

## Métodos utilizados para la selección de parentales en pre-mejoramiento genético de plantas

Ayerin Carrodegua-Gonzalez<sup>1\*</sup> 

Andrés Zúñiga-Orozco<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Hortícolas Lilliana Dimitrova, Mayabeque, Cuba

<sup>2</sup>Escuela de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Estatal a Distancia. Apdo. 474-2050, San Pedro, San José, Costa Rica

\*Autor para correspondencia: [ayerim2009@gmail.com](mailto:ayerim2009@gmail.com)

### RESUMEN

Un paso clave en la etapa de pre-mejoramiento genético en plantas es la selección de cultivares con características deseables para utilizarlos como progenitores y poder desarrollar nuevas variedades de cultivos. Con el desarrollo de la tecnología ha sido posible el surgimiento de numerosas técnicas de laboratorio que son herramientas clave para los programas de mejora y así poder ahorrar tiempo y recursos. Por dichas razones el objetivo de esta revisión fue describir las técnicas basadas en estudios citológicos y citogenéticos que son factibles para la selección de parentales durante la etapa de pre-mejoramiento. Entre las técnicas citológicas abordadas en esta revisión se encuentran: viabilidad y calidad del polen, receptividad estigmática para conocer el tiempo en que el estigma se encuentra receptivo y crecimiento del tubo polínico para estudiar eventos de incompatibilidad. Otro de los pasos clave en el pre-mejoramiento es determinar el número cromosómico de los progenitores, lo cual es posible por las diferentes técnicas de citogenética clásica (estudios durante mitosis y meiosis) y molecular (citometría de flujo, Hibridación Fluorescente *In Situ* e Hibridación Genómica *In Situ*) que se abordan en esta revisión.

**Palabras clave:** biotecnología, cariotipado, citogenética, incompatibilidad, viabilidad del polen

Recibido: 02/03/2021

Aceptado: 10/11/2021

## INTRODUCCIÓN

Desde que se iniciaron las actividades agrícolas, hace más de 10 000 años, el hombre ha manipulado la estructura genética de las plantas y animales, a través de numerosos ciclos de selección de los individuos mejores adaptados. Lo anterior ha traído consigo que la mayoría de las plantas que hoy en día se cultivan, sean distintas de sus antepasados silvestres <sup>(1)</sup>.

Actualmente, los objetivos de los mejoradores, en comparación con nuestros agricultores antepasados, siguen teniendo la misma misión; es decir, producir cultivos con mayor rendimiento, más resistentes y de mejor adaptación a las distintas localidades.

Uno de los principales requisitos para comenzar un programa de mejora es contar con la variabilidad genética necesaria para identificar genotipos potenciales para su uso como progenitores. Numerosos factores favorecen la diversidad genética, tales como: la reproducción sexual; las mutaciones; el flujo genético y, por supuesto, la acción del hombre mediante la selección artificial e hibridación <sup>(2,3)</sup>.

Después de generar variabilidad genética, el siguiente paso es discriminar entre la variabilidad, con el fin de identificar y seleccionar individuos con características deseables para desarrollar nuevos cultivares potenciales, a eso le llamamos selección artificial. En la naturaleza, la selección natural se encarga de favorecer en las especies los genotipos más adaptados al ambiente. En la mejora genética, ocurre lo mismo, pero en este caso el mejorador es el encargado de seleccionar los genotipos que muestren mayor rendimiento o beneficios. En los primeros años del mejoramiento genético, la selección consistía en la observación del comportamiento de las plantas y la posterior elección de las que presentaran mejores atributos, lo anterior se apoyaba con distintos elementos de biología, matemática y estadística. Con el paso del tiempo y el avance de la tecnología, surgieron un gran número de técnicas que facilitan el trabajo de selección.

Los fitomejoradores convencionales, con el objetivo de ahorrar recursos y tiempo, planifican cuidadosamente los cruzamientos para generar la mayor variabilidad posible <sup>(4)</sup>; por tanto, es relevante determinar la dirección de los cruzamientos; o sea, qué variedades o líneas van a ser utilizadas como padre o como madre. Las variedades que van a ser utilizadas como donadoras de polen deben contar con polen de alta calidad y viabilidad, parámetros que se evalúan con estudios de viabilidad de polen <sup>(5)</sup>. Asimismo, se debe saber el momento adecuado para realizar las polinizaciones y que el polen pueda germinar en el estigma del progenitor femenino, lo que hace necesario los estudios de receptividad estigmática <sup>(6)</sup>.

Otro de los factores de gran importancia en la selección es el conocimiento sobre el número cromosómico, debido a que diferencias en la ploidía pueden evitar la reproducción sexual y, por tanto, la obtención de semillas. Aunque no siempre es así, en algunos casos sí puede ocurrir la fertilización y obtenerse genotipos de otros niveles de ploidía con un comportamiento diferencial en cuanto al carácter que se evalúa. Los estudios de cariotipo pueden realizarse por la disciplina conocida como citogenética, que se divide en citogenética clásica cuando se analizan los cromosomas bajo microscopio mediante tinciones o citogenética molecular, cuando se aplican diferentes métodos de la biología molecular <sup>(7)</sup>.

Debido a lo antes expuesto, el objetivo de esta revisión es exponer las técnicas basadas en estudios citológicos y citogenéticos que son factibles para la selección de parentales, durante la etapa de pre-mejoramiento.

## **Aspectos relacionados con la calidad y la viabilidad del polen**

Uno de los pasos fundamentales en un programa de mejora es determinar qué variedades o especies se van a utilizar como donadoras de polen, lo que convierte en un parámetro de gran importancia, la medida de la calidad del polen de los posibles parentales <sup>(5)</sup>. En cuestión de ahorro de tiempo y recursos, no es recomendable utilizar polen de individuos que presenten baja viabilidad polínica <sup>(4)</sup>.

Dicho lo anterior, los estudios encaminados a estudiar la calidad y la viabilidad son necesarios para asegurar el éxito de las hibridaciones e incrementar la eficiencia, sobre todo en las condiciones del trópico cálido y húmedo, donde la viabilidad se puede ver fuertemente afectada por condiciones ambientales <sup>(8)</sup>. Además de la importancia de estos estudios en el mejoramiento genético, también pueden ser muy útiles para determinar parámetros fisiológicos, como vigor del polen durante el almacenamiento, capacidad de germinación después de la exposición a determinadas condiciones, estudiar su interacción con el estigma y fertilidad y determinar la dispersión y flujo de genes <sup>(5)</sup>.

La viabilidad del polen es un parámetro fuertemente influenciado por condiciones ambientales como la temperatura, el grado de humedad, la composición de la atmósfera y la presión parcial de oxígeno y por diversos factores internos como: la duración de la microsporogénesis; la variabilidad genética interespecífica o el metabolismo; el número y la funcionalidad de los núcleos; la protección y la exposición dentro de las anteras; la humedad relativa y la temperatura al momento de la dispersión <sup>(5,9-11)</sup>.

Existen diferentes técnicas para medir la viabilidad del polen, las cuales se clasifican en métodos *in vivo* e *in vitro*. Los métodos *in vivo* son mucho más exactos y fiables, pero los más utilizados son los métodos *in vitro*, porque son más sencillos y rápidos de realizar <sup>(12)</sup>. La elección de un método u otro dependerá de la especie objeto de estudio y de los objetivos finales de la investigación. Debido a lo explicado anteriormente muchos estudios tuvieron como objetivo distinguir los métodos más apropiados para estimar viabilidad del polen. Tal es el caso de un estudio realizado en polen de trigo <sup>(13)</sup>; en dicho experimento, la tinción de Alexander no pudo discriminar entre polen fresco viable y polen no viable. La germinación *in vitro* del polen fue menor, en comparación con la viabilidad del polen evaluada por DAF y la citometría de flujo. Por tanto, es recomendable optar por un enfoque combinado de germinación *in vitro* con DAF o citometría de flujo, para analizar correctamente el potencial de germinación y la viabilidad del polen para el caso del trigo.

En otro estudio realizado, se compararon los métodos de cloruro de trifetil tetrazolio (TTC) y germinación *in vitro* para medir la viabilidad de polen de *Cistus creticus* L. y *C. monspeliensis* <sup>(14)</sup>. Se obtuvieron diferencias significativas entre ambas pruebas y se llegó a la conclusión de que es más apropiada la prueba de germinación *in vitro* para el caso de estas especies. Los resultados anteriores indican que el primer caso para estimar la

viabilidad del polen en una especie, es determinar cuál es el método más adecuado porque puede ser diferente en cada investigación.

### **Técnicas para estimar la viabilidad del polen**

El método más preciso, hasta el momento, para determinar viabilidad del polen, es la germinación *in vivo*, mediante el cual se evalúa la elongación del tubo polínico para llevar a cabo su función como polinizador y el número de semillas producidas, en relación con la viabilidad del polen; sin embargo, es necesario esperar la formación de las semillas, lo cual ralentiza el ensayo y puede ser un problema cuando se requiere una evaluación rápida <sup>(15)</sup>.

Entre los métodos *in vitro* más utilizados para evaluar la calidad del polen se encuentran las técnicas de tinción para observar el contenido citoplasmático (carmin acético, orceína acética, fármaco Alexander), los test enzimáticos (bencidina, sales de tetrazolio) y los métodos combinados que permiten determinar la integridad de la membrana plasmática y la presencia de actividad enzimática (reacción fluorocromática mediante diacetato de fluoresceína, DAF) y por último las pruebas de germinabilidad <sup>(12)</sup>.

Las pruebas de germinabilidad *in vitro* implican inducir la formación del tubo polínico en un medio artificial, lo cual es un indicio de viabilidad porque revela el estado de las membranas, núcleos y la tasa de conversión de las reservas <sup>(5)</sup>. Sin embargo, la germinación *in vitro* depende del genotipo, condiciones ambientales, madurez del polen, composición y pH del medio. Por las razones antes expuestas es necesario determinar las condiciones óptimas para la germinación del polen de cada especie <sup>(16)</sup>. Los medios de cultivos en condición líquida y sólida, enriquecidos con sacarosa, calcio o boro son componentes de importancia para la germinación, por lo cual, los ensayos a diferentes concentraciones de estos nutrientes son relevantes para la ejecución de pruebas de viabilidad <sup>(17)</sup>.

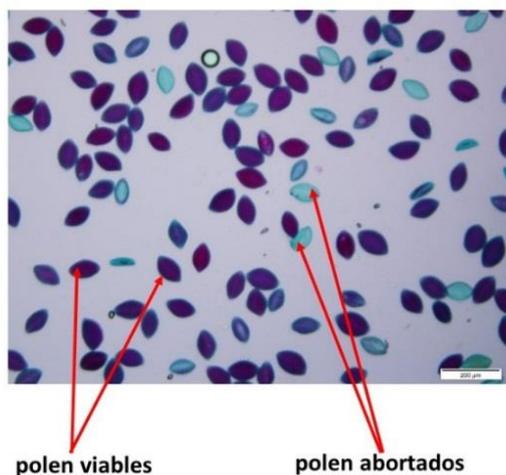
Con el objetivo de facilitar a los investigadores la elección de los componentes del medio de cultivo, investigadores de la universidad de Regensburg, Alemania, realizaron un compendio que incluye 1572 recetas de medios de cultivo utilizados con éxito para germinar granos de polen o producir tubos polínicos en 816 especies que representan 412 géneros y 114 familias (tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas) <sup>(18)</sup>. Entre los 110 componentes registrados de las diferentes recetas, los más comunes son: sacarosa (89 % de las especies),  $H_3BO_3$  (77 %),  $Ca^{2+}$  (59 %),  $Mg^{2+}$  (44 %) y  $K^+$  (39 %).

### **Técnicas de tinción para determinar viabilidad polínica**

Los métodos de tinción detectan la presencia de citoplasma, integridad de la membrana plasmática o actividad enzimática <sup>(5)</sup>. La mayoría se basan en la afinidad de las células por determinados colorantes y, generalmente, sobreestiman la viabilidad o escasamente determinan el poder germinativo real de los granos de polen o la capacidad de extensión de los tubos polínicos, pero a su vez, son rápidos y factibles de desarrollar cuando se realizan muchos cruzamientos <sup>(19,20)</sup>. A continuación, se exponen las técnicas de tinción más utilizadas para estimar la viabilidad del polen:

**Carmín acético:** esta prueba mide la integridad del citoplasma; es decir, los granos de polen se colorean de color rojo cuando la membrana citoplasmática se encuentra íntegra y los granos de polen sin teñir se consideran no viables <sup>(21,22)</sup>. El acetocarmín sobrestima la viabilidad del polen, pero da información adicional de la morfología nuclear. En un estudio realizado en ocho accesiones de pimiento en la Universidad Federal do Piauí, Brasil, el método con una concentración del reactivo del 2 % resultó ser eficaz <sup>(23)</sup>.

**Tinción Alexander:** este método permite diferenciar el polen abortado del polen viable. Dentro de los componentes de esta solución, el colorante verde de malaquita tiñe específicamente la pared celular, mientras el ácido fucsínico penetra las células vivas y colorea el citoplasma de rojo (Figura 1). El polen abortado aparece de color verde, ya que sólo retiene su pared celular, al tiempo que los granos de polen viables presentan además una coloración rojiza en su interior <sup>(24)</sup>. El método resultó ser eficiente al estimar la viabilidad del polen en 11 especies silvestres de *Passiflora*, con una concentración del reactivo del 2 % <sup>(25)</sup>.



Se observa el polen viable con el citoplasma teñido, mientras que, en los granos de polen no viables, sólo se tiñe la pared celular (Fuente propia)

**Figura 1.** Prueba de viabilidad de polen utilizando la tinción de Alexander en *Alstroemeria* (Cartagena)

**Tripán azul:** esta prueba se basa en el hecho de que cuando la membrana plasmática de la célula está intacta, el colorante no puede introducirse al citoplasma; por tanto, los granos viables no se tiñen, mientras que los no viables se colorean de azul-violeta intenso, porque el colorante sí penetra, uniéndose a las proteínas presentes dentro de la célula. Generalmente esta tinción ha sido utilizada en estudios de viabilidad de células cultivadas <sup>(26)</sup> y recientemente ha sido aplicada para la viabilidad polínica. Este método fue aplicado para estimar la viabilidad del polen en diferentes cultivares de olivo, los autores reportaron una correlación significativa entre germinabilidad y este test de viabilidad, lo que indica que es adecuado en el caso de esta especie <sup>(12)</sup>.

### Técnicas para comprobar actividad enzimática en el polen

Las técnicas que se exponen a continuación permiten detectar la existencia de actividad enzimática en el polen, mediante cambios de coloración en las células:

**Sal de tetrazolium:** este método se basa en el uso del compuesto (cloruro de 2, 3, 5,-trifenil-tetrazolio), el cual, en los procesos de reducción de las células vivas, toma el hidrógeno liberado por las enzimas deshidrogenasas y forma una sustancia roja, estable y no difusible, el trifenil-formazan. Por tanto, el polen viable que tiene actividad deshidrogenasa se tiñe de color rojo, mientras que el no viable no logra teñirse <sup>(27)</sup>. Este método fue utilizado para analizar los efectos de las bajas temperaturas de almacenamiento sobre la calidad del polen obtenido de cuatro cultivares de cereza dulce, mostrando resultados satisfactorios con una concentración del reactivo del 1 % <sup>(28)</sup>.

**Parafenilendiamina:** esta prueba utiliza como reactivo la parafenilendiamina (p-fenilendiamina) y se basa en la detección de la presencia de peroxidasas <sup>(5)</sup>. Los granos de polen que se tiñen de color café oscuro son considerados viables, los de color café claro, no viables. Se recomienda para futuros trabajos, realizar una cartilla donde se relacione el color de los granos de polen con el porcentaje de germinación obtenido en una muestra determinada, ya que la coloración puede variar con el tiempo de almacenamiento, según los resultados obtenidos por García en *Nothofagus nervosa* <sup>(4)</sup>.

### **Métodos combinados para determinar la integridad de la membrana plasmática y la presencia de actividad enzimática**

Los métodos combinados estiman la viabilidad polínica comprobando la integridad de la membrana y la presencia de actividad enzimática en el citoplasma, al mismo tiempo. A continuación, se exponen las técnicas más utilizadas:

**Reacción fluorocromática mediante DAF:** este método es uno de los más utilizados en estudios de viabilidad del polen. El DAF es un éster apolar, lo que le permite atravesar la membrana citoplasmática. Una vez dentro de la célula, el éster es hidrolizado por enzimas estererasas que se encuentran en el citoplasma y deja libre un fluorocromo, que cuando se excita con una longitud de onda adecuada (490 nm), emite fluorescencia de color verde brillante. Como el fluorocromo es polar, no puede salir a través de la membrana citoplasmática y queda retenido en las células que poseen la membrana citoplasmática intacta. Como consecuencia, sólo los granos de polen con niveles de actividad estererasa adecuados y con la membrana citoplasmática íntegra, mostrarán fluorescencia verdosa, indicativa de que estos granos son viables <sup>(29)</sup>. Este método fue aplicado con éxito para estimar la viabilidad del polen en *Flaveria bidentis* y *F. haumanii* en Santiago del Estero (Argentina) <sup>(30)</sup>.

**Reacción de diacetato de fluoresceína (FCR):** esta prueba funciona muy parecido al DAF. Los granos de polen son montados en diacetato de fluoresceína, que es un compuesto apolar que, igual al DAF, penetra rápidamente en el citoplasma polínico y es hidrolizado por estererasas, dejando libre la fluoresceína polar y fluorescente <sup>(31)</sup>.

### **Aspectos de Biología Floral de importancia para la mejora genética de plantas**

Para el mejoramiento genético clásico, basado en la selección de individuos superiores y cruzamientos dirigidos, es importante conocer aspectos de la biología floral de la especie vegetal estudiada. Para obtener

éxito en las fecundaciones, no solo es necesario estimar la calidad del polen de la especie que se utiliza como progenitor masculino, sino también en qué momento el estigma del progenitor femenino se encuentra receptivo, para lo cual se realizan estudios de receptividad estigmática. Asimismo, es necesario conocer si existe autoincompatibilidad en la especie que se trabaja, en caso de que se requiera hacer auto-polinizaciones para obtener líneas puras. Para lo anterior son necesarios los estudios del crecimiento del tubo polínico, para conocer el lugar en que ocurre la autoincompatibilidad y buscar la manera de evadir esta barrera.

## Receptividad estigmática

La receptividad estigmática refleja la capacidad del estigma para recibir el polen, permitiendo que se adhiera, se hidrate y finalmente germine <sup>(6)</sup>. La polinización consiste en la transferencia de polen desde los órganos sexuales masculinos a los órganos sexuales femeninos, pero para que este proceso ocurra, la transferencia del polen al estigma debe suceder durante el periodo en que el estigma se encuentre receptivo, en caso contrario, el polen no puede adherirse y no puede germinar <sup>(32,33)</sup>.

En la naturaleza; generalmente, una vez que las flores abren, el estigma se encuentra receptivo, pero en el caso del mejoramiento genético, muchas veces prevalece la necesidad de realizar las polinizaciones dirigidas en estados de pimpollo. Lo anterior se hace con el objetivo de realizar la polinización en el mismo momento de la castración, evitando la contaminación con granos de polen ajenos al que se utiliza como parental <sup>(6)</sup>.

En la madurez floral, cuando los estigmas están listos para la polinización, estos se caracterizan por tener gran actividad de enzimas peroxidasas; por ello, con la finalidad de determinar la receptividad del estigma, se utiliza peróxido de hidrógeno para comprobar la presencia de enzimas cuando se produce burbujeo <sup>(34)</sup> (Figura 2). Existe un criterio de puntuación para convertir la receptividad estigmática en una variable cuantitativa y así hallar la receptividad promedio por día evaluado, para lo cual se propusieron cuatro niveles de burbujeo <sup>(35)</sup>.



Se puede observar el burbujeo en la superficie del estigma, indicativo de que se encuentra receptivo (Fuente propia)

**Figura 2.** Técnica de receptividad estigmática en *Alstroemeria*, utilizando peróxido de hidrógeno

La receptividad estigmática puede verse afectada por condiciones ambientales, como la temperatura, aplicación de productos químicos y la nutrición de las plantas, aunque generalmente, en los estudios encaminados a este tema, la parte masculina ha sido la que más atención ha recibido. Se ha comprobado que, en condiciones de campo, la temperatura, a través de su efecto sobre la receptividad estigmática, afecta al periodo efectivo de polinización y al cuajado en varias especies frutales, como el albaricoquero <sup>(36,37)</sup> o kiwi <sup>(38)</sup>. En el melocotonero se demostró que en condiciones controladas la temperatura tuvo una gran influencia en la duración de la receptividad estigmática, la cual disminuye con el aumento de esta. La pérdida de receptividad estigmática se manifestó en tres procesos consecutivos: adherencia del polen al estigma, germinación y penetración en el tejido transmisor. La pérdida de estas capacidades es paulatina, primero se pierde la capacidad de penetrar el tejido transmisor; de segundo, la germinación y finalmente la adherencia del polen al estigma <sup>(39)</sup>.

### **Sistemas de incompatibilidad en las Plantas**

En la mejora genética tradicional es fundamental contar con líneas puras para realizar híbridos uniformes; sin embargo, el desarrollo de líneas puras demanda realizar autopolinizaciones, para inducir un cambio en la frecuencia alélica y lograr la homocigosis. Según lo anterior, se asume que todas las especies vegetales pueden ser capaces de autopolinizarse; sin embargo, la realidad no es así, pues la autoincompatibilidad está presente en más de la mitad de las especies de Angiospermas. En el caso de las plantas autóгамas, la obtención de líneas puras es fácil, debido a que la autopolinización ocurre a gran medida; no obstante, se plantea que tienen, a polinización abierta, un 5 % de alogamia. En las plantas alógamas producto a los mecanismos de autoincompatibilidad, muchas veces se dificulta la autopolinización <sup>(40)</sup>.

Los mejoradores recurren a diversas técnicas como la polinización entre plantas hermanas (full sibs) o medias hermanas (half sibs), retrocruces o inducción de variabilidad, realizando diseños dialélicos con diversas especies compatibles y, si lo anterior no resulta exitoso, es entonces cuando se recurre a técnicas biotecnológicas para superar barreras de auto-incompatibilidad pre o poscigóticas, inducción de haploides, entre otras.

La autopolinización no es posible, en muchas especies vegetales, debido a un mecanismo conocido como auto-incompatibilidad. Este mecanismo asegura la variabilidad genética, evitando la depresión por endogamia y promoviendo la polinización cruzada, por lo que su efectividad asegura el éxito de la evolución de las especies <sup>(41)</sup>. Como parte de la evolución, para promover la polinización cruzada, varias especies hermafroditas desarrollaron adaptaciones morfológicas como; por ejemplo, la separación espacial del pistilo y los estambres (hercogamia) y fisiológicas, como la maduración diferencial de los órganos reproductivos (dicogamia). Estas modificaciones evitan, en gran medida, la autofecundación y promueven la polinización cruzada, pero aún existe la posibilidad de flujo génico, a través del polen con los padres o con otros individuos de la progenie. Para evitar dicho suceso, un gran número de especies desarrollaron un mecanismo genético-bioquímico de reconocimiento del polen, conocido como sistema de incompatibilidad sexual (AI), el cual se define como la incapacidad de una planta hermafrodita fértil para producir cigotos después de la autopolinización <sup>(40)</sup>.

## Clasificación de los sistemas de incompatibilidad

Los sistemas de incompatibilidad han sido clasificados en función del genotipo que la determina, si está determinada por el genotipo haploide del polen, se le llama incompatibilidad gametofítica; si en cambio, es por el genotipo diploide de la planta que le da origen al polen, se le denomina incompatibilidad esporofítica <sup>(42)</sup>.

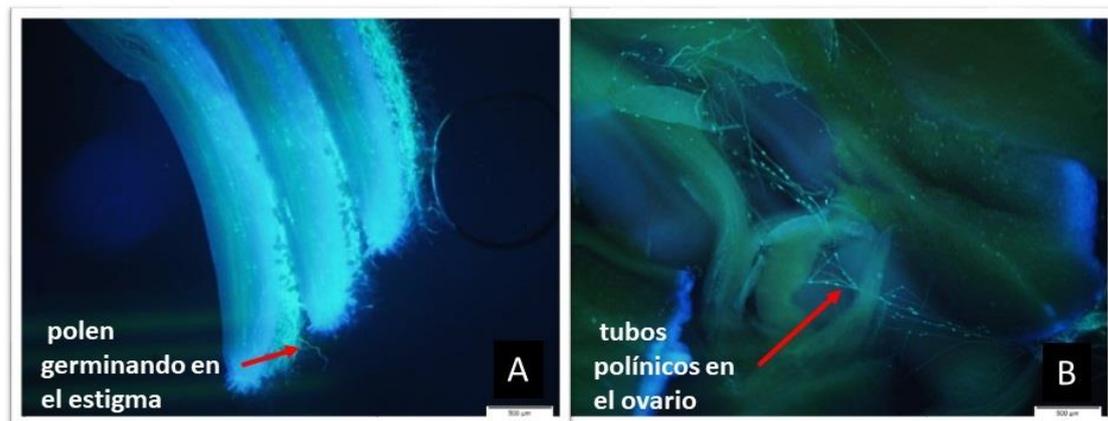
La autoincompatibilidad puede expresarse en el estigma, el estilo o en el ovario de la flor, debido a una acumulación de calosa en la punta de los tubos polínicos y, por tanto, se impide la elongación de los tubos polínicos en algún punto de su trayectoria hasta la oosfera. Esa acumulación de calosa permite diferenciar tubos polínicos compatibles e incompatibles <sup>(43,44)</sup>. En el caso de la incompatibilidad gametofítica, la interrupción del crecimiento del tubo polínico ocurre en el estilo, mientras que en la esporofítica ocurre generalmente en el estigma <sup>(41)</sup>. Existe un tercer tipo de autoincompatibilidad poco estudiado que se presenta en el ovario, conocido como autoincompatibilidad de acción tardía, que se produce por la inhibición de los tubos polínicos antes de que alcancen los óvulos, inhibición de la fecundación, rechazo post-cigótico e inhibición en el óvulo <sup>(45)</sup>.

Realizar estudios de autoincompatibilidad le permiten al mejorador economizar tiempo y recursos, por cuanto puede saber cuál ruta tomar al momento de avanzar la selección de las generaciones segregantes.

Se realizaron estudios de incompatibilidad en *Olea europea*, con el objetivo de explicar cómo ocurre la autofecundación de algunas variedades, a pesar de ser una especie con altos grados de autoincompatibilidad. Los autores sugieren que algunos determinantes de la autoincompatibilidad en el tubo polínico y el estigma son inestables y se degradan, lo que permite que los tubos polínicos puedan llegar al óvulo y fecundarlo. Con lo anterior queda explicado que la autoincompatibilidad puede que no sea absoluta y, por tanto, pueda ocurrir cierto grado de auto-fertilización <sup>(46)</sup>.

Aparte de la incompatibilidad intraespecífica descrita anteriormente, existe otro mecanismo conocido como incompatibilidad interespecífica, donde el polen es rechazado por la gran disimilitud genética entre la especie donante y la especie receptora <sup>(47)</sup>. Muchas veces esto ocurre porque el polen no puede nutrirse de la matriz extracelular del tejido materno <sup>(16)</sup> y los nutrientes propios de este no son suficientes para generar todas las sustancias necesarias para el crecimiento del tubo hasta los óvulos <sup>(29)</sup>. Este proceso muchas veces imposibilita la hibridación, lo que hace necesario saber en qué momento se genera la interrupción del crecimiento del tubo polínico para poder tomar decisiones. Este tipo de incompatibilidad se ha estudiado en Solanaceae, donde el cese del crecimiento del tubo polínico ocurre a lo largo del estilo <sup>(44)</sup>, como ocurre en la autoincompatibilidad gametofítica <sup>(48)</sup>; por tanto, es lógico pensar que ambos procesos de reconocimiento podrían ser similares <sup>(49)</sup>. Se realizó un estudio en *Nierembergia* de cruzamientos interespecíficos, en el cual se detectó diferentes patrones de incompatibilidad pre-cigótica. Los estudios de la relación estigma-polen/estilo-tubo polínico demostraron que la incompatibilidad interespecífica se manifiesta por la inhibición del crecimiento del tubo polínico, en diferentes niveles del estilo. En ningún caso se encontraron signos de incompatibilidad a nivel del estigma <sup>(49)</sup>.

Para observar el desarrollo del tubo polínico se colectan pistilos en intervalos de un día después de la autopolinización o polinización cruzada, hasta más menos cuatro días después de la polinización. La técnica consiste en teñir los pistilos con azul de anilina, ya que este compuesto reacciona con la calosa del polen y, por tanto, se puede ver el recorrido del tubo polínico, a través del estilo en un microscopio de fluorescencia. Para analizar en qué parte del pistilo ocurre la interrupción del tubo polínico, se divide el pistilo en cuatro partes: estigma, primera mitad del estilo, segunda mitad del estilo y ovario <sup>(41)</sup>. En la Figura 3 se puede observar el crecimiento del tubo polínico en *Alstroemeria* en el estilo y el ovario.



Fuente propia

**Figura 3.** A. Germinación del polen de *Alstroemeria* en el estigma y progreso de los tubos polínicos.  
B. Tubos polínicos en el ovario de *Alstroemeria*

### Estudios citogenéticos para el cariotipado de especies vegetales

El cariotipado consiste en el estudio de la estructura del genoma que incluye el número cromosómico y, con ello, el nivel de ploidía, el análisis de la morfología de los cromosomas (tamaño absoluto y relativo, posición del centrómero, la ubicación y el número de satélites <sup>(50)</sup>. A la hora de seleccionar parentales para los cruzamientos en un programa de mejora, es importante tener conocimiento sobre el número cromosómico. Si se trata de cultivares con diferencias en este, puede que la reproducción sexual se vea afectada y, por tanto, sea imposible la obtención de semillas.

El número cromosómico puede ser muy variable, incluso dentro de cultivares de una misma especie, como afirma un estudio realizado en morera, donde se encontraron variedades aneuploides y diploides en *Morus indica* <sup>(51)</sup>. Se puede dar el fenómeno de poliploidía y, por tanto, pueden surgir nuevos números básicos que no tengan relación directa con los ancestrales, debido a nuevas reestructuraciones o hibridación entre poliploides con distintos números básicos. Además, es difícil deducir diferencias en la ploidía sin un análisis citogenético, porque variaciones en el cariotipo pueden ocurrir sin cambios notorios en el fenotipo <sup>(52)</sup>.

Estudios de cariotipo pueden realizarse por la disciplina conocida como citogenética, la cual trata sobre la estructura y el comportamiento de los cromosomas, así como de las implicaciones genéticas derivadas de su estudio <sup>(53)</sup>. En los últimos 20 años, los estudios citogenéticos se han enfocado en la estructura y la evolución del genoma de

diferentes especies vegetales, tanto silvestres como cultivadas <sup>(7)</sup>. Mediante análisis citogenéticos se genera conocimiento básico sobre el número y la forma de los cromosomas para subsecuentes estudios enfocados al aprovechamiento de la diversidad biológica, con fines para el mejoramiento <sup>(54)</sup>. Este tipo de estudios se realizó en diversos cultivos como *Triticum aestivum* <sup>(55)</sup>, *Dipteryx alata* <sup>(56)</sup> e *Hibiscus rosa-sinensis* <sup>(57)</sup>.

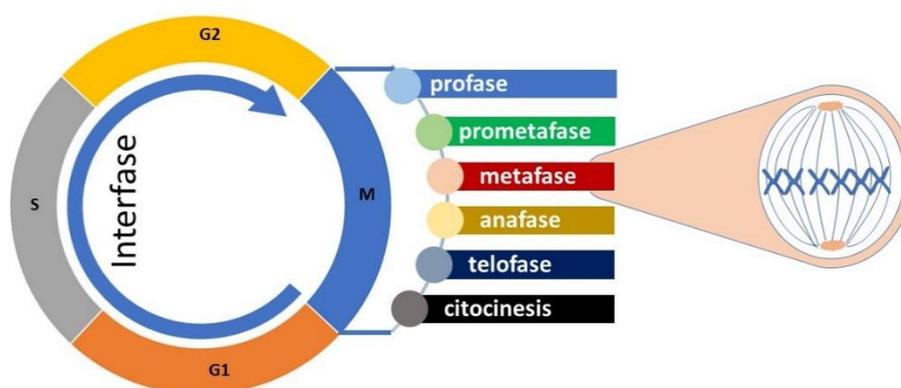
La citogenética se divide en citogenética clásica y molecular. La primera incluye los estudios citológicos en los cuales se analizan los cromosomas bajo microscopio, durante la metafase de la mitosis o meiosis. La citogenética molecular podría considerarse la fusión entre la citogenética clásica y la biología molecular. Esta disciplina agrupa un conjunto de técnicas que aplican diferentes métodos de la biología molecular, directamente sobre preparaciones citológicas, tales como tejidos, células, cromosomas y fibras de ADN <sup>(7)</sup>.

### Citogenética clásica

La citogenética clásica consiste en observar en un microscopio las características cromosómicas en células que se encuentren en la metafase de la mitosis o la meiosis. Con dicho objetivo se utilizan células de la raíz, en el caso de que se quiera analizar mitosis o gametos en el caso de meiosis.

### Determinación del número cromosómico durante la mitosis

El ciclo celular comprende cuatro fases secuenciales ordenadas, que distinguen temporalmente la replicación del material genético de la segregación de cromosomas duplicados en dos células hijas. Las fases G1 y G2 son denominadas como "huecos", por la palabra en inglés "gaps", porque en el núcleo de la célula en estas etapas no ocurren procesos muy visibles. Sin embargo, las células están muy activas realmente, ya que están creciendo y se están preparando para la división. La fase S se refiere a la síntesis, en la que el ADN es copiado o replicado y la fase M a la mitosis <sup>(58)</sup>. En la Figura 4 se pueden observar las diferentes fases del ciclo celular.

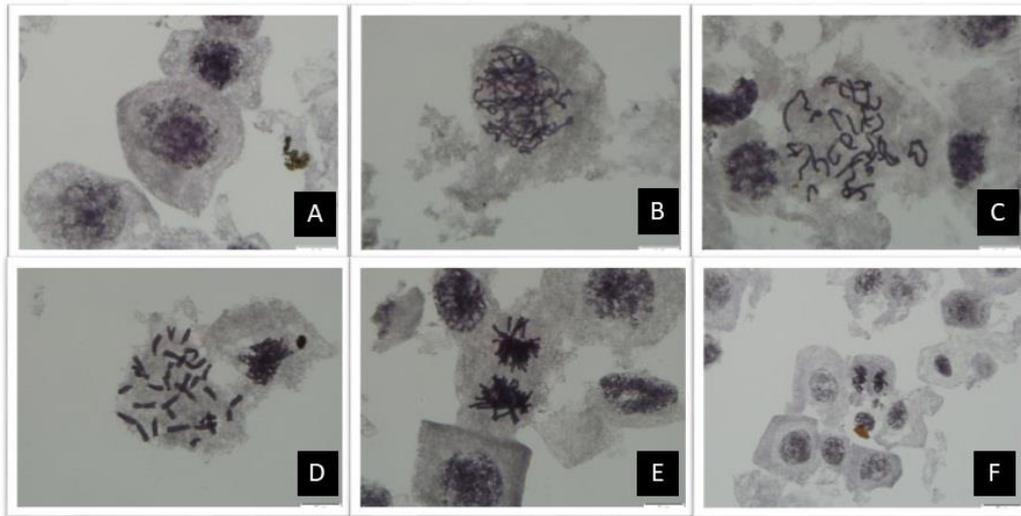


En la fase M ocurre la mitosis, que se divide en profase, prometafase, metafase, anafase, telofase y citocinesis. En la metafase los cromosomas se encuentran bien definidos y alineados en el plano ecuatorial de la célula; por tanto, se pueden observar fácilmente al microscopio.

(Fuente propia)

**Figura 4.** Ciclo celular, compuesto por la fase G1, S, G2 y M

La mitosis se divide en cinco fases: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. Durante la metafase los cromosomas se hayan dispuestos hacia la placa ecuatorial y es el momento adecuado para el conteo de cromosomas <sup>(59)</sup>. En la Figura 5 se pueden observar las diferentes fases de la mitosis en un tejido meristemático de *Alstroemeria*, en un experimento desarrollado por los autores en el Instituto de floricultura de Argentina, donde en la metafase los cromosomas son perfectamente visibles.



**A.** Interfase o fase de crecimiento, **B.** Profase (se observan los cromosomas condensados, pero aún no se puede definir número), **C.** Prometafase (los cromosomas comienzan a definirse), **D.** Metafase (los cromosomas se encuentran bien definidos en el plano ecuatorial de la célula), **E.** Anafase (las cromátidas hermanas se encuentran migrando hacia polos opuestos), **F.** Telofase (comienza a formarse la nueva envoltura nuclear). (Fuente propia)

**Figura 5.** Fases del ciclo celular en células meristemáticas de *Alstroemeria*

En los primeros estudios de cariotipado, los citólogos, con el fin de observar los cromosomas bajo el microscopio óptico, fijaban los tejidos meristemáticos en bloques de parafina y después realizaban cortes al micrómetro. En su momento, esta tecnología ofreció buenos resultados, hasta el surgimiento de la técnica del aplastado de puntas de raíz conocido como “squash” <sup>(60)</sup>.

Los cromosomas se encuentran en las células de todos los organismos, pero son visibles cuando estas se encuentran en división mitótica o meiótica. En caso de que se desee analizar el número cromosómico durante la mitosis, se deben utilizar tejidos meristemáticos que se caracterizan por poseer células en constante división, con núcleos grandes <sup>(61)</sup>. Los tejidos meristemáticos más utilizados por los citólogos, son los que se encuentran en la zona apical de la raíz <sup>(60)</sup>.

El primer paso a tener en cuenta para la determinación del número cromosómico, mediante la observación de la mitosis, es determinar la hora más adecuada para el tratamiento previo de las raíces <sup>(62)</sup>. Con este fin, se realiza un experimento para encontrar cuando se encuentra un mayor número de células metafásicas, lo cual puede ser diferente en cada localidad, debido a las condiciones ambientales <sup>(60)</sup>. Para tal fin, Valladolid, propuso fijar las raíces en la mezcla alcohol absoluto: ácido acético glacial (3:1) a diferentes horas del día, macerar y teñir las muestras para observarlas bajo el microscopio óptico y posteriormente anotar la frecuencia de interfases, profases, metafases y telofases por cada hora de colección <sup>(60)</sup>.

Posteriormente se procede al pretratamiento que consiste en poner en contacto la punta de la raíz con sustancias denominadas inhibidores de mitosis (Colchicina, 8-hidroxiquinolina, 1-bromonaftaleno, bajas temperaturas positivas, etc.) para obtener un mayor número de células metafásicas en el meristemo. La metafase es la etapa de la mitosis, donde los cromosomas alcanzan su máximo grado de condensación y se encuentran individualizados; por tanto, es muy fácil contarlos y caracterizarlos. Los inhibidores de mitosis evitan que se forme el huso acromático y las células no pasan a la anafase, la siguiente etapa de la mitosis <sup>(62,63)</sup>.

Los inhibidores de la mitosis también han sido utilizados para inducir poliploides con características novedosas. En un estudio llevado a cabo en *Impatiens walleriana*, la aplicación de colchicina al 0,05 %, produjo la mayor eficiencia de inducción tetraploide; por lo tanto, esta concentración sería un buen punto de partida para inducir tetraploides en el futuro <sup>(64)</sup>. En otro estudio, se evaluó el efecto de otro inhibidor de la mitosis, la orizalina en *I. walleriana* y resultó ser muy efectivo para la inducción de tetraploidía <sup>(65)</sup>. En ambos experimentos, las plantas tetraploides exhibieron mayor área foliar, grosor de la hoja, ancho de ovario, longitud del polen y tamaño de los estomas y mostraron disminuciones en la altura, la densidad de las células protectoras de los estomas y el número de flores.

El siguiente paso consiste en la fijación para poder interrumpir rápidamente los procesos vitales de la muestra para conservar la estructura de las células <sup>(66)</sup>. Después se utilizan agentes químicos o tratamientos enzimáticos (celulasas y pectinasas) para eliminar la pared celular de las células y dispersarlas. Posteriormente se tiñen los cromosomas para que sean visibles al microscopio óptico. Con dicho objetivo se utilizan tintes básicos, debido a la naturaleza ácida de la cromatina. Una vez que las células han sido teñidas, se procede al aplastado o squash, para que los cromosomas se dispersen y se sitúen en un mismo plano. Por último, se observa la muestra bajo un microscopio óptico <sup>(62)</sup>. En la Figura 6 se pueden observar los diferentes pasos para la observación de los cromosomas en metafase.



Se observa el proceso de eliminación de la cofia de la raíz para dejar al descubierto el tejido meristemático (Fuente propia)

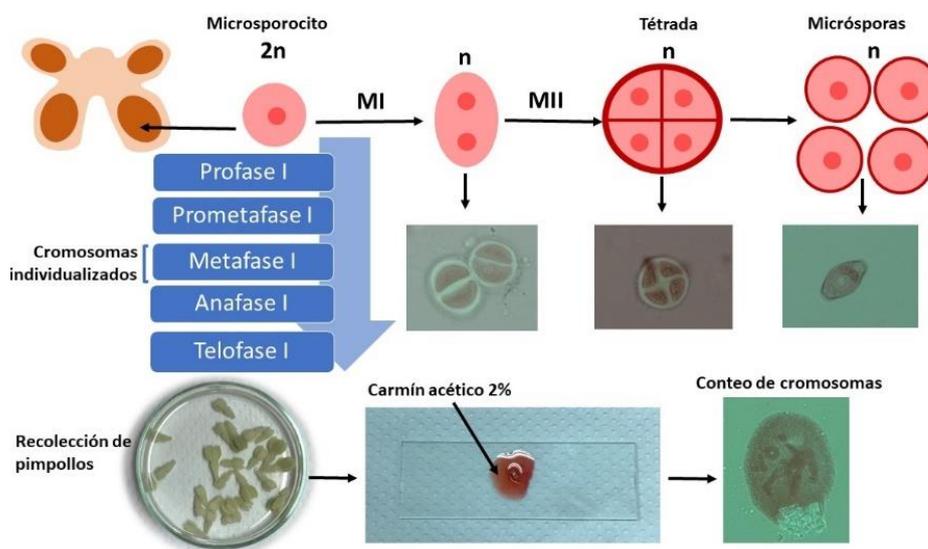
**Figura 6.** Diferentes pasos para observar cromosomas durante la metafase de la mitosis

A pesar del avance de la tecnología y el surgimiento de nuevas técnicas para el cariotipado, aún el conteo cromosómico durante la mitosis se realiza en numerosos cultivos. Por ejemplo, se determinó el número cromosómico de 14 especies de *Iris*, mediante citogenética clásica en Korea <sup>(67)</sup>.

### Determinación del número cromosómico en meiosis

En las plantas superiores, la meiosis solo tiene lugar en las células madres de los granos de polen ubicados en el microsporófilo (gimnospermas) o en la antera (angiospermas) y en las células madres de las megásporas que se encuentran en el óvulo (gimnospermas y angiospermas). Al igual que en la mitosis, para analizar el número cromosómico durante la meiosis, se realiza durante la metafase I o la metafase II. Si se realiza durante esta última es importante tener en cuenta que el número cromosómico se encuentra reducido a la mitad <sup>(68)</sup> (Figura 7).

Estudios del comportamiento cromosómico durante la meiosis pueden detectar anomalías en los cromosomas que afectan la fertilidad de la planta. Por ejemplo, se desarrolló un estudio en tres especies del género *Capsicum*, donde se observaron diferentes anomalías meióticas, que pueden interrumpir el proceso de división celular creando diferentes números cromosómicos y disminuyendo la fertilidad del polen. Se observaron las siguientes variaciones del número de cromosomas:  $2n=2x=24$ ,  $2n=2x=26$ ,  $2n=4x=48$  a  $2n=6x=72$  <sup>(69)</sup>.



Se observa cómo ocurre la meiosis para la formación de granos de polen en plantas. La primera división ocurre en los sacos polínicos de las anteras inmaduras donde el microsporocito diploide da como resultado dos núcleos haploides. La segunda división da como resultado la tétrada de microsporas, también haploides. El momento ideal para observar cromosomas es durante la Metafase I, donde se encuentran individualizados y fáciles de contar. Para dicho proceso se recolectan los pimpollos, las anteras inmaduras se fijan en solución de Farmer y se les aplica carmín acético al 2 % para colorear los cromosomas. (Fuente propia)

**Figura 7.** Conteo de cromosomas durante la metafase de la meiosis

### Citogenética molecular para el análisis cromosómico

Como se había comentado anteriormente, para el desarrollo de un programa de mejora genética, un paso clave es la caracterización cariotípica de los cultivares que van a ser utilizados como progenitores. Actualmente en los laboratorios bien equipados se pueden realizar técnicas mucho más factibles que la citogenética clásica, como son: la citometría de flujo, hibridación fluorescente *in situ* (FISH) e hibridación genómica *in situ* (GISH) <sup>(2)</sup>.

Estas técnicas se agrupan en una disciplina conocida como citogenética molecular, la cual se define como la fusión entre la citogenética clásica y la biología molecular <sup>(7)</sup>.

### **Citometría de flujo para el estudio cromosómico**

La citometría de flujo es una herramienta potente para el análisis del contenido de ADN nuclear (en sus valores relativos o absolutos) de células vegetales <sup>(70)</sup>. Consiste en analizar partículas que fluyen en una suspensión líquida, debido a las propiedades ópticas (dispersión de la luz y fluorescencia) <sup>(71)</sup>. Desde los años 80 ha aumentado de manera exponencial, el espectro de aplicaciones de la citometría de flujo análisis del genoma vegetal; por tanto, constituye una técnica rutinaria utilizada en numerosos laboratorios de todo el mundo <sup>(72)</sup>.

La citometría de flujo permite saber la cantidad de núcleos, previamente aislados y marcados con un fluorocromo, existentes en cada fase del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M). Primeramente, las medidas de fluorescencia de los núcleos son expresadas en una escala arbitraria, después se compara con la fluorescencia de núcleos aislados de un estándar de referencia con tamaño de genoma conocido para estimar el contenido de ADN nuclear de un determinado individuo o tejido <sup>(72)</sup>.

Esta técnica fue utilizada para determinar la ploidía de una colección de germoplasma del CIAT (Colombia) de pastos tropicales de los géneros *Brachiaria*, *Megathyrus* y *Panicum*. De esta forma se determinó el modo de reproducción de las accesiones analizadas, para así elegir a los parentales masculinos y femeninos en un programa de cruzamientos <sup>(73)</sup>. Por otra parte, fue estimado el contenido de ADN nuclear y el nivel de ploidía de 19 accesions de *Gagnepainia godefroyi* y *G. harmandii* en Tailandia, mediante citometría de flujo <sup>(74)</sup>.

### **FISH (Hibridación fluorescente *in situ*) para la caracterización cromosómica**

FISH, a diferencia de las técnicas citogenéticas convencionales, se basa en reacciones moleculares específicas entre el ADN cromosómico y otra secuencia cualquiera denominada 'sonda'. El principio de esta técnica consiste en la hibridación de sondas de ADN, previamente marcadas con un fluorocromo específico, directamente sobre el ADN cromosómico, aprovechando la homología existente entre éstas. Para la detección de tales sondas los preparados cromosómicos se exponen a la luz ultravioleta, lo cual provoca la excitación de los electrones de la molécula fluorescente, que se caracteriza por una emisión de rayos, cuya longitud de onda varía, según el tipo de fluorocromo empleado.

La adaptación de protocolos de FISH en un número cada vez mayor de especies vegetales ha abierto nuevas posibilidades para el estudio de los genomas vegetales <sup>(7)</sup>. Por ejemplo, mediante esta técnica, se realizó, por primera vez, una caracterización citogenómica de veinte accesiones que cubren ocho especies del género *Hedysarum*, para evaluar la diversidad genética y cariotipado <sup>(75)</sup>.

Una de las modificaciones de FISH se denomina hibridación genómica *in situ* (GISH, por *genomic in situ hybridization*), la cual permite colorear, diferencialmente, los cromosomas de distintos ancestros (en el caso de una especie) o de genomas parentales (en el caso de un híbrido) <sup>(7)</sup>. Recientemente GISH en combinación

con FISH fue aplicada para el estudio de la estructura cromosómica en *Medicago sativa*, producto a que esta especie posee cromosomas muy pequeños, lo que dificulta su estudio mediante citogenética clásica <sup>(76)</sup>.

Otra de las variantes de la técnica se denomina Hibridación Genómica Comparativa o CGH (por *comparative genome hybridization*), en la cual se utiliza el ADN genómico de una especie patrón (por ejemplo, *Arabidopsis*) que se usa como sonda para hibridarlo sobre los cromosomas de otra especie, lo cual permite analizar el cariotipo de una especie dada con un enfoque molecular, sin necesidad de utilizar secuencias específicas que son difíciles de obtener. Esta hibridación cruzada genera una serie de bandas sobre los cromosomas de la especie estudiada, las cuales corresponden a regiones genómicas conservadas (por lo general, secuencias repetitivas) entre las dos especies <sup>(77,78)</sup>. Por ejemplo, esta técnica fue recientemente utilizada para estudiar la estructura cromosómica de dos especies del género *Carex*, y comprobar la hipótesis taxonómica de orígenes híbridos en *Carex salina* y *C. ramenskii* <sup>(79)</sup>.

## CONCLUSIONES

- El método más utilizado para estimar la viabilidad de polen en el caso de la selección de los progenitores masculinos, en un programa de mejora, es la germinación *in vitro*. Sin embargo, en el caso de que se tengan muchos genotipos por evaluar son más recomendados los métodos de tinción por su rapidez.
- El método más efectivo en la determinación de la receptividad estigmática para la elección del progenitor femenino es el uso de peróxido de hidrógeno.
- Realizar estudios de autoincompatibilidad, mediante la observación del crecimiento del tubo polínico, le permiten al mejorador economizar tiempo y recursos en un programa de mejora genética. También es recomendable realizar ensayos de autopolinización y aislamiento de flores, si no se cuenta con el equipo necesario.
- El conocimiento del número cromosómico es importante a la hora de seleccionar parentales para los cruzamientos; el método más utilizado con este fin por su versatilidad y rapidez es la citometría de flujo.

## AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Buenos Aires Argentina, por facilitar las instalaciones para la toma de las fotografías y el personal correspondiente.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Berger J, Pushpavalli R, Ludwig C, Parsons S, Basdemir F, Whisson K. Wild and domestic differences in plant development and responses to water deficit in *Cicer*. *Frontiers in Genetics* [Internet]. 2020;11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7746823/>
2. Carrodegua-Gonzalez A, Orozco AZ. Bases para la mejora genética en *Gerbera hybrida*. *Repertorio Científico* [Internet]. 2020;23(2):51–62. Available from: <https://revistas.uned.ac.cr/index.php/repertorio/article/view/3000>

3. Orozco AZ, Gonzalez AC. Factores importantes como base para el mejoramiento genético en el cultivo de la piña (*Ananas comosus* var. *comosus*). Available from: <https://revistas.uned.ac.cr/index.php/repertorio/article/download/2998/4274?inline=1>
4. García L, Rivero M, Droppelmann F. Descripción morfológica y viabilidad del polen de *Nothofagus nervosa* (Nothofagaceae). Bosque (Valdivia) [Internet]. 2015;36(3):487–96. Available from: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0717-92002015000300015&script=sci\\_arttext](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0717-92002015000300015&script=sci_arttext)
5. Baba Nitsa M, Balogun ST, Odey FC, Dada KE, Idrisu M, Ugioro O, et al. Evaluation of pollen viability and *in vitro* pollen germination in relation to different maturity stages of flowers inkola (*Cola nitida*). GSJ [Internet]. 2020;8(5):516–25. Available from: [https://www.globalscientificjournal.com/researchpaper/Evaluation\\_of\\_pollen\\_viability\\_and\\_in\\_vitro\\_pollen\\_germination\\_compared\\_at\\_different\\_maturity\\_stages\\_of\\_Cola\\_nitida\\_flowers\\_.pdf](https://www.globalscientificjournal.com/researchpaper/Evaluation_of_pollen_viability_and_in_vitro_pollen_germination_compared_at_different_maturity_stages_of_Cola_nitida_flowers_.pdf)
6. Shivanna KR, Sawhney V, Lambert RJ. Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement. The Quarterly Review of Biology [Internet]. 1999 [cited 25/11/2021];74(4):474–5. doi:10.1086/394160
7. Herrera JC. La citogenética molecular y su aplicación en el estudio de los genomas vegetales. Agronomía Colombiana [Internet]. 2007;25(1):26–35. Available from: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/14394>
8. González ME, Estévez A, Castillo J, Salomón J, Moré O, Hernández MM. La Calidad del polen: requisito indispensable del mejoramiento tradicional de la papa en Cuba. Revista Latinoamericana de la Papa. 2002;13(1):75–94.
9. Nikkanen T, Aronen T, Häggman H, Venäläinen M. Variation in pollen viability among *Picea abies* genotypes—potential for unequal paternal success. Theoretical and applied genetics [Internet]. 2000;101(4):511–8. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/226790123\\_Variation\\_in\\_pollen\\_viability\\_among\\_Picea\\_abies\\_genotypes\\_-\\_potential\\_for\\_unequal\\_paternal\\_success](https://www.researchgate.net/publication/226790123_Variation_in_pollen_viability_among_Picea_abies_genotypes_-_potential_for_unequal_paternal_success)
10. Ferri A, Bellini E, Padula G, Giordani E. Viability and *in vitro* germinability of pollen grains of olive cultivars and advanced selections obtained in Italy. 2008;1000–7. Available from: [https://www.researchgate.net/profile/Edgardo-Giordani/publication/237750117\\_Viability\\_and\\_in\\_vitro\\_germinability\\_of\\_pollen\\_grains\\_of\\_olive\\_cultivars\\_and\\_advanced\\_selections\\_obtained\\_in\\_Italy/links/558bdc5c08ae40781c1f206e/Viability-and-in-vitro-germinability-of-pollen-grains-of-olive-cultivars-and-advanced-selections-obtained-in-Italy.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Edgardo-Giordani/publication/237750117_Viability_and_in_vitro_germinability_of_pollen_grains_of_olive_cultivars_and_advanced_selections_obtained_in_Italy/links/558bdc5c08ae40781c1f206e/Viability-and-in-vitro-germinability-of-pollen-grains-of-olive-cultivars-and-advanced-selections-obtained-in-Italy.pdf)
11. Davarynejad GH, Szabó Z, Nyeki J, Szabó T. Phenological stages, pollen production level, pollen viability and *in vitro* germination capability of some sour cherry cultivars. Asian Journal of Plant Sciences. 2008;
12. Rejón García JD, Suárez C, Alché Ramírez J de D, Castro AJ, Rodríguez García MI. Evaluación de diferentes métodos para estimar la calidad del polen en distintos cultivares de olivo (*Olea europaea* L.). 2010; Available from: <https://gredos.usal.es/handle/10366/120989>

13. Impe D, Reitz J, Köpnick C, Rolletschek H, Börner A, Senula A, et al. Assessment of pollen viability for wheat. *Frontiers in plant science* [Internet]. 2020;10:1588. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.01588/full>
14. Zampino D, Duro A, Sciandrello S, Parafati L, Restuccia C. Pollen viability and endophytic yeast species of *Cistus creticus* and *C. monspeliensis*. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* [Internet]. 2021;155(2):384–93. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/11263504.2020.1753844>
15. Shivanna KR, Johri BM. *The angiosperm pollen: structure and function* [Internet]. New Delhi: Wiley Eastern; 1985. Available from: <https://www.worldcat.org/title/angiosperm-pollen-structure-and-function/oclc/13158693>
16. Garduño-Tamayo NA, Núñez-Colín CA, Pecina-Quintero V, Montero-Tavera V, Montes-García N, González-Chavira MM, et al. Desarrollo de un método eficiente para la germinación *in vitro* de polen de sorgo. *Tropical and subtropical agroecosystems* [Internet]. 2011;14(3):901–6. Available from: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1870-04622011000300025&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1870-04622011000300025&script=sci_arttext)
17. Marini GV, Arenas RO, Togno LS. Efecto de los medios de cultivo sobre la germinación *in vitro* de granos de polen en poblaciones de *Cucurbita máxima*. *Horticultura Argentina* [Internet]. 2010;29(70):18–21. Available from: <https://www.horticulturaar.com.ar/es/articulos/efecto-de-los-medios-de-cultivo-sobre-la-germinacion-in-vitro-de-granos-de-polen-en-poblaciones-de-cucurbita-maxima.html>
18. Tushabe D, Rosbakh S. A compendium of *in vitro* germination media for pollen research. *Frontiers in Plant Science* [Internet]. 2021;14:12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.709945/full>
19. Buiza J del VI, Ramírez YC. Durability of the Pollen Germinative Capacity in Aloe Vera (L.) Burm. f. and A. Saponaria Haw. 2006; Available from: <https://tspace.library.utoronto.ca/handle/1807/45368>
20. Burke IC, Wilcut JW, Allen NS. Viability and *in vitro* germination of johnsongrass (*Sorghum halepense*) pollen. *Weed technology* [Internet]. 2007;21(1):23–9. Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/weed-technology/article/abs/viability-and-in-vitro-germination-of-johnsongrass-sorghum-halepense-pollen/C1F1C8F18E70CD2F3CF2280AD92CCD3C>
21. Lata S, Sharma G, Garg S, Mishra G. Pollen Viability, Germination and Stigma Receptivity Studies in different Strawberry cultivars. Available from: [https://www.researchgate.net/profile/Suman-Lata-5/publication/343341468\\_Article2/links/5f240f6d458515b729f5f447/Article2.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Suman-Lata-5/publication/343341468_Article2/links/5f240f6d458515b729f5f447/Article2.pdf)
22. Srinivasan S, Gaur PM. Genetics and characterization of an open flower mutant in chickpea. *Journal of Heredity* [Internet]. 2012;103(2):297–302. Available from: <https://academic.oup.com/jhered/article/103/2/297/885695?login=true>
23. De Jesus L, Silva RNO, Gomes MDC, Valente SDS, Gomes RLF, Lopes ADA, et al. Efficiency of colorimetric tests to determine pollen viability in peppers. *Revista Brasileira De Agropecuária Sustentável (RBAS)* [Internet]. 2018;8(2):77–82. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/f7ac/d829ac6180ca3a8cc93bdd99ffd293f48b5f.pdf>

24. Alexander MP. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. Stain technology [Internet]. 1969;44(3):117–22. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10520296909063335>
25. Ferreira M dos S, Soares TL, Costa EMR, Silva RL da, Jesus ON de, Junghans TG, et al. Optimization of culture medium for the in vitro germination and histochemical analysis of *Passiflora* spp. pollen grains. 2021; Available from: <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/7408515>
26. Gratao PL, Pompeu GB, Capaldi FR, Vitorello VA, Lea PJ, Azevedo RA. Antioxidant response of *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2 cells to cadmium and nickel stress. Plant Cell, Tissue and Organ Culture [Internet]. 2008;94(1):73–83. Available from: [https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/48839097/Antioxidant\\_response\\_of\\_Nicotiana\\_tabacu20160914-745-zl4c97.pdf?1473881523=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DAntioxidant\\_response\\_of\\_Nicotiana\\_tabacu.pdf&Expires=1637822170&Signature=BcXvIikpxJwynB8O2aFPf~fyVk8LeFHzJKyTDouGcRdq4zzpxRWYy2Xg8jSfEoFg2jkkO5tSViPJLwLLfpLv9j6qNwlMhbt7hc2fsTf1LLsK33Te38jedreDP-Yq7J-FH-d~UrCVud39qX8m59~1cN1BA1SEy3lSszEjNuMEHLMEDYapFXokEjciBCIC0IbbkeBX4rqwG1LXtZZVCygRUM1OYbXG6hZRNrbr3l0nwx8Kw573fAmdVLFZrt6B7k9bJGdohIYa~ZVGepY1mercYM7Mq2D9bDdiHAeDFzuiu6kjFmc1i9eisvjk5kR1UT1TKq3Y7CeWv6zTVub~0KBnA\\_\\_&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/48839097/Antioxidant_response_of_Nicotiana_tabacu20160914-745-zl4c97.pdf?1473881523=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DAntioxidant_response_of_Nicotiana_tabacu.pdf&Expires=1637822170&Signature=BcXvIikpxJwynB8O2aFPf~fyVk8LeFHzJKyTDouGcRdq4zzpxRWYy2Xg8jSfEoFg2jkkO5tSViPJLwLLfpLv9j6qNwlMhbt7hc2fsTf1LLsK33Te38jedreDP-Yq7J-FH-d~UrCVud39qX8m59~1cN1BA1SEy3lSszEjNuMEHLMEDYapFXokEjciBCIC0IbbkeBX4rqwG1LXtZZVCygRUM1OYbXG6hZRNrbr3l0nwx8Kw573fAmdVLFZrt6B7k9bJGdohIYa~ZVGepY1mercYM7Mq2D9bDdiHAeDFzuiu6kjFmc1i9eisvjk5kR1UT1TKq3Y7CeWv6zTVub~0KBnA__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA)
27. Moore RP. Handbook on tetrazolium testing. In International Seed Testing Association Zurich; 1985. Available from: [https://www.seedtest.org/en/handbooks-\\_content---1--3422.html](https://www.seedtest.org/en/handbooks-_content---1--3422.html)
28. Özcan A. Effect of Low-temperature storage on sweet cherry (*Prunus avium* L.) pollen quality. HortScience [Internet]. 2020;55(2):258–60. Available from: <https://journals.ashs.org/hortsci/view/journals/hortsci/55/2/article-p258.xml>
29. Heslop-Harrison Y, Reger BJ, Heslop-Harrison J. The pollen-stigma interaction in the grasses. 6. The stigma ('silk') of *Zea mays* L. as host to the pollens of *Sorghum bicolor* (L.) Moench and *Pennisetum americanum* (L.) Leeke. Acta Botanica Neerlandica [Internet]. 1984;33(2):205–27. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1438-8677.1984.tb01799.x>
30. Páez V de los A, Andrada AR, Sobrero MT, Chaila S. Caracterización citológica en *Flaveria bidentis* y *F. haumanii* (Asteraceae). Acta botánica mexicana [Internet]. 2020;(127). Available from: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-71512020000100109&script=sci\\_abstract&tlng=pt](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-71512020000100109&script=sci_abstract&tlng=pt)
31. Passarelli LM. Relación entre la germinación del polen "in vitro", reacción fluorocromática y tinción con azul de algodón en lactofenol, en dos especies de *Solanum* sec. Cyphomandropsis. Publicación Electrónica de la Asociación Paleontológica Argentina [Internet]. 1999;6(1). Available from: <https://www.peapaleontologica.org.ar/index.php/peapa/article/view/209>

32. Kearns CA, Inouye DW. Techniques for pollination biologists. [Internet]. University press of Colorado; 1993. Available from: <https://upcolorado.com/university-press-of-colorado/item/1694-techniques-for-pollination-biologists>
33. Márquez Guzmán J. Biología de angiospermas [Internet]. [cited 24/11/2021]. Available from: [https://www.researchgate.net/profile/Jorge-Meave/publication/281348069\\_Vegetacion\\_caracterizacion\\_y\\_factores\\_que\\_determinan\\_su\\_distribucion/links/55edabb908ae0af8ee187ea9/Vegetacion-caracterizacion-y-factores-que-determinan-su-distribucion.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Jorge-Meave/publication/281348069_Vegetacion_caracterizacion_y_factores_que_determinan_su_distribucion/links/55edabb908ae0af8ee187ea9/Vegetacion-caracterizacion-y-factores-que-determinan-su-distribucion.pdf)
34. Yang R, Wang J, Gao W, Jiang Y, Su J, Sun D, et al. Research on the reproductive biological characteristics of *Amomum villosum* Lour. and *Amomum longiligulare* TL Wu. Plos one [Internet]. 2021;16(8):e0250335. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0250335>
35. Bazo I, Espejo R, Palomino C, Flores M, Chang M, López C, et al. Estudios de biología floral, reproductiva y visitantes florales en el "Loche" de Lambayeque (*Cucurbita moschata* DUCHESNE). Ecología Aplicada [Internet]. 2018;17(2):191–205. Available from: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-22162018000200007](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-22162018000200007)
36. Burgos L, Egea J, Dicenta F. Effective pollination period in apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties. Annals of Applied Biology [Internet]. 1991;119(3):533–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1744-7348.1991.tb04892.x>
37. Egea J, Burgos L, Garcia JE, Egea L. Stigma receptivity and style performance in several apricot cultivars. Journal of Horticultural science [Internet]. 1991;66(1):19–25. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00221589.1991.11516120>
38. González MV, Coque M, Herrero M. Stigmatic receptivity limits the effective pollination period in kiwifruit. Journal of the American Society for Horticultural Science [Internet]. 1995;120(2):199–202. Available from: <https://journals.ashs.org/jashes/view/journals/jashes/120/2/article-p199.xml>
39. Hedhly A, Hormaza JI, Herrero M. Efecto de la temperatura sobre la duración de la receptividad estigmática en melocotonero (*Prunus persica* L. Batsch). 2000; Available from: [https://www.aida-itea.org/aida-itea/files/jornadas/2000/comunicaciones/2000\\_FyF\\_01.pdf](https://www.aida-itea.org/aida-itea/files/jornadas/2000/comunicaciones/2000_FyF_01.pdf)
40. Cropano C, Place I, Manzanares C, Do Canto J, Lübberstedt T, Studer B, et al. Characterisation and practical use of self-compatibility in outcrossing grass species. Annals of Botany [Internet]. 2021; Available from: <https://www.research-collection.ethz.ch/bitstream/handle/20.500.11850/483774/1/mcab043.pdf>
41. Facciuto GR. Auto-incompatibilidad de acción tardía e hibridación interespecífica en el género *Tabebuia* AI Gomes ex DC (Bignoniaceae): estudios relacionados con el desarrollo reproductivo [Internet]. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales; 2007. Available from: [https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/greenstone3/exa/collection/tesis/document/tesis\\_n4149\\_Facciuto](https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/greenstone3/exa/collection/tesis/document/tesis_n4149_Facciuto)
42. Herrera S, Lora J, Hormaza JI, Rodrigo J. Determination of Self-and Inter-(in) compatibility Relationships in Apricot Combining Hand-Pollination, Microscopy and Genetic Analyses. JoVE (Journal of Visualized Experiments) [Internet]. 2020;(160):e60241. Available from: <https://www.jove.com/es/t/60241/determination-self-inter-compatibility-relationships-apricot>

43. Herrero M, Dickinson HG. Pollen tube development in *Petunia hybrida* following compatible and incompatible intraspecific matings. *Journal of Cell Science* [Internet]. 1981;47(1):365–83. Available from: <https://journals.biologists.com/jcs/article/47/1/365/59007/Pollen-tube-development-in-Petunia-hybrida>
44. Lush WM, Clarke AE. Observations of pollen tube growth in *Nicotiana glauca* and their implications for the mechanism of self-incompatibility. *Sexual Plant Reproduction* [Internet]. 1997;10(1):27–35. Available from: <https://www.semanticscholar.org/paper/Observations-of-pollen-tube-growth-in-Nicotiana-and-Lush-Clarke/4a4e2414aa590e6e0c6d06482e14b645a1e162aa>
45. Seavey SR, Bawa KS. Late-acting self-incompatibility in angiosperms. *The Botanical Review* [Internet]. 1986;52(2):195–219. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02861001>
46. Stasiak A, Latocha P, Bieniasz M. Effect of genetically diverse pollen on pollination, pollen tube overgrowth, fruit set and morphology of kiwiberry (*Actinidia arguta*). *Agronomy* [Internet]. 2021;11(9):1814. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4395/11/9/1814>
47. Wheeler MJ, Franklin-Tong VE, Franklin FCH. The molecular and genetic basis of pollen–pistil interactions. *New Phytologist* [Internet]. 2001;151(3):565–84. Available from: <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.0028-646x.2001.00229.x>
48. Liedl BE, Anderson NO. Reproductive barriers: identification, uses and circumvention. *Plant Breed Rev* [Internet]. 1993;11:11–154. Available from: <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=by8K32RdKmYC&oi=fnd&pg=PA11&dq=Reproductive+barriers:+Identification,+uses+and+circumvention&ots=R0TFVM4DV-&sig=OgUQ3u8T0CZaiRN63RwCGV8cGPA#v=onepage&q=Reproductive%20barriers%3A%20Identification%2C%20uses%20and%20circumvention&f=false>
49. Milicia VJ, Coviella MA, Facciuto G, Soto MS. Relación tubo polínico/pistilo en cruzamientos interespecíficos en el género *Nierembergia* (Solanaceae). *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences* [Internet]. 2015;31(1):53–60. Available from: <http://revistas.udec.cl/index.php/chjaas/article/view/6247>
50. Sun W, Wang H, Wu R, Sun H, Li Z. Karyomorphology of three endemic plants (Brassicaceae: Euclidieae and Arabideae) from the Qinghai-Tibet Plateau and its significance. *Plant Diversity* [Internet]. 2020;42(3):135–41. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468265920300196>
51. Venkatesh KH. Studies on Basic Chromosome Number, Ploidy Level, Chromosomal Association and Configuration and Meiotic Behavior in Mulberry (*Morus* Spp.). In: *Cytogenetics-Classical and Molecular Strategies for Analysing Heredity Material* [Internet]. IntechOpen; 2021. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/76236>
52. Poggio L, González G, Ferrari M, García A, Wulff A, Greizerstein E, et al. Aportes de la citogenética al estudio de genomas vegetales. *Biología y mejoramiento vegetal II*. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) [Internet]. 2010;379–80. Available from: <https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/BioteconologiayMejoramientovegetalII.pdf>

53. Flavell RB. Perspective: 50 years of plant chromosome biology. *Plant Physiology* [Internet]. 2021;185(3):731–53. Available from: <https://academic.oup.com/plphys/article/185/3/731/6144805?login=true>
54. Alcántar Vázquez JP. La poliploidía y su importancia evolutiva. REPOSITORIO NACIONAL CONACYT [Internet]. 2014; Available from: <http://repositorio.utm.mx/handle/123456789/310>
55. Jiao Z, Zhu X, Li H, Liu Z, Huang X, Wu N, et al. Cytological and molecular characterizations of a novel 2A nullisomic line derived from a widely-grown wheat cultivar Zhoumai 18 conferring male sterility. *PeerJ* [Internet]. 2020;8:e10275. Available from: <https://peerj.com/articles/10275/>
56. Antunes AM, Targueta CP, Castro AA, Souza G, Soares TN, Telles MPC. Genome size and chromosome number of *Dipteryx alata* (Leguminosae): a model candidate for comparative genomics in Papilionoideae. Available from: [https://www.geneticsmr.com/sites/default/files/articles/year2020/vol19-3/pdf/gmr18640\\_-\\_genome-size-and-chromosome-number-dipteryx-alata-leguminosae-model-candidate-comparative.pdf](https://www.geneticsmr.com/sites/default/files/articles/year2020/vol19-3/pdf/gmr18640_-_genome-size-and-chromosome-number-dipteryx-alata-leguminosae-model-candidate-comparative.pdf)
57. Celinna M, Miranda PA, Rachma I, Salamah A. Chromosome analysis of *Hibiscus rosa-sinensis* using CHIAS IV software. In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science [Internet]. IOP Publishing; 2020. p. 012004. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/524/1/012004/meta>
58. Van't Hof J. Control points within the cell cycle. *The cell division cycle in plants* [Internet]. 1985;1–13. Available from: [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=Mqk8AAAIAAJ&oi=fnd&pg=PA11-IA2&dq=Control+points+within+the+cell+cycle.+In+Bryant+JA,+Francis+D,+editors.+The+Cell+Division+Cycle+in+Plants&ots=IG0C\\_x\\_qUt&sig=4kjuUZ7d0uS11Apfw096oN-EUfU#v=onepage&q=Control%20points%20within%20the%20cell%20cycle.%20In%20Bryant%20JA%20C%20Francis%20D%20editors.%20The%20Cell%20Division%20Cycle%20in%20Plants&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=Mqk8AAAIAAJ&oi=fnd&pg=PA11-IA2&dq=Control+points+within+the+cell+cycle.+In+Bryant+JA,+Francis+D,+editors.+The+Cell+Division+Cycle+in+Plants&ots=IG0C_x_qUt&sig=4kjuUZ7d0uS11Apfw096oN-EUfU#v=onepage&q=Control%20points%20within%20the%20cell%20cycle.%20In%20Bryant%20JA%20C%20Francis%20D%20editors.%20The%20Cell%20Division%20Cycle%20in%20Plants&f=false)
59. Ojea N. *Biología: conceptos básicos* [Internet]. 1a ed.-Santa Fe: Ediciones UNL, 2020; 2020. Available from: <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/handle/11185/5549>
60. Valladolid A, Blas R, Gonzáles R. Introducción al recuento de cromosomas somáticos en raíces andinas. *Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003)* [Internet]. 2004;95–9. Available from: <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=L-sz8Eir9IIC&oi=fnd&pg=PA95&dq=.+Introducci%C3%B3n+al+recuento+de+cromosomas+som%C3%A1ticos+en+ra%C3%ADces+andinas.+Ra%C3%ADces+Andinas+contribuciones+al+conocimiento+y+a+la+capacitaci%C3%B3n+I.+Aspectos+generales+y+recursos+gen%C3%A9ticos+de+las+ra%C3%ADces+andinas&ots=ayCJKvv9zD&sig=IlavNBR16dFqfQdw2Mad-G2z7mM#v=onepage&q=.%20Introducci%C3%B3n%20al%20recuento%20de%20cromosomas%20som%C3%A1ticos%20en%20ra%C3%ADces%20andinas.%20Ra%C3%ADces%20Andinas%20contribuciones%20al%20conocimiento%20y%20a%20la%20capacitaci%C3%B3n%20I.%20Aspectos%20generales%20y%20recursos%20gen%C3%A9ticos%20de%20las%20ra%C3%ADces%20andinas&f=false>
61. Roth I. *Anatomía de las plantas superiores*. 1966.

62. Talledo D, Escobar C, Alleman V. Introducción al análisis cromosómico en vegetales. Lima, Universidad Ricardo Palma. 1993;141.
63. Darnell JE, Lodish HF, Baltimore D. Molecular cell biology [Internet]. 2nd ed. New York: Scientific American Books: Distributed by W.H. Freeman; 1990. 1105 p. Available from: <https://www.goodreads.com/book/show/2721146-molecular-cell-biology>
64. Wang W, He Y, Cao Z, Deng Z. Induction of tetraploids in *Impatiens walleriana* and characterization of their changes in morphology and resistance to downy mildew. HortScience [Internet]. 2018;53(7):925–31. Available from: <https://journals.ashs.org/hortsci/view/journals/hortsci/53/7/article-p925.xml>
65. Ghanbari MA, Jowkar A, Salehi H, Zarei M. Effects of polyploidization on petal characteristics and optical properties of *Impatiens walleriana* (Hook.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) [Internet]. 2019;138(2):299–310. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-019-01625-3>
66. Sharma A, Sharma A. Chromosome Techniques - 3rd Edition [Internet]. [cited 25/11/2021]. Available from: <https://www.elsevier.com/books/chromosome-techniques/sharma/978-0-408-70942-2>
67. Choi B, Weiss-Schneeweiss H, Temsch EM, So S, Myeong H-H, Jang T-S. Genome size and chromosome number evolution in Korean *Iris* L. species (Iridaceae Juss.). Plants [Internet]. 2020;9(10):1284. Available from: <https://www.mdpi.com/2223-7747/9/10/1284>
68. Megías M, Molist P, Pombal M. Atlas de histología animal y vegetal. Tejidos vegetales: Conducción. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Universidad de Vigo. 14pp [Internet]. 2017; Available from: <https://pepm-sal.infed.edu.ar/sitio/wp-content/uploads/2020/04/atlas-celula-01-introduccion.pdf>
69. Souza-Macedo V de, García-Dávila MA, Castro GR de, Garzón-Bautista YM, Caetano CM. Cytogenetic evaluation of chili (*Capsicum* spp., Solanaceae) genotypes cultivated in Valle del Cauca, Colombia. Acta Agronómica [Internet]. 2017;66(4):612–7. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-28122017000400612](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28122017000400612)
70. Heller FO. DNA-MEASUREMENT OF VICIA-FABA L WITH PULSE CYTOPHOTOMETRY. Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft. 1973;86(5–9):437–41.
71. Dolezel J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. Journal of applied Genetics [Internet]. 1997;38(3). Available from: <http://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.agro-article-65186f6b-a55c-4ced-b381-357e1716f2a5>
72. Loureiro JCM. Flow cytometric approaches to study plant genomes [Internet]. Universidade de Aveiro (Portugal); 2007. Available from: <https://www.proquest.com/openview/3f8407d8f62e907a61eb6266a5ca4dbe/1?pq-origsite=gscholar&cbl=2026366>

73. Tomaszewska P, Pellny TK, Hernández LM, Mitchell RA, Castiblanco V, de Vega JJ, et al. Flow cytometry-based determination of ploidy from dried leaf specimens in genomically complex collections of the tropical forage grass *Urochloa* s. l. bioRxiv [Internet]. 2021; Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.03.26.437252v1.abstract>
74. Moonkaew P, Nopporncharoenkul N, Jenjittikul T, Umpunjun P. Cytogenetic and pollen identification of genus *Gagnepainia* (Zingiberaceae) in Thailand. *Comparative cytogenetics* [Internet]. 2020;14(1):11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6971126/>
75. Yurkevich OY, Samatadze TE, Selyutina IY, Romashkina SI, Zoshchuk SA, Amosova AV, et al. Molecular Cytogenetics of Eurasian Species of the Genus *Hedysarum* L.(Fabaceae). *Plants* [Internet]. 2021;10(1):89. Available from: <https://www.mdpi.com/2223-7747/10/1/89>
76. Falistocco E. Insight into the Chromosome Structure of the Cultivated Tetraploid Alfalfa (*Medicago sativa* subsp. *sativa* L.) by a Combined Use of GISH and FISH Techniques. *Plants* [Internet]. 2020;9(4):542. Available from: <https://www.mdpi.com/2223-7747/9/4/542>
77. Ali HB, Lysak MA, Schubert I. Genomic in situ hybridization in plants with small genomes is feasible and elucidates the chromosomal parentage in interspecific *Arabidopsis* hybrids. *Genome* [Internet]. 2004;47(5):954–60. Available from: <https://cdnsiencepub.com/doi/abs/10.1139/g04-041>
78. Zúñiga Orozco A, Carrodeguas González A. *Echeveria* (Crassulaceae): Potencial para la mejora genética como ornamental. *Avances en Investigacion Agropecuaria* [Internet]. 2021;25(3). Available from: <https://web.a.ebscohost.com/abstract?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=01887890&AN=152784811&h=GAc%2fP99pQ1turyHWas7Eodczrf6DxIaMO0fOtGBXyAUt8ppeGQGcJex9Ehjusv3wAeCx520PXn9ZgtHc63VYg%3d%3d&crl=c&resultNs=AdminWebAuth&resultLocal=ErrCrINotAuth&crlhashurl=login.aspx%3fdirect%3dtrue%26profile%3dehost%26scope%3dsite%26authtype%3dcrawler%26jrnl%3d01887890%26AN%3d152784811>
79. Nowak MD, Pedersen ATM, Brysting AK, Schrøder-Nielsen A, Elven R, Bjorå CS. Testing hypotheses of hybrid origins for two seashore species of *Carex* section *Phacocystis* (Cyperaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* [Internet]. 2020;194(1):100–17. Available from: <https://academic.oup.com/botlinnean/article/194/1/100/5856095?login=true>