

# CULTIVO DE ANTERAS EN *Physalis peruviana* L. ESTADIOS DE MICROSPORAS, MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN Y MEDIOS DE CULTIVO

Gerardo Mállap-Detquizán<sup>1</sup>, Jegnes B. Meléndez-Mori<sup>1</sup>, Eyner Huaman-Huaman<sup>1</sup>,  
Nuri C. Vilca-Valqui<sup>1</sup> y Manuel Oliva<sup>1</sup>

## RESUMEN

El cultivo de anteras es una herramienta que permite la producción de plantas homocigotas doble haploides y es una alternativa viable y apropiada para el mejoramiento de cultivos. Sin embargo, el éxito de su aplicación depende de diversos factores que afectan su eficiencia. Por ello, el objetivo del estudio fue determinar los estadios de las microsporas asociadas con el desarrollo de los botones florales, así como evaluar los métodos de esterilización y el desarrollo de las anteras de *Physalis peruviana* en cuatro medios de cultivo. El estadio uninucleado tardío, adecuado para iniciar la androgénesis se encontró en botones florales de entre 7,85 y 9,37 mm de longitud polar. Los niveles más bajos de oxidación (10 %) y contaminación (20 %), y la mayor viabilidad de anteras (70 %) se registraron bajo el tratamiento de esterilización superficial con etanol (70 %) por 3 min y NaClO (2 %) durante 15 min. La formación de callos y la regeneración de la planta se obtuvieron en los medios de cultivo B5 y LS, lo que indica su utilidad en los programas de mejoramiento.

**Palabras clave adicionales:** Botones florales, componentes de los medios, embriogénesis

## ABSTRACT

### **Anther culture in *Physalis peruviana* L. Microspore stages, sterilization methods and culture media**

Anther culture is a tool that allows the production of homozygous double haploid plants, and is a proper and viable alternative for crop improvement. However, the success of its application depends on a number of factors that affect its efficiency. Thus, the objective of this study was to determine the microspore stages associated with flower bud development, as well as to evaluate sterilization methods and development of *Physalis peruviana* anthers in four culture media. The late uninucleate stage, suitable for initiating androgenesis, was found in flower buds between 7.85 and 9.37 mm polar length. The lowest levels of oxidation (10 %) and contamination (20 %), and the highest anther viability (70 %) were recorded under surface sterilization treatment with ethanol (70 %) for 3 min and NaClO (2 %) for 15 min. Callus formation and green plant regeneration were obtained on B5 and LS media, indicating their usefulness in breeding programs.

**Additional keywords:** Embryogenesis, flower buds, media components

## INTRODUCCIÓN

*Physalis peruviana* L., es una planta de la familia Solanaceae oriunda de la zona andina del Perú. Sus frutos se caracterizan por su contenido de vitaminas y minerales, además de sus propiedades farmacológicas atribuidas principalmente a la presencia de múltiples lactonas-esteroidales con efecto citotóxico contra varios tipos de cáncer (Puente et al., 2019); cualidades que en su conjunto la ubican dentro de la gama de alimentos con beneficios nutraceuticos, con gran demanda en el

mercado mundial.

En Perú, se distribuye una gran diversidad de ecotipos de *P. peruviana*, que han servido de base genética para los cultivos comerciales del mundo (Fischer et al., 2014). Para el cultivo de esta planta los agricultores y las empresas peruanas han trabajado arduamente para identificar, seleccionar y cultivar diferentes ecotipos de vida silvestre, pero aún es limitado el conocimiento genético que sustenta su selección (Bonilla et al., 2019). Es decir, existe limitada información y desarrollo tecnológico para obtener plántulas mejoradas.

Recibido: Febrero 1, 2022

Aceptado: Agosto 25, 2022

<sup>1</sup>Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES), Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza (UNTRM), Chachapoyas 01001, Perú. e-mail: [jbenjamin@indes-ces.edu.pe](mailto:jbenjamin@indes-ces.edu.pe) (autor de correspondencia), [gerardo.mallap@gmail.com](mailto:gerardo.mallap@gmail.com), [eyner.huaman@untrm.edu.pe](mailto:eyner.huaman@untrm.edu.pe), [nuricarito.02@gmail.com](mailto:nuricarito.02@gmail.com), [soliva@indes-ces.edu.pe](mailto:soliva@indes-ces.edu.pe)

Existe la necesidad de desarrollar cultivares de *P. peruviana* genéticamente uniformes para luego liberar variedades híbridas. Utilizando el cultivo *in vitro* de anteras, ha sido posible reducir el tiempo y ahorrar recursos en la obtención de nuevas variedades, por ejemplo, en el desarrollo de variedades mejoradas de arroz (Pérez et al., 2016). En solanáceas como *Physalis ixocarpa* (Escobar-Guzmán et al., 2009), *Capsicum annuum* (Ari et al., 2016) y *Solanum tuberosum* (AboShama y Atwa, 2019), esta técnica se ha utilizado en la búsqueda de producir plantas haploides y dobles haploides (Humphreys y Knox, 2015). En *P. peruviana* se ha usado la técnica para estudios genéticos (García et al., 2018), pero son pocos los reportes sobre la inducción de embriogénesis a partir de microsporas.

Al implementar el cultivo de anteras, se deben considerar factores como el genotipo, la fisiología de la planta donante, la etapa de desarrollo de las microsporas, el tratamiento de la antera y la composición del medio de cultivo; todos con gran influencia en la capacidad androgénica (Humphreys y Knox, 2015; Silva et al., 2017). En general, los estudios se enfocan en manipular diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento que pueden producir resultados muy variables; por ejemplo, inicialmente se requiere de auxinas, mientras que durante la fase de regeneración se necesitan citoquininas (Vural et al., 2019). Sin embargo, para mejorar la tasa de éxito de la inducción de callos y la regeneración de la planta es importante estudiar los efectos de diversos tipos de medios basales y otros factores que permitan desarrollar una mayor especificidad para cada cultivo (Soriano et al., 2013; Yücesan et al., 2015).

El presente estudio tuvo como objetivo investigar las mejores condiciones para el cultivo de anteras de *P. peruviana* L., evaluando métodos de esterilización superficial de botones florales, los estadios de las microsporas en relación con el desarrollo de los botones florales y el desarrollo de las anteras en cuatro medios de cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal** Las plantas de *P. peruviana* L. (ecotipo Colombiano) fueron cultivadas en la estación experimental Chachapoyas, de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de

Mendoza, Perú (6° 14' S, 77° 51' W). Para la recolección de botones florales se identificaron plantas vigorosas, con menor longitud de entrenudos y sin signos visibles de patógenos.

**Caracterización biométrica de botones florales y estado de desarrollo del polen** Se recolectaron 232 botones florales de diferentes tamaños (antes de la floración y en antesis), y luego se realizó una caracterización biométrica (peso, longitud polar y diámetro ecuatorial). Los datos se procesaron para agruparlos según la longitud polar (intervalo de confianza al 95 %).

Para determinar el estado de desarrollo de las microsporas del grano de polen en cada uno de los ocho grupos formados, los botones florales se sumergieron en un fijador compuesto por etanol y ácido acético glacial (relación 3:1) a temperatura ambiente durante 24 horas. Luego, las anteras se seccionaron, tiñeron con acetocarmín al 2 % y, mediante la técnica de *squash* (Marcela et al., 2010), fueron aplastadas para ser observados bajo un microscopio (Leica DM2000 LED) equipado con una cámara digital (Leica MC170 HD).

**Esterilización del botón floral** Inicialmente, los botones florales se lavaron con detergente y agua destilada estéril. En un primer experimento, se evaluaron tratamientos de esterilización superficial con seis combinaciones de tiempos de inmersión en etanol y NaClO (Cuadro 1). Cada combinación recibió dos gotas de Tween 20. Al finalizar, cada tratamiento fue enjuagado tres veces con agua destilada estéril.

Las anteras fueron sembradas en medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con sacarosa (30 g·L<sup>-1</sup>) y agar (6 g·L<sup>-1</sup>), con pH ajustado a 5,8. Los cultivos se incubaron a 24 °C y fotoperiodo de 16 horas luz. Luego de 15 días, se evaluó el porcentaje de contaminación, oxidación y anteras viables.

**Cultivo *in vitro* de anteras** Se utilizaron botones florales de las categorías que mostraron el mayor porcentaje de microsporas en el polen en estado uninucleado tardío. Los botones florales se sometieron a un pretratamiento que consistió en la incubación en oscuridad a 4 °C durante 24 horas (Ari et al., 2016). Luego, se esterilizaron superficialmente siguiendo el tratamiento con la mejor respuesta a los métodos de esterilización (tratamiento T5).

**Cuadro 1.** Tratamientos para la esterilización de botones florales en *Physalis peruviana*

Tratamiento	Tiempo de inmersión (min)	
	Etanol (70 %)	NaClO (2 %)
T1	1,5	5
T2	1,5	15
T3	1,5	30
T4	3	5
T5	3	15
T6	3	30

En condiciones asépticas, las anteras fueron sembradas en cuatro medios basales con vitaminas,

MS (Murashige y Skoog, 1962), B5 (Gamborg et al., 1968), LS (Linsmaier y Skoog, 1965) y N6 (Chu et al., 1975) (Cuadro 2), todos ellos suplementados con sacarosa (30 g.L<sup>-1</sup>) y agar (6 g.L<sup>-1</sup>), pero sin reguladores de crecimiento. El pH se ajustó a 5.8 (NaOH 1N y/o HCl 1N) y se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 120 °C (~1 kgf cm<sup>-2</sup>). Los explantes se cultivaron en una incubadora a 24 °C. Las anteras fueron evaluadas con intervalos semanales y se registró el porcentaje de oxidación, de formación de callos y días a la formación de estadios embrionarios.

**Cuadro 2.** Composición de cuatro medios usados para el cultivo *in vitro* de anteras de *Physalis peruviana*

	Concentración (mgL <sup>-1</sup> )			
	Medio N6	Medio LS	Medio MS	Medio B5
<b>Micronutrientes</b>				
FeNaEDTA	36,7	36,7	36,7	36,7
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	--	0,025	0,025	0,025
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	--	0,025	0,025	0,025
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,6	6,2	6,2	3,0
KI	0,8	0,83	0,83	0,75
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	3,33	16,9	16,9	10,0
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,5	8,6	8,6	2,0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	--	0,25	0,25	0,25
<b>Macronutrientes</b>				
CaCl <sub>2</sub>	125,33	332,02	332,02	113,23
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	400,0	170,0	170,0	--
KNO <sub>3</sub>	2830,0	1900,0	1900,0	2500,0
MgSO <sub>4</sub>	90,27	180,54	180,54	121,56
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	--	--	--	130,44
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	--	1650,0	1650,0	--
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	463,0	--	--	134,0
<b>Vitaminas</b>				
Tiamina HCl	1,0	0,4	0,1	10,0
Myo-inositol	--	100,0	100,0	100,0
Glicina	2,0	--	2,0	--
Ácido nicotínico	0,5	--	0,5	1,0
Piridoxina HCl	0,5	--	0,5	1,0

N6 (Chu et al., 1975); LS (Linsmaier y Skoog, 1965); MS (Murashige y Skoog, 1962); B5 (Gamborg et al., 1968)

**Diseño experimental y análisis de datos.** Los ensayos de esterilización superficial de botones florales y cultivo *in vitro* de anteras se realizaron bajo diseños completamente al azar. El primer experimento constó de seis tratamientos, mientras que el segundo se conformó de cuatro. Cada tratamiento tuvo 10 repeticiones, tomando como unidad experimental una placa de Petri con 20 anteras.

Los datos se sometieron a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ( $P \leq 0,05$ ) debido a

que no cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Los análisis se realizaron con el programa InfoStat, versión 2018.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Caracterización biométrica de botones florales y estado de desarrollo del polen.** La caracterización biométrica de los botones florales de *P. peruviana* (Cuadro 3) permitió conformar ocho categorías (por longitud polar) que clasifican

el estado de desarrollo de las microsporas en el polen (Cuadro 4). Los botones florales de categoría I (5,57 – 6,33 mm) presentaron anteras en estado de tétrada (Figura 1A), mientras que en la VII y VIII se observó polen maduro (Figura 1F). El estado uninucleado tardío se presentó principalmente en botones florales de las categorías IV y V (7,85-9,37 mm), y fueron estos los seleccionados como material inicial.

Un factor importante al iniciar el cultivo de anteras es determinar la etapa más apropiada para la recolección de botones florales. Estudios realizados con especies como *Brassica oleracea* y *Vasconcellea pubescens* han demostrado que los estadios de las microsporas varían con el desarrollo de los botones florales y que no existe un tamaño

estándar para su recolección (Winarto y Teixeira da Silva, 2011; Chong-Pérez et al., 2018; Anitasari et al., 2019).

El éxito en la respuesta androgénica responde solo a etapas específicas del estado de desarrollo de las microsporas (Babbar et al., 2004; Qi et al., 2011), debido a que el cambio androgénico está vinculado a su estadio y la división celular que experimentan, que pueden ser potenciados por la influencia de factores externos (Salas et al., 2012; Soriano et al., 2013). Por lo tanto, el estudio de la correlación entre los estadios de las microsporas y la madurez de los botones florales servirá como un marcador para su selección en el inicio del cultivo de anteras (Muniraja et al., 2018).

**Cuadro 3.** Intervalos de confianza según la longitud polar del botón floral, y promedios de la caracterización biométrica en *Physalis peruviana*

Categoría	Intervalo de confianza (95 %)	Longitud polar (mm)	Diámetro ecuatorial (mm)	Peso (g)
I	[5,57 - 6,33]	6,09 ± 0,28	3,73 ± 0,15	0,03 ± 0,00
II	[6,33 - 7,09]	6,67 ± 0,22	4,21 ± 0,13	0,04 ± 0,00
III	[7,09 - 7,85]	7,52 ± 0,22	4,66 ± 0,16	0,05 ± 0,00
IV	[7,85 - 8,61]	8,25 ± 0,21	5,26 ± 0,16	0,06 ± 0,00
V	[8,61 - 9,37]	8,99 ± 0,22	5,64 ± 0,13	0,08 ± 0,00
VI	[9,37 - 10,13]	9,71 ± 0,20	6,18 ± 0,14	0,09 ± 0,00
VII	[10,13 - 10,89]	10,40 ± 0,23	6,66 ± 0,13	0,10 ± 0,00
VIII	[10,89 - 11,65]	11,40 ± 0,16	7,09 ± 0,18	0,12 ± 0,00

**Cuadro 4.** Distribución del estado de desarrollo de microsporas en el polen de anteras en las diferentes categorías según el tamaño de botones florales en *Physalis peruviana*

Categoría	Estado de microsporas en las anteras					
	Tétrada (%)	Uninucleado temprano (%)	Uninucleado tardío (%)	Binucleado temprano (%)	Binucleado tardío (%)	Polen maduro (%)
I	100,0	--	--	--	--	--
II	75,0	25,0	--	--	--	--
III	--	85,7	14,3	--	--	--
IV	--	22,5	77,5	--	--	--
V	--	--	80,3	13,6	1,5	4,6
VI	--	--	36,6	12,2	12,2	39,0
VII	--	--	--	--	--	100,0
VIII	--	--	--	--	--	100,0

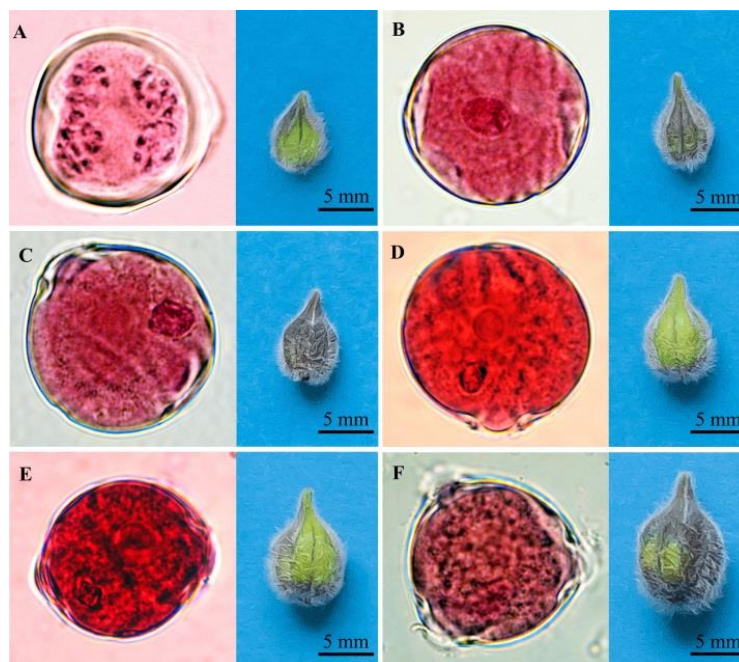
#### Esterilización superficial de botones florales

El tratamiento de esterilización mostró diferencias significativas (Cuadro 5). Sumergir los botones florales en etanol 70 % durante 3 min, y luego en NaClO 2 % por 15 min permitió registrar los más

bajos niveles de oxidación (10%) y contaminación (20 %), así como el mayor porcentaje de anteras viables (70 %). Resultados similares se obtuvieron en la esterilización de estas mismas estructuras de *Solanum goniocalyx*, con explantes 100 % libres de

contaminación bacteriana o fúngica (Hernández y Díaz, 2019). La esterilización del explante es un aspecto crítico en el cultivo de tejidos, ya que la

presencia de microorganismos contaminantes afecta tanto la viabilidad como su desarrollo (García et al., 2015).



**Figura 1.** Estado de desarrollo de microsporas en anteras de *Physalis peruviana*. (A) Tétrada, (B) Uninucleado temprano, (C) Uninucleado tardío, (D) Binucleado temprano, (E) Binucleado tardío y (F) Polen maduro

**Cuadro 5.** Respuestas a los tratamientos de esterilización de botones florales en *Physalis peruviana*

Tratamiento	Oxidación	Contaminación	Anteras viables
	(%)		
T1	10,0 c	68,0 a	22,0 cd
T2	10,0 c	50,0 ab	40,0 b
T3	70,0 a	20,0 c	10,0 d
T4	20,0 b	40,0 b	40,0 b
T5	10,0 c	20,0 c	70,0 a
T6	50,0 ab	20,0 c	30,0 c

Promedios con letras distintas en cada columna indican diferencia significativa (Kruskal-Wallis,  $P \leq 0.05$ ). Definición de tratamientos T1, T2, T3, T4, T5 y T6 según el Cuadro 1

Otro de los factores a considerar es la oxidación de los explantes, que se produce por la reacción de los fenoles presentes en el tejido y hace que las paredes de la antera tomen un color marrón (Kiviharju, 2009; Vélez et al., 2010; Chico-Ruíz y Gonzales-Zavaleta, 2018). Durante este cambio de coloración, en el tejido se liberan compuestos tóxicos, que no permiten el desarrollo embrionario (Custodio et al., 2005).

**Inducción de callos embrionarios** El análisis reveló que el medio tiene efecto significativo sobre la inducción de callos y la regeneración de la planta (Cuadro 6). Luego de 30 días, en el 90 % de anteras cultivadas en medio B5 se observó la presencia de callos; a partir del día 35 de cultivo, ocurrió la formación de embriones globulares (Figura 2B), y en los siguientes 25 días crecieron y se desarrollaron pasando por los estados de corazón,

torpedo (Figura 2C) y cotiledonar (Figura 2D). De todos los medios probados, los resultados muestran que luego de 75 días de cultivo los callos inducidos de los medios B5 y LS permitieron regenerar la planta (Figura 2E). Los medios N6 y MS no lograron inducir la formación de callos.

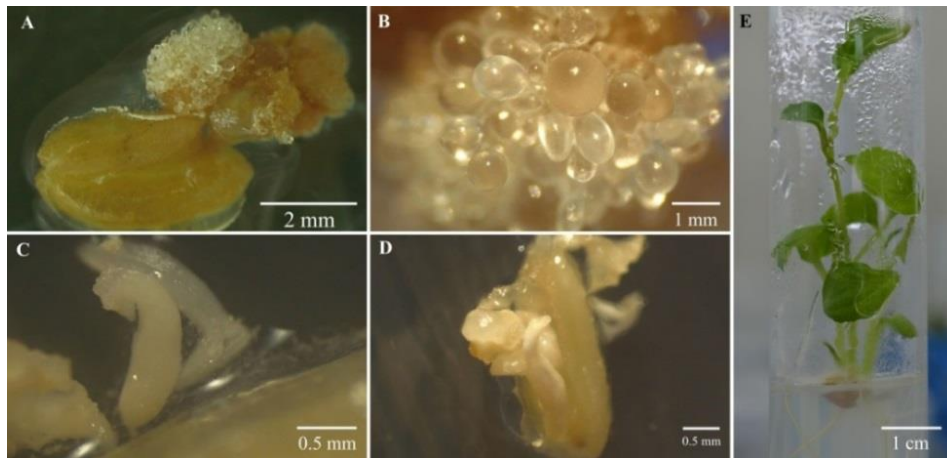
La producción y desarrollo de embriones están influenciados por factores, como el genotipo, la composición del medio, el uso de diferentes tipos y concentraciones de fitohormonas de crecimiento (Koleva-Gudeva et al., 2007; Escobar-Guzmán et al., 2009; Hernández y Díaz, 2019). Además, el estado de desarrollo de las microsporas en el polen tiene un papel fundamental para mejorar la eficiencia en la obtención de callos embriogénicos

(Burbulis et al., 2005; Cistué et al., 2006). Sin embargo, no todas las anteras lograron formar embriones debido a su variabilidad en las tasas de reprogramación celular y adquisición de totipotencia (Kim et al., 2004; Testillano, 2019). También se debe mencionar que la capacidad regenerativa puede presentarse en distintos periodos, por ejemplo, Suescún et al. (2011) obtuvieron estructuras en estado cotiledonar en un periodo de 90 días. Los resultados de este estudio destacan la importancia de evaluar las composiciones de los medios de cultivo, ya que no existe un protocolo universal en las técnicas de cultivo de anteras.

**Cuadro 6.** Porcentaje de oxidación, formación de callos, estadios embrionarios y regeneración de plantas en cuatro medios para cultivo de anteras en *Physalis peruviana*

Medio de cultivo	Oxidación	Formación de callos	Estado globular	Estado torpedo	Estado cotiledonar	Formación de planta
B5	10,0 ns	90,0 a	90,0 a	95,0 a	95,0 a	95,0 a
LS	15,0 ns	20,0 b	10,0 b	10,0 b	10,0 b	10,0 b
MS	20,0 ns	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 b
N6	25,0 ns	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 b

Promedios con letras distintas en cada columna indican diferencia significativa (Kruskal-Wallis,  $P \leq 0,05$ )



**Figura 2.** Cultivo de anteras de *Physalis peruviana*. (A) antera con ruptura de la pared e inducción de callos, (B) Embrión en estado globular, (C) Embrión en estado torpedo, (D) Embrión en estado cotiledonar y (E) Regeneración de la planta

## CONCLUSIONES

Los estadios de las microsporas del polen en *Physalis peruviana* están relacionados con el desarrollo de los botones florales, lo que implica que la caracterización realizada podría ayudar a determinar el tamaño apropiado para su recolección. Los botones florales registraron el

menor nivel de contaminación (10%) al esterilizarlos con etanol por 3 minutos y NaClO por 15 minutos. Asimismo, se confirmó que la composición del medio de cultivo es un componente crítico para determinar el éxito en el proceso de androgénesis de cultivo de anteras de *Physalis peruviana*. El medio nutritivo B5 produjo los mejores resultados en la formación de

embriones y regeneración de la planta, demostrando su eficiencia en la formación de callos, embriones y plantas sin necesidad de ser complementado con reguladores de crecimiento.

### AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen el financiamiento obtenido al el proyecto CUI N° 2252878 “Creación del Servicio de un Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas”, ejecutado por el Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva.

### LITERATURA CITADA

1. AboShama, H.M. y M.M. Atwa. 2019. Anther Culture in Potato (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro*. Journal of Plant Biochemistry & Physiology 7(4): 244.
2. Anitasari, S.D., I.A. Astarini, M.R. Defiani, M. Pharmawati y D.C. Prayantini. 2019. Pollen Viability and Microspore Culture in Three Broccoli Cultivars (*Brassica oleracea* L. var. Italica Plenck). Jurnal Biota 5(2): 118-127.
3. Ari, E., T. Yildirim, N. Mutlu, S. Buyukalaca, Ü. Gokmen y E. Akman. 2016. Comparison of different androgenesis protocols for doubled haploid plant production in ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.). Turkish Journal of Biology 40(1): 944-954.
4. Babbar, S.B., P.K. Agarwal, S. Sahay y S.S. Bhojwani. 2004. Isolated microspore culture of *Brassica*: An experimental tool for developmental studies and crop improvement. Indian Journal of Biotechnology 3: 185-202.
5. Bonilla, H., Y. Carbajal, M. Siles y A. López. 2019. Diversidad genética de tres poblaciones de *Physalis peruviana* a partir del fraccionamiento y patrón electroforético de proteínas de reserva seminal. Revista Peruana de Biología 26(2): 243-250.
6. Burbulis, N., A. Blinstrubiene, A. Sliesaravicius y E. Venskutoniene. 2005. Influence of genotype, growth regulators, sucrose level and preconditioning of donor plants on flax (*Linum usitatissimum* L.) anther culture. Acta Biologica Hungarica 56(3-4): 323-331.
7. Chico-Ruíz, J. y O. Gonzales-Zavaleta. 2018. Efecto del ácido naftalenacético y 6-bencilaminopurina en la inducción de callos embriogénicos en anteras de *Carica papaya* L. variedad criolla. Journal of High Andean Research 20(4): 401-408.
8. Chong-Pérez, B., B. Carrasco, H. Silva, F. Herrera, K. Quiroz y R. García-Gonzales. 2018. Regeneration of highland papaya (*Vasconcellea pubescens*) from anther culture. Applications in Plant Sciences 6(9): e01182.
9. Chu, C.C., C.C. Wang, C.S. Sol, C. Hsu, K.C. Yin, Y.C. Chu y F.Y. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Scientia Sinica 85: 659-668.
10. Cistué, L., M. Soriano, A.M. Castillo, M.P. Vallés, J.M. Sanz y B. Echávarri. 2006. Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture. Plant Cell Reports 25(4): 257-264.
11. Custodio, L., M.F. Carneiro y A. Romano. 2005. Microsporogenesis and anther culture in carob tree (*Ceratonia siliqua* L.). Scientia Horticulturae 104(1): 65-77.
12. Escobar-Guzmán, R.E., F. Hernández-Godínez, O. Martínez de la Vega y N. Ochoa-Alejo. 2009. *In vitro* embryo formation and plant regeneration from anther culture of different cultivars of Mexican husk tomato (*Physalis ixocarpa* Brot.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 96(2): 181-189.
13. Fischer, G., P.J. Almanza-Merchán y D. Miranda. 2014. Importancia y cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). Revista Brasileira de Fruticultura 36(1): 1-15.
14. Gamborg, O.L., R.A. Miller y K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research 50: 151-158.
15. García, D.L., M.L. Ocampo y N. Mesa. 2015. Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de *Aspidosperma polyneuron*. Revista Colombiana de Biotecnología 17(2): 76-84.
16. García-Arias, F., E. Sánchez-Betancourt y V. Núñez. 2018. Fertility recovery of anther-

- derived haploid plants in Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *Agronomía Colombiana* 36(3): 201-209.
17. Hernández, A.D. y H. Díaz. 2019. Inducción *in vitro* de callo embriogénico a partir del cultivo de anteras en “papa amarilla” *Solanum goniocalyx* Juz. & Bukasov (Solanaceae). *Arnaldoa* 26(1): 277-286.
18. Humphreys, D.G. y R.E. Knox. 2015. Doubled haploid breeding in cereals. *In: Al-Khayri, J.M., S.M. Jain y D.V. Johnson (eds.). Advances in Plant Breeding Strategies: Breeding, Biotechnology and Molecular Tools.* Springer International Publishing. pp. 241-290.
19. Kim, M., J. Kim, M. Yoon, D.-I. Choi y K.-M. Lee. 2004. Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77(1): 63-72.
20. Kiviharju, E.M. 2009. Anther culture derived doubled haploids in oat. *In: A. Touraev, B.P. Forster y S.M. Jain (eds.). Advances in Haploid Production in Higher Plants.* Springer Netherlands. pp. 171-178.
21. Koleva-Gudeva, L.R., M. Spasenovski y F. Trajkova. 2007. Somatic embryogenesis in pepper anther culture: The effect of incubation treatments and different media. *Scientia Horticulturae* 111(2): 114-119.
22. Linsmaier, E.M. y F. Skoog. 1965. Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 18: 100-127.
23. Marcela-Delgado, L., M. Uribe-Lastra y M.L. Murulanda. 2010. Estandarización de la técnica citogenética "SQUASH" para conteo de cromosomas mitóticos en *Rubus glaucus* Benth. *Scientia Et Technica* 17(46):74-79.
24. Muniraja, M., G. Vijayalakshmi, M. Lakshmiopathi Naik, V. Vijaya Bhaskar y P.S. Sha Valli Khan. 2018. A developmental study on anther wall and pollen in *Mangifera indica* L. var. Beneshan (Anacardiaceae). *South African Journal of Botany* 119: 142-153.
25. Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 15(3): 473-497.
26. Pérez, N., M.C. Gonzáles, R.I. Castro y M. Aguilar. 2016. Agronomic characterization of three rice (*Oryza sativa* L.) cultivars obtained by *in vitro* anther culture. *Cultivos Tropicales* 37(1): 110-115.
27. Puente L., D. Nocetti y A. Espinosa. 2019. *Physalis peruviana* Linnaeus, an update on its functional properties and beneficial effects in human health. *In: A. Mariod (ed.). Wild Fruits: Composition, Nutritional Value and Products.* Springer Cham. New York. pp 447-463
28. Qi, Y.Q., Y. Ye y M. Bao. 2011. Establishment of plant regeneration system from anther culture of *Tagetes patula*. *African Journal of Biotechnology* 10(75): 17332-17338.
29. Salas, P., A. Rivas-Sendra, J. Prohens y J.M. Seguí-Simarro. 2012. Influence of the stage for anther excision and heterostyly in embryogenesis induction from eggplant anther cultures. *Euphytica* 184(2): 235-250.
30. Silva, D.F., R. Pio, P.V. Nogueira, P.A. de O. Silva y A.I. Figueiredo. 2017. Viabilidade polínica e quantificação de grãos de pólen em espécies de fisális. *Revista Ciência Agronômica* 48(2): 365-373.
31. Soriano, M., H. Li y K. Boutilier. 2013. Microspore embryogenesis: establishment of embryo identity and pattern in culture. *Plant Reproduction* 26: 181-196.
32. Suescún, L., É. Sánchez, M. Gómez, F. García y V. Núñez. 2011. Producción de plantas genéticamente puras de uchuva. Cámara de Comercio de Bogotá. Edit. Kimpres. Bogotá.
33. Testillano, P.S. 2019. Microspore embryogenesis: Targeting the determinant factors of stress-induced cell reprogramming for crop improvement. *Journal of Experimental Botany* 70(11): 2965-2978.
34. Vélez, M.V., A.R. Robledo, T.C. Corona, V.H.A. Aguilar, P. Ramírez y J. Suárez. 2010. Obtaining haploid plants from miahuateco chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1(2): 189-201.
35. Vural, G.E., E. Ari, S. Zengin y S.S. Ellialtioglu. 2019. Development of Androgenesis Studies on Eggplant (*Solanum melongena* L.) in Turkey from Past to Present. *In: M. Hasanuzzaman, M. Filho, M. Fujita y T.*



- Nogueira (eds.). Sustainable Crop Production. IntechOpen. pp. 1-26.
36. Winarto, B. y J.A. Teixeira da Silva. 2011. Microspore culture protocol for Indonesian *Brassica oleracea*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 107: 305-315.
37. Yücesan, B.B., A. Mohammed, M. Arslan y E. Gürel. 2015. Clonal propagation and synthetic seed production from nodal segments of Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.), a tropical fruit plant. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 39: 797-806.

