas plantas soporten de mejor manera el estrés de la duplicación con colchicina, permitiendo un mejor establecimiento luego de este tratamiento hasta completar su ciclo y producir semilla diploide estable genéticamente.

#### **D- Transplante de los embriones germinados**

Las plantas obtenidas se trasplantaron al tener 1-2 hojas, a macetas con una mezcla de tierra:perlita (1:1), con el agregado de poliacrilato de K, y colocadas en cámara de crecimiento (25°Cx16 horas de luz y 8 horas de oscuridad). En esta etapa se realizó la rustificación cubriendo las plantas con vasos plásticos para mantener la humedad y retirándose por períodos cada vez más prolongados (Figura 8). Luego de su rustificación fueron llevadas al invernáculo hasta macollaje.



**Figura 8.** a) Plántulas haploides cubiertas por vasos plásticos y b) ya rustificadas en invernáculo.

### E- Duplicación cromosómica de las plantas haploides

Al alcanzar 2-4 macollos (Z2.2 a Z2.4) se retiraron de las macetas, se lavaron las raíces y se cortaron hasta aproximadamente 10 cm, lo mismo se realizó con las puntas de las hojas. Luego se sumergieron durante 6 horas en una solución de colchicina (concentración) más DMSO (2%). Se dejaron en campana de extracción de gases, dejando las raíces sumergidas en la solución de colchicina, con un aireador de pecera (Figura 9). Luego se colocaron bajo flujo de agua corriente hasta el otro día (overnight) y se plantaron nuevamente en tierra en macetas de 1 litro y colocadas en cámara de crecimiento (25°Cx16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) para su recuperación. Una vez recuperadas del tratamiento de duplicación se trasladaron al invernáculo hasta completar su ciclo para la extracción de semillas doble haploides.



**Figura 9.** Plantas haploides de trigo con raíz sumergida en colchicina con aireador

El número de semillas obtenido por planta duplicada fue muy dispar, desde una semilla única hasta varias por línea DH producida. El número de semillas por espiga también fue variable, desde una semilla, hasta varias. Por lo general, las semillas que produjeron estas plantas fueron de buen aspecto y sanidad. Las plantas después de la duplicación produjeron diferente número de macollos, algunos fueron macollos con espigas que produjeron semillas y otros con espigas totalmente estériles. Esto es una evidencia sobre la característica quimérica del tejido haploide/diploide, que les dio origen, presentando tanto células haploides (espigas estériles) como células diploides (espigas fértiles).

Los genotipos correspondientes a las poblaciones segregantes F2 fueron provistos por el Programa de Mejoramiento Genético de la EEA Paraná del INTA.

Los Recursos Presupuestarios fueron otorgados por el PID UNER 2218 y el Proyecto de PE.I126 de Mejoramiento Genético de Trigo de INTA.

## Indicadores de producción

### Congresos

#### *Jornadas INEXA 2022, Paraná, noviembre 2022*

**-Análisis de diferentes sistemas y dosis de aplicación de 2,4-d en la Retención de embriones haploides de trigo** Responsable: NIZ María Belén, maria.niz@uner.edu.ar Integrantes del Equipo: ACOSTA, M. Gabriela; ACOSTA, M. Ximena; BESSONE, Victoria; DALZOTTO, Macarena A. L.; LASSAGA, Sergio L.; NIZ, M. Belén; PICOTTI, Héctor D. Facultad de Ciencias Agropecuarias – Universidad Nacional de Entre Ríos

**-Efecto de la adición de carbón activado sobre el desarrollo in vitro de embriones haploides de trigo** Responsable: LASSAGA, Sergio Luis sergio.lassaga@uner.edu.ar Integrantes del Equipo: ACOSTA María Ximena, ACOSTA María Gabriela, BESSONE Victoria, DALZOTTO Macarena, NIZ María Belén, PICOTTI Héctor. Unidad Académica: Facultad de Ciencias agropecuarias FCA-UNER

### Publicaciones

**Efecto de tres sistemas de aplicación de hormonas en la retención de embriones haploides de trigo** Effect of three hormone delivery systems on wheat haploid embryo retention. Lassaga S.L.1-2\*, Bessone V.1-2, Niz M.B.2, Dalzotto M.A.L.2, Acosta M.X.2, Picotti H.D.2, Acosta M.G.1 INTA EEA Paraná, Ruta 11 km 12,5, Oro Verde, Entre Ríos, Argentina. 2UNER Facultad de Ciencias Agropecuarias, Ruta 11 km 10,5, Oro Verde, Entre Ríos, Argentina.

Serie Comunicaciones Técnicas ISSN 1667-4014. COMUNICACION TECNICA N° 138 ÁREA RECURSOS NATURALES Relevamiento Integrado. I Simposio de Ciencias Agrarias de INTA. Libro de resúmenes. 3 y 4 de Noviembre de 2022 (modalidad virtual).

### SERVICIOS ESPECIALIZADOS Y ASISTENCIA TÉCNICA A TERCEROS

Obtención de DH a partir de cruzamientos de TxM. Comitente Empresa: Agldea SRL  
Web: <https://www.agldea.com.ar/>

CUIT: 30-70976580-5 Contacto/Referente: Dr. Manuel Pacin o manuel.pacin@agldea.com.ar

Equipo de Trabajo Responsable: Dr. Sergio L. Lassaga o sergio.lassaga@uner.gob.ar  
Grupo responsable: Dra. María G. Acosta Lic. Victoria Bessone

Breve descripción del Problema a resolver Agldea, es una empresa en la cual los servicios que brinda conllevan la investigación y desarrollo precomerciales. La Empresa desea desarrollar un protocolo que permita el uso de cruzamientos intergenéricos, para que sea aplicable a programas de mejoramiento genético en la producción de líneas puras estabilizadas de trigo, para ser utilizado en combinación con otras técnicas biotecnológicas.

Objetivo de la AT El objetivo de la AT es lograr la transferencia tecnológica y know-how, a través del diseño de un protocolo especializado en producción de maíz y trigo, con énfasis en la metodología estándar de producción de DH de trigo, a los miembros de La Empresa y acorde a las necesidades, recursos y potencialidades de la misma. Se busca de esta manera, que la Empresa adquiera conocimientos y habilidades prácticas para llevar adelante este protocolo.

## **OTRAS ACTIVIDADES QUE CREA IMPORTANTE CONSIGNAR**

Guillermo Tortone: Capacitación en técnicas de cultivo de tejidos vegetales in vitro, para la reproducción agámica de especies ornamentales de importancia económica para la zona de Diamante. Capacitadores: integrantes del PID 2218

Artículos de divulgación surgidos del presente proyecto - Nota Periodística escrita. Aplican tecnología para obtener líneas de trigo más competitivos. INTA Informa. Septiembre 2020 . <https://intainforma.inta.gov.ar/aplican-tecnologia-para-obtener-lineas-de-trigo-mas-competitivos/>

- Revista Chacra. <https://www.revistachacra.com.ar/nota/37344-aplican-tecnologia-para-obtener-lineas-de-trigo-mas-competitivos/>

- Agrositio <https://www.agrositio.com.ar/noticia/212537-aplican-tecnologia-para-obtener-lineas-de-trigo-mas-competitivos>

- El Litoral (Corrientes) <https://www.ellitoral.com.ar/corrientes/2020-9-23-1-0-0-aplican-tecnologia-para-obtener-lineas-de-trigo-mas-competitivos>

- El Popular <http://www.elpopular.com.ar/nota/149198/aplican-tecnologia-para-obtener-lineas-de-trigo-mas-competitivos>

- ON 24 <https://www.on24.com.ar/negocios/agro/tecnologia-para-obtener-lineas-de-trigo-mas-competitivos/>

- Nota Periodística audiovisual. PamperoTV | Entre Ríos | Nuevas líneas puras de trigo [https://www.youtube.com/watch?v=TKmfsTk\\_nlo](https://www.youtube.com/watch?v=TKmfsTk_nlo)

- Nota Periodística. AgrofyNews Aplican tecnología para obtener líneas de trigo más competitivos 2020 [https://www.argentina.gov.ar/noticias/aplican-tecnologia-para-obtener-lineas-de-trigo-mas-](https://www.argentina.gov.ar/noticias/aplican-tecnologia-para-obtener-lineas-de-trigo-mas-competitivos)

<https://news.agrofy.com.ar/noticia/189385/inta-busca-trigos-mas-competitivos-tecnologia-dobles-haploides>

## **Bibliografía**

Abdollahzadeh I, Schwarten M, Gensch T, Willbold D and Weiergräber OH (2017) The Atg8 Family of Proteins—Modulating Shape and Functionality of Autophagic Membranes. *Front. Genet.* 8:109. doi: 10.3389/fgene.2017.0010

Arzu Ozkara and Cigdem Savaskan (2014) Wheat × Maize Crosses for Haploid Embryo Production and Comparison of haploid-diploid Embryo Structure. *Research Journal of Biotechnology*, 9(10):32-37.

Basu, S. K., Datta, M., Sharma, M., Kumar, A. 2011 Haploid production technology in wheat and some selected higher plants. *AJCS* 5(9):1087-1093.

Bento, C. F.; Puri, C.; Kevin Moreau, K.; Rubinsztein, D. C. (2013) The role of membrane-trafficking small GTPases in the regulation of autophagy. *Journal of Cell Science* 126, 1059–1069.

doi: 10.1242/jcs.123075

Brazauskas, I. Pađakinskienė, V. Ruzgas (2005) Improved approaches in wheat × maize crossing for wheat doubled haploid production. *BIOLOGIJA* 4:15–18.

Dwivedi, S.L.; Britt, A. B.; Tripathi, L.; Sharma, S.; Upadhyaya; H. D.; Rodomiro Ortiz, R. 2015 Haploids: Constraints and opportunities in plant breeding. *Biotechnol Adv*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.001>

Dunwell, J.M. 2010 Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnology Journal* (2010) 8, pp. 377–424. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x

- Genovesi, A. D., Collins, G. B. (1982) In vitro production of haploid plants of corn via anther culture 1. *Crop Science*, 22(6), 1137-1144. <https://doi.org/10.2135/cropsci1982.0011183X002200060013x>
- Gland, A., Lichter, R., Schweiger, H.G. (1988) Genetic and exogenous factors affecting embryogenesis in isolated microspore cultures of *Brassica napus* L. *J Plant Physiol* 132:613–617
- Guha, S. and Maheshwari, S.C. (1964) In Vitro Production of Embryos from Anthers of *Datura*. *Nature*, 204-497. <http://dx.doi.org/10.1038/204497a0>
- Hanif Khan, S. C. Bhardwaj, O. P. Gangwar, Pramod Prasad and Ruchi Rathore (2017) Efficiency of double haploid production in wheat through wide hybridization and embryo rescue. *Indian J. Genet.*, 77(3): 428-430 (2017). DOI: 10.5958/0975-6906.2017.00059.1
- Johansson, L., Andersson, B., Eriksson, T. (1982) Improvement of anther culture technique: Activated charcoal bound in agar medium in combination with liquid medium and elevated CO<sub>2</sub> concentration. *Physiologia Plantarum*, 54(1), 24-30. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1982.tb00571.x>
- Kott, L.S., Polsoni, L. & Beversdorf, W.D., 1988 - Cytological aspects of isolated microspore culture of *Brassica napus*. *Can. J. Bot.*, 66: 1658-1664.
- Li, Y-B; Yan, M.; Cui, D-Z; Huang, C.; Sui, X-X; Guo, F.Z.; Fan, Q-Q; Chu, X-S (2021) Programmed degradation of Pericarp Cells in Wheat Grains Depends on Autophagy. *Front. Genet.* 12:784545. doi: 10.3389/fgene.2021.784545
- Marshall D.R., Molnár-Làng M., Ellison F.W. (1983) Effects of 2,4-D on parthenocarpy and cross-compatibility in wheat. *Cereal Res Commun* 11:213-218.
- Meenakshi Santra, Hong Wang, Scott Seifert, and Scott Haley (2017) Doubled Haploid Laboratory Protocol for Wheat Using Wheat–Maize Wide Hybridization. Prem L. Bhalla and Mohan B. Singh (eds.), *Wheat Biotechnology: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1679, DOI 10.1007/978-1-4939-7337-8\_14, © Springer Science+Business Media LLC 2017, pp. 235-249.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Pérez-Gianmarco, T. I.; Slafer, G. A.; González, F. G. 2018 Photoperiod-sensitivity genes shape floret development in wheat. *Journal of Experimental Botany*. doi:10.1093/jxb/ery449
- Prem, D., Gupta, K., Sarkar, G. (2008) Activated charcoal induced high frequency microspore embryogenesis and efficient doubled haploid production in *Brassica juncea*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 93, 269–282 (2008). <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9373-1>
- Srivastava, P., Bains, N. S. (2018) Accelerated Wheat Breeding: Doubled Haploids and Rapid Generation Advance. IN: Gosal, S. H. Wani (eds.), *Biotechnologies of Crop Improvement*. Springer Cham 1: 437-461.
- Watts, A.; Kumar, V.; Kumar Raipuria, R.; Bhattacharya, R. C. 2018 In Vivo Haploid Production in Crop Plants: Methods and Challenges. *Plant Molecular Biology Reporter* (2018) 36:685–694. <https://doi.org/10.1007/s11105-018-1132-9>
- Wędzony, M., Van Lammeren, A. A. M. (1996) Pollen Tube Growth and Early Embryogenesis in Wheat × Maize Crosses Influenced by 2,4-D. *Annals of Botany*, 77(6), 639–647. <http://www.jstor.org/stable/42771257>
- Zadoks J.C., Chang T.T., Konzak, C.F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed research*, 14: 415–421.

**PID 2218**

**Denominación del Proyecto**

El uso de la haploidía en el mejoramiento genético del trigo (*Triticum aestivum* L.)

**Director**

Lassaga, Sergio Luis

**Codirector**

Casco, Víctor Hugo

**Unidad de Ejecución**

Universidad Nacional de Entre Ríos

**Dependencia**

Facultad de Ciencias Agropecuarias

**Contacto**

[sergio.lassaga@uner.edu.ar](mailto:sergio.lassaga@uner.edu.ar)

**Cátedra/s, área o disciplina científica**

Genética y Mejoramiento Vegetal y Animal

**Instituciones intervinientes públicas o privadas**

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA.

**Integrantes del proyecto**

Docentes UNER: Gioco, Lucrecia Cristina; María Gabriela Acosta; Esteban Tobías Muñiz Padilla; Ahumada, Miguel. Externos: Bessone, Victotia (INTA EEA Paraná). Becarios de formación vinculados al PID: Dalzotto, Macarena Lujan; Niz, María Belén.

**Fechas de iniciación y de finalización efectivas**

15/08/2019 y 07/07/2023

Aprobación del Informe Final por Resolución C.S. N° 054/24 (27/03/2024)