

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**“NIVELES DE PLOIDÍA DE PLANTAS ANDROGÉNICAS DE
AGUAYMANTO (*Physalis peruviana* L.) ASOCIADO A
CARACTERES CITOGENÉTICOS Y MORFOLÓGICOS”**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO

GEAN CARLO CIPRIAN SALCEDO

LIMA-PERÚ

2022

La UNALM es titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación
(Art. 24 – Reglamento de Propiedad Intelectual)

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

**“NIVELES DE PLOIDÍA DE PLANTAS ANDROGÉNICAS DE
AGUAYMANTO (*Physalis peruviana* L.) ASOCIADO A CARACTERES
CITOGENÉTICOS Y MORFOLÓGICOS”**

GEAN CARLO CIPRIAN SALCEDO

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE:
INGENIERO AGRÓNOMO**

Sustentada y aprobada ante el siguiente Jurado

Ing. Mg. Sc. María de Lourdes Tapia
Figueroa
Presidente

Dr. Jorge Jiménez Dávalos
Asesor

Dr. Gastón Zolla Benites
Co-Asesor

Ing. Mg. Sc. Rolando Egúsquiza
Bayona
Miembro

Ing. Saray Siura Céspedes
Miembro

LIMA-PERÚ

2022

DEDICATORIA

En su descanso eterno dedico este trabajo a mis abuelos Roberto Salcedo Quispe y Nelly Puchuri Arotinco por brindarme abrigo, protección y consejos en los momentos más difíciles de mi niñez. Mi gratitud hacia ellos por enseñarme el lado dulce y amargo de la vida en los innumerables viajes que detonaron día a día la felicidad que hoy recuerdo con mucho anhelo

A mi Madre Rina Nelly que me acompaña y siempre me levanta de mi continuo tropiezo, por la paciencia que ha tenido al enseñarme a ser una persona autosuficiente en esta vida, por demostrarme su apoyo y amor a pesar de nuestras diferencias.

A mis hermanos Ray y Tracy que su presencia en mi vida me enseñó muchas cosas que hoy me sirve para siempre y espero ser un ejemplo académico para ellos.

A mi tío Elvis Salcedo Mendoza por depositar su confianza y brindarme las herramientas necesarias para lograr los objetivos trazados.

A mis tíos, tías, primo y sobrinos, su compañía y motivación son la madera que alimenta el fuego de mi felicidad hoy en día.

A la linda tierra de Ayacucho, por ser el faro que guía mi pasión y amor por la agricultura

AGRADECIMIENTO

A mi asesor Dr. Jorge Jiménez Dávalos y mi co-asesor Dr. Gastón Enrique Martín Zolla Benites por recibirme en el Laboratorio de Biotecnología del PIPS en Cereales y Granos Nativos para la realización del presente trabajo de investigación, su orientación, apoyo y consejo, ayudaron a mi formación profesional y personal. Sin ellos el presente trabajo no hubiese culminado con éxito.

A mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología por su tiempo y múltiples conversaciones que ayudaron a mi formación profesional con su experiencia y consejos.

Al Grupo de Investigación en Recursos Genéticos (RECGEN) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en la orientación y las facilidades en el estudio citogenético a través de sondas fluorescentes.

A la Dra. Florencia Realini de la Universidad de Buenos Aires por su apoyo en los estudios citogenéticos en el Laboratorio de Citogenética y Evolución de la Universidad de Buenos Aires.

Al Vice-Rectorado de Investigación de la Universidad Nacional Agraria La Molina por el apoyo económico para la ejecución de este proyecto.

Al Dr. Jaroslav Doležal del Institute of Experimental Botany por facilitarnos los estándares de referencia para el estudio del tamaño de genoma.

A Alexandra Elbakyan por darnos el acceso libre a información científica de alto impacto.

INDICE

I. INTRODUCCION	1
1.1. OBJETIVO GENERAL	2
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN.....	3
2.2. DISTRIBUCIÓN EN EL PERÚ	3
2.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y TAXONOMÍA	3
2.4. TAXONOMÍA DE AGUAYMANTO (<i>Physalis peruviana</i> L.).....	4
2.5. PROPIEDADES MEDICINALES Y VALOR NUTRICIONAL	4
2.6. COMERCIALIZACIÓN DE AGUAYMANTO	5
2.7. PRINCIPALES DEPARTAMENTO PRODUCTORES	6
2.8. PRINCIPALES MERCADOS INTERNACIONALES	6
2.9. MEJORAMIENTO GENÉTICO	7
2.10. CULTIVO DE ANTERAS.....	8
2.11. PLOIDÍA EN LAS PLANTAS Y SU APROVECHAMIENTO EN EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE PLANTAS.....	8
2.12. ESTIMACION DE NIVEL DE PLOIDÍA.....	9
2.12.1. Conteo de cromosomas	9
2.12.2. Citometría de flujo	10
2.13. ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE GENOMA EN PLANTAS	12
2.14. CARACTERÍSTICAS ASOCIADAS AL NIVEL DE PLOIDÍA.....	14
III. MATERIALES Y METODOS	16
3.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO	16
3.2. MATERIALES Y REACTIVOS	16
3.2.1. Material vegetal	17
3.2.2. Equipo de laboratorio.....	17
3.3. METODOLOGÍA	17
3.3.1. Determinaciones Citogenéticas.	17
3.3.2. Determinaciones Morfológicas	19
3.4. ANÁLISIS EXPERIMENTAL.....	20
3.4.1. Diseño experimental	20

3.4.2. Procesamiento de la información	20
3.4.3. Análisis de Datos	21
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1. NIVEL DE PLOIDÍA Y CONTEO CROMOSÓMICO	22
4.2. DENSIDAD ESTOMÁTICA Y TAMAÑO DE ESTOMA	24
4.3. TAMAÑO DE GENOMA (TG)	27
4.4. DIÁMETRO DE POLEN.....	30
4.5. VIBIALIDAD DE GRANO DE POLEN.....	30
4.6. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICOS A NIVEL FLORAL.....	31
4.7. DEFORMACIÓN DEL ÓRGANO FLORAL	33
V. CONCLUSIONES	35
VI. RECOMENDACIONES.....	36
VII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
VIII. ANEXOS	51

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Niveles de nutrientes, minerales y bioactivos solubles en agua de pulpa de aguaymanto.....	5
Tabla 2: Lista de inhibidores de síntesis de huso acromático para la obtención de poliploides artificiales.....	9
Tabla 3: Lista de Géneros con amplio nivel de ploidia.....	10
Tabla 4: Principales fluorocromos usados en la citometría de flujo.....	11
Tabla 5: Principales tampones de aislamiento nuclear.....	12
Tabla 6: Recopilación de principales estándares en el estudio de estimación del tamaño del genoma en plantas.....	13
Tabla 7: Parámetros asociados al nivel de ploidía.....	15
Tabla 8 Valores medios y prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) del largo, ancho y densidad del estoma y los diferentes grupos de ploidia (2x, 4x, 6x) sdfddf.....	27
Tabla 9 Estimación del valor "C" de individuos androgénicos de aguaymanto.....	28
Tabla 10: Diámetro del grano de polen de los grupos androgénicas reconocidos a través de citometría de flujo y conteo de cromosomas.....	30
Tabla 11 : Valores medios y prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) de las Medición de pistilo, ancho de ovario, área de cáliz y corola de diferentes grupos de ploidia (2x, 4x, 6x).....	33

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Exportación del aguaymanto periodo 2013-2017.....	6
Figura 2: Países destino del aguaymanto peruano (%).	6
Figura 3: Principio de funcionamiento de un citómetro de flujo.	11
Figura 4: A) Estandarización externa B) Estandarización interna.	14
Figura 5: A)Aguaymanto androgénico Dihaploide ($2n=2x=24$),B) Aguaymanto androgénico Tetraploide ($2n=4x=48$),C)Aguaymanto androgénico Hexaploide ($2n=6x=72$), D) Estandarización interna 2x y 4x, E) Estandarización externa 4x y 6x.	23
Figura 6: Conteo de cromosomas teñido con DAPI A) Aguaymanto Dihaploide ($2n=2x=24$) B) Aguaymanto Tetraploide ($2n=4x=48$)	24
Figura 7: Distribución de estomas en el envés de hoja A) dihaploide B) tetraploide C) hexaploide D, E y F) Regresión lineal del largo, ancho y densidad de estoma respecto al tamaño de genoma.....	25
Figura 8: A) Diagrama de caja de largo de estoma; B) Diagrama de cajas ancho de estomas	26
Figura 9: Estimación de la cantidad absoluta de ADN nuclear (tamaño del genoma) en individuos androgénicos de aguaymanto. A) Comparación de pico G1 de Secale cereale “Dankovske” y genotipo dihaploides ($2n=2x=24$) de aguaymanto B) Comparación de pico G1 de Pisum sativum “Ctirad” y genotipo Tetraploide ($2n=4x=48$) de aguaymanto C) Comparación de pico G1 de Pisum sativum “Ctirad” y genotipo Hexaploide ($2n=6x=72$) de aguaymanto.....	29
Figura 10: Viabilidad de polen de plantas androgénicas de aguaymanto A) Genotipo M17 ($2n=2x=24$), B) Genotipo M21 ($2n=4x=48$), C) Genotipo M18 ($2n=6x=72$)	31
Figura 11: A) Vista frontal y posterior de flores. Bar=1cm, B) Tamaño de pistilo a diferentes niveles de ploidia. Bar=1mm; Regresión lineal de los órganos de flores respecto al tamaño de genoma C) Largo de gineceo) Ancho de ovario, E) Área de corola, F) Área de sépalo.	32
Figura 12: A) Flor normal dihaploide ($2n=2x=24$); B y C) Presencia de anomalías homeóticas de la planta dihaploide ($2n=2x=24$).....	34

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Medición del grano de polen de un tetraploide (Bar= 50um)	51
Anexo 2 : Características del estoma (largo, ancho y densidad), intensidad de fluorescencia, cantidad de cromosomas y nivel de ploidia	52

RESUMEN

La determinación del nivel de ploidía de plantas androgénicas es de importancia para la formación de híbridos dentro de las técnicas de mejoramiento genético de plantas. El presente estudio, realizado con 21 plantas androgénicas de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) tuvo como objetivos determinar la ploidía mediante técnicas citogenéticas (conteo de cromosomas con tinción DAPI y citometría de flujo) y caracterizar sus estructuras florales (Largo de gineceo, ancho de ovario, viabilidad de grano de polen, área de cáliz y corola) y morfológicas (largo, ancho y densidad de estomas; diámetro de grano de polen). A través del conteo de cromosomas y la citometría de flujo se evidenciaron diferentes niveles de ploidía: 71.42% fueron dihaploides, 23.80% tetraploides y 4.78 % hexaploides con 24, 48 y 72 cromosomas, los cuales, presentaron 6.29, 13.16 y 20.27 pg de ADN respectivamente. Asimismo, el largo ($y=1.34x+16$, $r^2=0.8624$, $p<0.05$) y ancho ($y=0.73x+14.74$, $r^2=0.8882$, $p<0.05$) de estomas, aumentaron significativamente a medida que se eleva el tamaño del genoma. No obstante, la densidad estomática ($y=580.39-26.46x$; $r^2=0.7344$, $p<0.05$) declina significativamente respecto a mayores niveles de genoma. Dentro de la evaluación de los órganos florales, se observó la reducción significativa del grupo 2x respecto a los otros grupos 4x y 6x; sin embargo, el grupo 6x no mostró diferencias estadísticas respecto a los 4x. Por otro lado, solo el diámetro de polen del grupo 6x fue superior a los otros grupos 2x y 4x; en consecuencia, el nivel de ploidía se puede determinar a través de la densidad y de las dimensiones de las estomas. En etapas más avanzadas de la planta las variaciones a nivel de la estructura floral son importantes para confirmar la reducción del nivel de ploidía; de esta manera, las pruebas del conteo de cromosomas y citometría de flujo en hojas jóvenes son complementarias.

Palabras clave: Citometría de flujo, ploidia, aguaymanto, cromosomas.

ABSTRACT

The accurate identification of the ploidy level of androgenetic individuals is a critical point in plant breeding. Therefore, the aim of this study is to characterize 21 androgenic lines of aguaymanto through cytogenetic techniques (chromosome counting with DAPI and flow cytometry), stomatal parameters (length, width and density), morphological characterization at the floral level (Length of gynoecium, width of ovary, calyx and corolla area), diameter and viability of the pollen grain. Chromosome counting and flow cytometry revealed different levels of ploidy: 71.42% were dihaploid, 23.80% tetraploid, and 4.78% hexaploid with 24, 48, and 72 chromosomes and they also had 6.29, 13.16 and 20.27 pg of DNA content, respectively. Likewise, the length ($y=1.34x+16$, $r^2 = 0.8624$, $p < 0.05$) and width ($y = 0.73x+14.74$, $r^2 = 0.8882$, $p < 0.05$) of the stoma increased significantly as the genome size increases. However, stomatal density ($y=580.39-26.46x$; $r^2 = 0.7344$, $p < 0.05$) was reduced significantly with respect to higher genome levels. Related to floral organs, a significant reduction was observed at 2x compared to 4x and 6x groups. However, the 6x group did not show statistical differences with 4x. At pollen diameter, the 6x group had a higher diameter than 2x and 4x groups. Finally, the best parameters that can be correlated with ploidy level are stomatal density, length and width of the stoma. However, chromosome count and flow cytometry need to be used when the plants were more developed.

Keys Word: Flow cytometry, ploidy, golden berry, chromosome.

I. INTRODUCCION

Los frutos exóticos han experimentado un gran crecimiento en la demanda internacional (Cook 1997; Espinoza 2011), por sus importantes aportes a la salud y sus interesantes explotaciones culinarias. En esta categoría se encuentra el aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) especie *Solanaceae*, que tiene su origen en la Cordillera de los Andes, principalmente Perú (Flórez et al., 2000). Su fruto se caracteriza por tener un sabor ácido azucarado con un alto contenido de vitaminas (A, B y C), hierro, y antioxidantes (Flórez et al., 2000). Además, se le atribuye beneficios a la salud y la reducción de ciertas enfermedades (Ramadan et al., 2015; Ramanna & Jacobsen, 2003), a pesar de sus aportes a la salud se le ha considerado como una maleza y en algunos casos como una planta asociada a los cultivos (Flórez et al., 2000).

En los últimos años Colombia ha desarrollado diversas tecnologías en el proceso de producción y postcosecha de aguaymanto y el ecotipo ‘Colombiano’ se destaca por tener mejor coloración y mayor contenido de azúcares (Flórez et al., 2000). Debido a esto, Colombia es considerado como el primer productor mundial, con una participación del 90% (MEF, 2016); en este sentido, el Perú ha ingresado a la producción de esta fruta, dentro de los productos exóticos orgánicos, considerados como la principal ventaja competitiva para la producción nacional.

En nuestro país existen pocas variedades mejoradas, con respecto a mayor calidad de fruto y resistencia a estreses bióticos y abióticos, por lo que, se requiere incrementar las investigaciones que contribuyan a la obtención de nuevas variedades a través de la generación de líneas puras para el desarrollo de híbridos. El cultivo de anteras *in vitro* consiste en el desarrollo de las microsporas contenidas dentro de las anteras, con esto se evita el desarrollo gametofítico e inducir el desarrollo esporofítico (Mayakaduwa & Silva, 2021; Naik et al., 2016); sin embargo, los individuos obtenidos son en su mayoría haploides pero también se pueden encontrar individuos no haploides (Germanà, 2011; Segui-Simarro & Nuez, 2007). Esto incita a la investigación del nivel de ploidía de los individuos regenerantes androgenéticos a través de diferentes metodologías de identificación.

1.1.OBJETIVO GENERAL

- Determinar el nivel de ploidía de individuos androgénicos, mediante el estudio de sus caracteres citogenéticos y morfológicos.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el nivel de ploidía a través de la técnica del Conteo de cromosomas y citometría de flujo.
- Estimar el tamaño de genoma de los individuos androgénicos de aguaymanto a través de la citometría de flujo
- Estudiar el tamaño y densidad estomática del envés de la hoja y relacionarlo con el nivel de ploidía.
- Evaluar la viabilidad del grano y el tamaño del grano de polen en las plantas androgénicas de aguaymanto.
- Estudiar las alteraciones morfológicas en los órganos florales relacionadas al nivel de ploidía de los individuos estudiados.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

El aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) es una planta que pertenece a la familia de las *Solanaceae* del género de las *Physalis* y tiene sus orígenes en los andes de sudamericanos, principalmente Colombia, Ecuador y Perú (Flórez et al., 2000)

Esta especie fue conocida por los Incas y los españoles quienes lo introdujeron en Sudáfrica hace más de 200 años. El fruto tiene un alto contenido de vitaminas (A, B y C) que sirvió en la prevención del escorbuto en los extensos viajes marítimos desde el Nuevo Mundo, y desde allí se distribuyó a Kenia, Zimbabue, Australia, Nueva Zelanda, Hawái, y la India (Flórez et al., 2000).

2.2. DISTRIBUCIÓN EN EL PERÚ

De acuerdo a la geografía del Perú, el aguaymanto se distribuye principalmente en los valles interandinos, principalmente en altitudes que van desde los 1500 hasta los 3000 msnm, con temperaturas promedio que oscilen entre los 13 y 18 °C, con una precipitación 1000 y 2000 mm y con suelo bien drenado con un pH 5.5-7 y con alto contenido de materia orgánica (Flórez et al., 2000).

Debido a estas exigencias tiene mayor presencia en los departamentos de Ancash, Huánuco, Junín, Ayacucho, Arequipa, Cajamarca y Cuzco; sin embargo, también hay presencia en la costa y selva (Schreiber 2012).

2.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y TAXONOMÍA

El aguaymanto es una especie herbácea que por lo general alcanza de 0.6-0.9 m de altura y ocasionalmente alcanza hasta 1.8 metros si es podado y guiado, las ramas son acanaladas, sus hojas presentan una forma de corazón, puntiaguda y con bordes dentados. Las flores son amarillas y acampanadas, que son fácilmente polinizadas por insectos o por el viento (National Research Council, 1989).

El cáliz es pequeño al comienzo del desarrollo del fruto, crece hasta formar una estructura similar a una vejiga de 5 cm aproximadamente, la cual encierra por completo al fruto maduro, a lo largo de la maduración del fruto el cáliz cambia de color y de textura. El fruto es una baya globosa de 1.25-2 cm de anchos, liso y de un color naranja-amarillo de una piel y pulpa jugosa que en su interior contiene numerosas semillas (Morton, 1987).

2.4. TAXONOMÍA DE AGUAYMANTO (*Physalis peruviana* L.)

Reino: Plantae

Clase: Angiospermae

Subclase: Dicotyledoneae

Orden: Tubiflorae

Familia: Solanaceae

Género: *Physalis*

Especie: *peruviana* L.

Fuente: Brito, D.2002.

2.5. PROPIEDADES MEDICINALES Y VALOR NUTRICIONAL

El aguaymanto tiene una pulpa nutritiva (Tabla 1) en la que contiene altos niveles de carotenoides, vitaminas (A, B y C) y minerales (Morton, 1987; Ramadan et al., 2015). Estas le brindan la capacidad de reducción de ciertas enfermedades como cáncer, la malaria, el asma, la hepatitis, la dermatitis, el reumatismo y propiedades antidiabéticas (Ramadan et al., 2015).

Tabla 1: Niveles de nutrientes, minerales y bioactivos solubles en agua de pulpa de aguaymanto

COMPONENTE	CANTIDAD
Humedad (g/100g)	78.9
Proteína (g/100g)	0.05-0.3
Lípidos (g/100g)	0.15-0.2
Carbohidratos (g/100g)	19.6
Fibra (g/100g)	4.9
Ceniza (g/100g)	1
Calcio (mg/100g)	8
Fósforo (mg/100g)	55.3
Hierro (mg/100g)	1.2
Caroteno (mg/100g)	1.6
Tiamina (mg/100g)	0.1
Riboflavina (mg/100g)	0.03
Niacina (mg/100g)	1.7
Ac. Ascórbico (mg/100g)	43

Fuente: Ramadan y Mörsel.2003.

2.6. COMERCIALIZACIÓN DE AGUAYMANTO

En los últimos años las exportaciones peruanas de aguaymanto son crecientes, desde 59.893 toneladas en el 2010 a 376.196 en el 2017 (Figura 1), este incremento en las exportaciones de aguaymanto se ha debido principalmente a las diferentes presentaciones del producto como aguaymanto fresco, aguaymanto deshidratado, aguaymanto orgánico, pulpa de aguaymanto orgánico, aguaymanto cubierto de chocolate, mermelada orgánica de aguaymanto, entre otros (Minagri, 2016).

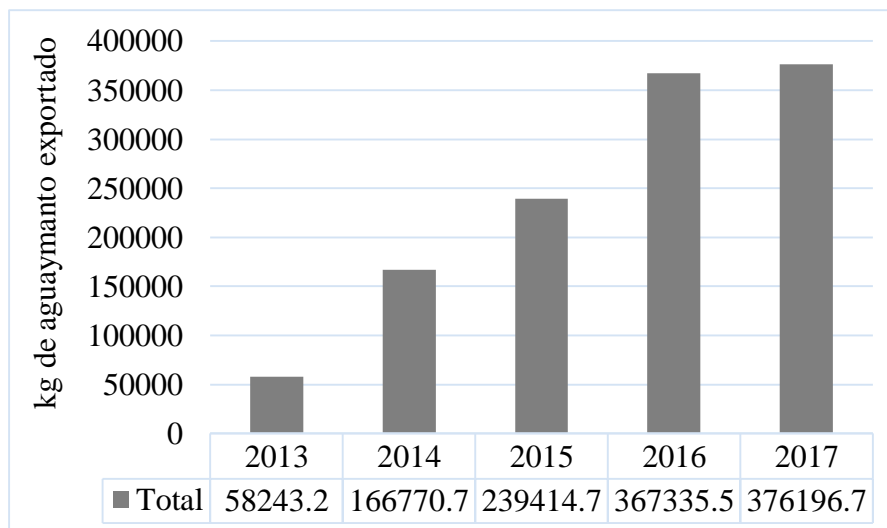


Figura 1: Exportación del aguaymanto periodo 2013-2017. Fuente: Siicex.2018.

2.7. PRINCIPALES DEPARTAMENTO PRODUCTORES

La producción de aguaymanto en el país se localiza principalmente en las regiones de Amazonas, Áncash, Huánuco, Junín, Ayacucho, Cuzco, Puno y Cajamarca, esta última se destaca como la principal zona de producción (Minagri, 2016).

2.8. PRINCIPALES MERCADOS INTERNACIONALES

En la Figura 2, Siicex (2018) reporta que los productos de aguaymanto de Perú tuvieron como destino 35 países, siendo el principal destino Holanda (31.79%), Estados Unidos (28.68%), Alemania (14.68%), Israel (3.66%) y otros (24.85%).

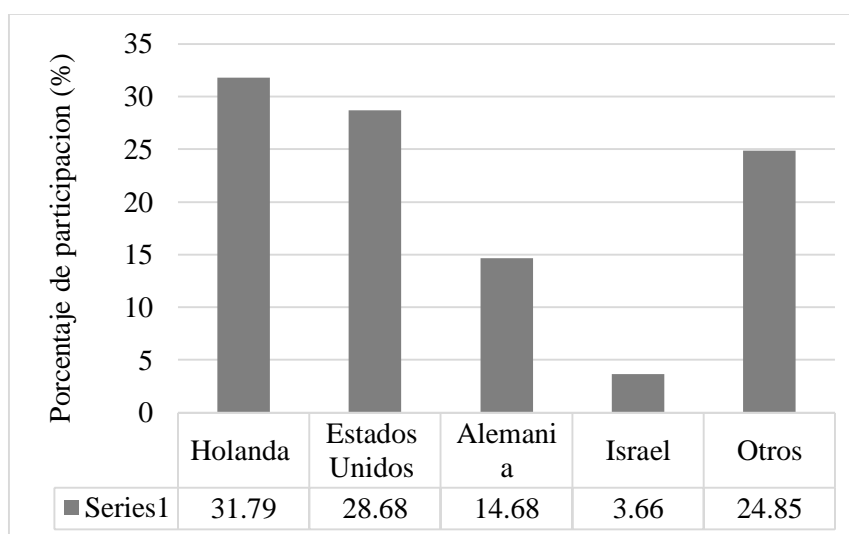


Figura 2: Países destino del aguaymanto peruano (%). Fuente: Siicex.2018

2.9. MEJORAMIENTO GENÉTICO

Las diversas técnicas de mejoramiento genético han contribuido al desarrollo de variedades en diferentes especies con resultados positivos; algunos ejemplos son el mejoramiento del contenido de azúcar en la remolacha que contenía 9% de azúcar; hoy existen en el mercado variedades que contienen más del 20 % de azúcar, otro ejemplo es el rendimiento de maíz que se incrementó de 5 t/ha en Estados Unidos y Europa a rendimientos superiores a las 20 t/ha; en trigo el rendimiento era de 5 t/ha., hoy exceden las 10 t/ha (Vallejo & Estrada, 2002)

El mejoramiento genético es considerado arte y ciencia que tiene la capacidad de alterar o modificar la herencia de las plantas para obtener nuevos cultivares mejorados genéticamente con capacidad de adaptarse a condiciones específicas, con mayores rendimientos económicos y de mejor calidad que las variedades nativas o criollas. En otras palabras, busca crear genotipos cuyo patrimonio hereditario esté de acuerdo con las condiciones, necesidades y recursos de los productores rurales, de la industria y de los consumidores(Vallejo & Estrada, 2002).

El mejoramiento genético utiliza diferentes metodologías que incluyen técnicas como: los cruzamientos dirigidos (cruzamientos dentro y entre especies), mutaciones inducidas, tilling, poliploidización, esterilidad masculina citoplasmática (CMS), fusión de proplastos, fusión de citoplastos, generación de doble haploides, entre otros (Messmer et al., 2015)

La regeneración de plantas dobles haploides, es una herramienta importante para los programas de mejoramiento y estudios genéticos, permite obtener líneas puras en corto tiempo comparado con los métodos convencionales a través de la duplicación de plantas haploides provenientes de la primera generación de cruza, en ese sentido se ha reportado la aplicación de esta técnica en especies de la familia *Solanaceae* como *Physalis ixocarpa* (Ortuño-Olea et al., 1998), *Solanum melongena* L (Rotino, 2016), *Capsicum annuum* L., (Lantos & Pauk, 2016), *Solanum melongena* (Rivas-Sendra et al., 2017).

2.10. CULTIVO DE ANTERAS

Entre los métodos disponibles actualmente para la obtención de dobles haploides, la más utilizada son la androgénesis (cultivo *in vitro* de anteras) y el uso de líneas inductoras de haploidía.

La androgénesis consiste en el cultivo de anteras en un medio de inducción, donde las microsporas (dentro de la antera) competentes originarán callos, que serán luego transferidos a un medio apropiado para la regeneración de plantas (Cimò et al., 2017). Sin embargo, los individuos obtenidos en su mayoría son haploides pero también se pueden encontrar individuos no haploides (Diploides, poliploides y aneuploides) (Germanà, 2011; Germanà et al., 2005; Segui-Simarro & Nuez, 2007).

2.11. PLOIDÍA EN LAS PLANTAS Y SU APROVECHAMIENTO EN EL MEJORAMIENTO GENETICO DE PLANTAS

Se considera poliploide, aquel organismo que tiene números diferentes a dos copias de cada cromosoma en su núcleo (Münzbergová, 2006), estas alteraciones en la cantidad de ADN ha contribuido al crecimiento en la biodiversidad de las angiospermas, incluyendo Poaceae, Solanaceae, Fabaceae y Brassicaceae (Soltis et al., 2009) y a la especiación de las mismas en 2- 4% y 7% en helechos (Otto & Whitton, 2000), en consecuencia, la poliploidización surge como una gran fuerza de evolución para las plantas silvestres y cultivadas (Sattler et al., 2016).

Los organismos que han ampliado su genoma, han mostrado tener mejores caracteres, exhibiendo mayor vigor, altos niveles de rendimiento, mejor calidad del órgano aprovechable, aumento a la tolerancia al estrés (biótico y abiótico), aumento de metabolitos secundarios (Lavanaia, 2005; Levin, 2004; Tsukaya et al., 2015), cambios morfológicos y alteraciones reproductivas en comparación a sus progenitores (Mable, 2003). Estas atribuciones son debido al efecto ‘Gigas’, una expresión aprovechada por los mejoradores de plantas (Sattler et al., 2016).

Al mismo tiempo, se han descubierto sustancias que actúan como inhibidores de huso acromático (Tabla 2), en la metafase del ciclo celular y que han permitido la generación de poliploides artificiales. Este método se ha utilizado eficazmente en programas de mejoramiento de papa, alfalfa, trébol rojo, ñame, rosa, lirio y varias otras especies de

interés económico (Peloquin et al., 1999; Ramanna & Jacobsen, 2003) y ha sido considerado el medio más rápido para la mejora vegetal (Lavania, 2005).

Tabla 2: Lista de inhibidores de síntesis de huso acromático para la obtención de poliploides artificiales

Inhibidor	Especie	Referencia
Colchicina	<i>Dionaea muscipula</i> E.	(Anchalee, 2014)
	<i>Lolium multiflorum</i> L.	(Pereira et al., 2014)
	<i>Brachiaria brizantha</i>	(Pinheiro et al., 2000)
	<i>Citrus spp</i>	(Aleza et al., 2009)
Orizalina	<i>Malus</i>	(Bartish et al., 1998)
	<i>Musa spp</i>	(Ganga & Chezhiyan, 2002)
	<i>Solanum</i>	(Greplová et al., 2009)
	<i>Hylocereus monacanthus</i>	(Tel-Zur et al., 2011)
Trifluralina	<i>Spathiphyllum wallisii</i>	(Eeckhaut et al., 2004)
2,6-Dinitroaniline	<i>Rhododendron</i>	
	<i>Citrullus lanatus</i>	(Omran et al., 2008)

2.12. ESTIMACIÓN DE NIVEL DE PLOIDÍA

2.12.1. Conteo de cromosomas

La poliploidía es un factor importante en la evolución de las plantas (Tabla 3) y ha generado variación en la cantidad de cromosomas de las especies, dando como resultado la alteración en los niveles de ploidía.

Múltiples programas de mejoramiento genético en plantas establecen como principal necesidad la determinación correcta del nivel de ploidía siendo el método más usado el conteo de cromosomas (Poggio et al., 2004). Es así que se proponen pasos para la obtención de los cromosomas expandidos en las placas, cuyo proceso se detalla a continuación:

- Tratamiento: El objetivo del tratamiento es el aumento de células en metafase y la condensación de los cromosomas, por ello se requiere inhibidores de huso acromático como la colchicina, 8-hidroxiquinolina y agua helada, estos compuestos pueden variar en su concentración y exposición (J. Maluszynski et al., 2003).

- Fijación: La solución de Carnoy es un fijador ampliamente usado en citología, tanto de animales como de plantas, cuya función es la preservación del ácido nucleico.
- Hidrólisis: Esta etapa consiste en desintegrar la pared de la célula para tener células expandidas a la hora del squash. Se utiliza enzimas (celulasas, pectinasas, macerozima) y/o ácido clorhídrico (Rodríguez & Bueno, 2006).
- Coloración y aplastado : Para el conteo de los cromosomas es necesario teñir los cromosomas con sustancias afines a los nucleótidos y por lo general se usa Acetocarmin, Acetorceína, Lacto-propiónico, Fulgen etc. (J. Maluszynski et al., 2003). Luego de este procedimiento se presiona la muestra con la finalidad de tener células expandidas y dispuestas para su observación en el microscopio.

Tabla 3: Lista de Géneros con amplio nivel de ploidia

Género	Nivel de ploidía	Referencia
<i>Mecardonia</i>	2x -6x	(Sosa et al., 2016)
<i>Solanum</i>	2x-4x	(Greplová et al., 2009)
	2x-4x-5x-6x	(Cai et al., 2012)
<i>Veronica</i>	2x-4x-6x	(Castro et al., 2012)
<i>Ipomoea</i>	2x-4x-6x	(Nishiyama et al., 1975)
<i>Triticum</i>	2x-4x-6x	(Matsuoka, 2011)
<i>Hylocereus</i>	2x-4x-8x	(Cohen & Tel-Zur, 2012)
	3x-6x	(Tel-Zur et al., 2004)
<i>Polylepis</i>	2x-4x-6x	(Schmidt-Lebuhn et al., 2010)
<i>Vaccinium</i>	2x-4x	(Lyrene et al., 2003)

2.12.2. Citometría de flujo

La citometría de flujo es una herramienta analítica de alto rendimiento que detecta y cuantifica múltiples parámetros bioquímicos, biofísicos y moleculares de partículas individuales (generalmente células o núcleos) marcados con una sonda fluorescente, a medida que fluye en suspensión hacia un haz de luz (Figura 3). Principalmente, las partículas en suspensión teñidas con un fluorocromo se intersectan con el haz de luz, emitiendo así una luz fluorescente, las señales se envían a través de una serie de filtros, fotodetectores, convertidores y multiplicadores a una computadora, donde se almacenan y se manifiestan en forma de histograma. (Adan et al., 2017; Kron et al., 2007; Wilkerson, 2012). Este enfoque hace que la técnica sea una herramienta poderosa para el análisis detallado de poblaciones complejas en un corto período de tiempo, la preparación de la muestra solo toma unos minutos y no requiere de reactivos costosos. Asimismo, este método ha sido probada en más de 6000 especies (Pellicer & Leitch, 2020).

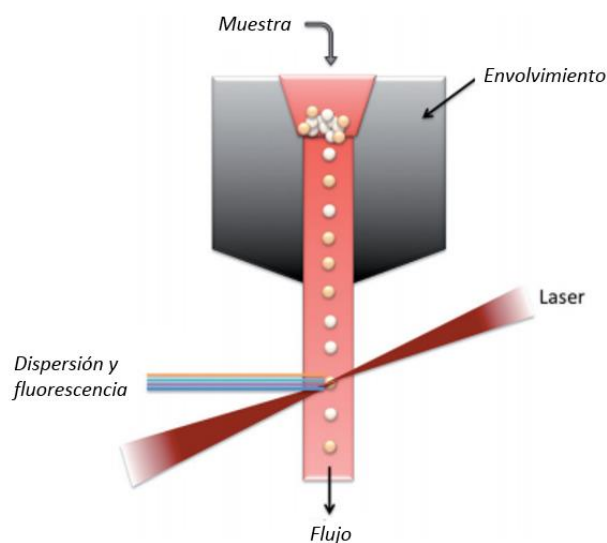


Figura 3: Principio de funcionamiento de un citómetro de flujo. Fuente:(Adan et al., 2017)

a) Fluorocromos

El fluorocromo es una molécula que se une estequiométricamente a la partícula/célula en estudio, la sustancia absorbe energía de longitud de onda específica y la emite en otra longitud de mayor intensidad. Existen una amplia gama de fluorocromos (Tabla 4) y la elección depende de la capacidad que tenga el equipo en excitar al fluorocromo y de detectar su energía emitida.

Tabla 4: Principales fluorocromos usados en la citometría de flujo

Fluorocromo	Modo de unión	Concentración ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Longitud de excitación (nm)	Longitud de emisión (nm)
Bromuro de etidio	Intercalante	50-150	523	603
Yoduro de propidio	Intercalante	50-150	538	617
DAPI(4,6-diamidino-2-fenilindol)	AT-Selectivo	2-4	359	461
Hoechst 33258	AT-Selectivo	2-4	352	455
Mitramicina	GC-Selectivo	50-100	445	575

Fuente: Cires *et al.* 2011

b) Tampones de aislamiento nuclear

La composición del tampón de aislamiento nuclear difiere considerablemente en la composición química (Tabla 5) y la elección depende de la conservación de las partículas/células al momento de su aplicación. Este conocimiento es necesario para seleccionar el tampón apropiado para una especie y tejido dado (Loureiro et al., 2006).

Tabla 5: Principales tampones de aislamiento nuclear

Tampón	Composición
Galbraith	45 mM MgCl ₂ ; 30 mM citrato de sodio; 20 mM MOPS; 0.1% (v/v) Triton X-100; pH 7.0
MgSO ₄	9.53 mM MgSO ₄ .7H ₂ O; 47.67 mM KCl; 4.77 mM HEPES; 6.48 mM DTT; 0.25% (v/v) Triton X-100; pH 8.0
LB01	15 mM Tris; 2 mM Na ₂ EDTA; 0.5 mM spermine.4HCl; 80 mM KCl; 20 mM NaCl; 15mM β-mercaptoethanol; 0.1% (v/v) Triton X-100; pH 7.5
Otto	Otto I: 100 mM Ácido cítrico monohidratado; 0.5% (v/v) Tween 20 (pH aprox. 2-3). Otto II: 400mM Na ₂ PO ₄ .12H ₂ O (pH aprox. 8-9).
Tris.MgCl ₂	200 mM Tris; 4 mM MgCl ₂ .6H ₂ O; 0.5% (v/v) Triton X-100; pH 7.5

Fuente: Cires *et al.* 2011

2.13. ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE GENOMA EN PLANTAS

El estudio de tamaño genómico tiene como principio la comparación de núcleos en suspensión de un estándar de referencia (tamaño genómico conocido) con la especie vegetal en estudio (Doležel *et al.* 2007; Doležel y Bartoš 2005). La obtención del tamaño genómico ha permitido obtener información importante en múltiples áreas de la ciencia como: la taxonomía (Spooner et al., 2005), evolución (Kron et al., 2007), análisis de la biodiversidad (Marhold et al., 2010) y otros.

Aun así, los estándares deben cumplir requisitos:

- 1- La estabilidad genética debe ser contante
- 2- La cantidad de ADN debe ser cercana a la especie en estudio
- 3- De fácil manipulación
- 4- Tamaño del genoma conocido.

A pesar de ello, múltiples autores han utilizado estándares diferentes (Tabla 6), sin dejar de lado los requisitos descritos anteriormente.

Tabla 6: Recopilación de principales estándares en el estudio de estimación del tamaño del genoma en plantas.

Muestra estándar	ADN 2C valor (pg)	Referencia
Leucocitos humanos	7.00	(Lysák et al., 2000)
<i>Allium cepa</i>	34.76	(Doležel et al., 1992)
	33.55	(Johnston et al., 1999)
<i>Hordeum vulgare</i>	5.063	(Moscone et al., 2003)
	11.12	(Johnston et al., 1999)
<i>Pisum sativum</i>	9.56	(Johnston et al., 1999)
	9.09	(Dolezel et al., 2007)
<i>Vicia faba</i>	26.66	(Johnston et al., 1999)
	26.9	(Dolezel et al., 2007)
<i>Secale cereale</i>	16.19	(Frossasco et al., 2015)
<i>Zea mays</i>	5.43	(Dolezel et al., 2007)
	5.67	(Dolezel, 1998)
<i>Raphanus sativus</i>	1.11	(Dolezel et al., 2007)
	1.26	(Dolezel, 1998)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.32	(Bennett et al., 2003)
	0.39	(Dolezel, 1998)

La estandarización de la muestra en estudio puede ser externa (Figura 4 A) o interna (Figura 4B), la primera conlleva al análisis sucesivo de la muestra en un lado y del estándar en otro momento; mientras la interna, el análisis se realiza de manera simultánea (muestras con el estándar); este último, tiene mayor precisión; sin embargo, el uso de estándares de origen animal no son los más recomendables (Dolezel et al., 2007).

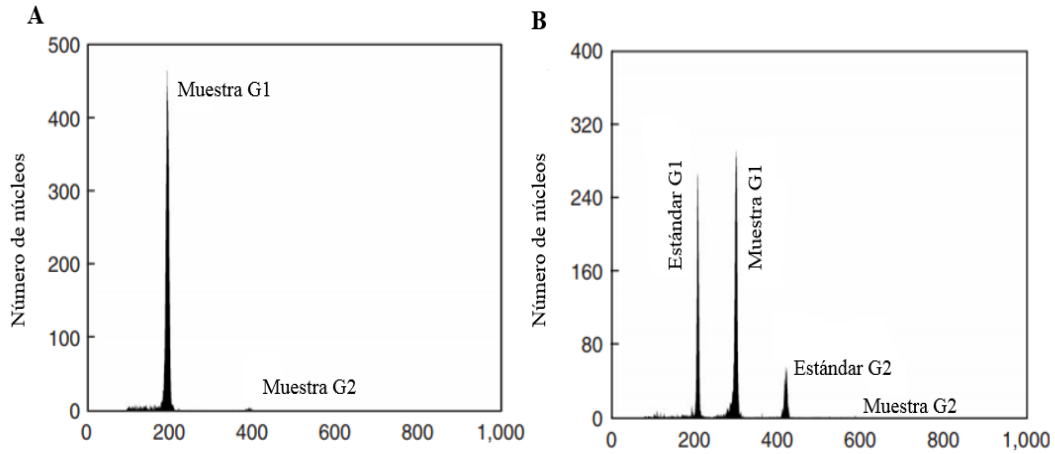


Figura 4: **A)** Estandarización externa **B)** Estandarización interna. Fuente:(Doležel et al., 2007)

2.14. CARACTERÍSTICAS ASOCIADAS AL NIVEL DE PLOIDIA

Un aumento o disminución en el nivel de ploidía conlleva a la alteración proporcional en la expresión génica (Galitski et al., 1999), exhibiendo heterosis (Comai, 2005) y frutos de mayor tamaño (Wu et al., 2012). Esta manifestación trae consigo variaciones fisiológicas y caracteres físicos de las células y la planta (Tabla 7).

Tabla 7: Parámetros asociados al nivel de ploidía.

Especie	Ploidía	Hoja				Flor		Referencia
		Estoma		N° de cloroplastos	Área foliar (cm ²)	Antera		
		Dimensión (µm)	Frecuencia (Número/mm ²)			Polen (µm)	Viabilidad de polen (%)	
<i>Acacia mearnsii</i>	2x	27.17±0.474	22.11±0.495	-	-	-	-	(Beck et al., 2003)
	4x	40.24±0.521	10.26±0.495	-	-	-	-	
	4x	40.42±2.8	53.24±12.52	-	-	35.49±2.8	-	
<i>Bromus inermis</i>	6x	53.06±3.79	36.48±8.73	-	-	37.93±4.87	-	(Geok-Yong & Dunn, 1973)
	8x	66.65±4.10	25.88±9.96	-	-	43.04±3.02	-	
	2x	25.54±2.76	55.87±3.83	-	0.443±0.05	38.78±1.02	98.7	
<i>Vicia Villosa</i>	2x	25.54±2.76	55.87±3.83	-	0.443±0.05	38.78±1.02	98.7	(Tulay & Unal, 2010)
	4x	31.61±3.26	41.5±6.77	-	0.596±0.07	50.346±3.17	80.97	
<i>Actinidia deliciosa</i>	x	17.6±1.6	-	-	-	-	-	(Przywara et al., 1988)
	2x	25.24±2.52	-	-	-	-	-	
<i>A. andreanum</i>	x	-	7.5±1.86	-	-	-	-	(Winarto et al., 2010)
	2x	-	7.7±1.31	-	-	-	-	
	3x	-	4.4±0.93	-	-	-	-	
<i>Capsicum annuum L.</i>	2x	-	-	9	-	-	-	(Supena et al., 2006)
	4x	-	-	16.3	-	-	-	
<i>Brassica rapa</i>	x	-	-	5.5	-	-	-	(Monakhos et al., 2014)
	2x	-	-	9.95	-	-	-	
<i>Brassica napus</i>	x	-	-	9.85	-	-	-	(Monakhos et al., 2014)
	2x	-	-	17.03	-	-	-	
<i>Brassica oleracea</i>	x	-	-	8.53	-	-	-	(Monakhos et al., 2014)
	2x	-	-	13.46	-	-	-	
<i>H. monacanthus</i>	2x	84.9±0.2	13.6±0.3	-	-	84.9±0.2	97.1±0.2	(Cohen et al., 2013)
	4x	107.9±0.4	12.6±0.3	-	-	107.9±0.4	86.6±1.4	
<i>T. parthenium</i>	2x	35.17±0.43	18.87±0.57	-	-	22.79±0.24	-	(Majdi et al., 2010)
	4x	63.73±0.45	8.5±0.37	-	-	30.14±0.29	-	
<i>Malus</i>	2x	14.85±0.2	29.5±0.17	-	-	-	-	(He et al., 2018)
	3x	26.27±0.09	19.73±0.1	-	-	-	-	

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del Programa de Investigación y Proyección Social (PIPS) en Cereales y Granos Nativos de la Universidad Nacional Agraria La Molina, ubicado en el Departamento de Lima, provincia de Lima, localizado a 76°56'37.41''(O) y 12°4'40.22''(S) y altitud de 245 msnm.

3.2. MATERIALES Y REACTIVOS

- Colchicina
- DMSO
- Acetocarmín al 2% (Sigma-Aldrich)
- DAPI
- Yoduro de propidio
- Ácido acético glacial 96%
- Solución nutritiva
- Agua destilada
- Sustrato (Premix/Vermiculita 2:1)
- Otto I y II
- RNAsa
- Glicerol
- Filtros 50 µm
- Hoja de afeitar
- Pinzas
- Placas Petri
- Porta y cubre objeto

3.2.1. Material vegetal

- Las 21 plantas utilizadas en el estudio fueron desarrolladas por el Laboratorio de Biotecnología y Mutaciones de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria La Molina (Lima-Perú) a través del cultivo *in vitro* de anteras de aguaymanto tetraploide ($2n=4x=48$) de la Región de Cajamarca-Perú.
- Los estándares de referencia para la estimación del tamaño del genoma fueron utilizados: *Pisum sativum* cv “Ctirad” (9.09 pg de ADN) y *Secale cereale* cv “Dankovske” (16.19 pg de ADN)

3.2.2. Equipo de laboratorio

- Autoclave JISICO I-NAS81
- Cámara fotográfica Samsung NX300
- Microcentrifuga mySPIN 12-Thermo Scientific
- Citómetro de flujo Attune NxT-Thermo Scientific
- Cámara fotográfica Dino-capture 2.0
- Microscopio Olympus BX40F4
- Estereoscopio Olympus
- Potenciómetro HANNA
- Vernier
- Microscopio de epifluorescencia ZEISS Axio Scope A1.

3.3. METODOLOGÍA

3.3.1. Determinaciones Citogenéticas.

a) Conteo de cromosomas

El conteo de cromosomas se realizó utilizando los meristemas radiculares de plantas *in vitro*, estos se pretrataron con colchicina al 0.03% durante 60-80 minutos en oscuridad a 37°C para permitir el mayor número posible de células en metafase, transcurrido el tiempo se lavó y se dejó reposar en agua destilada a 37°C durante una hora. Se fijó con solución de Carnoy durante 24 horas a 4°C. Transcurrido el tiempo se realizó múltiples lavados en movimiento con buffer Citrato (0.01M, pH 4.8) y las raíces fueron colocadas en una solución enzimática que contenía celulasa al 2% (de *Aspergillus niger*, Sigma) y pectinasa líquida al 10% (de

Aspergillus niger, Sigma), disueltas en 40% de glicerol en buffer citrato (0.01M, pH 4.8) por 80 minutos a 37°C. Después se realizaron 3 lavados con buffer citrato y uno con etanol de 70%.

A continuación, las puntas de las raíces fueron colocadas en portaobjetos, se adicionó una gota de ácido acético al 40% y se cubrió con un cubreobjetos para realizar la dispersión de las células. Luego, bajo el microscopio Olympus se seleccionó los campos ópticos con cromosomas dispersos y se precedió a levantar los cubreobjetos con hielo seco. Los portaobjetos con la muestra se deshidrataron con etanol al 100% y se dejó secar por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se montaron con 20 µl de SlowFade Gold Antifade (Invitrogen™), solución que contiene 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y antifade que es un medio de montaje que retarda el decaimiento de la fluorescencia, en oscuridad y a temperatura ambiente. Las muestras se examinaron y fotografiaron con un microscopio de epifluorescencia ZEISS Axio Scope.A1.

b) Nivel de ploidia

Con una hoja de afeitar se cortó en pequeños trozos una hoja joven en 0,2 ml de tampón de extracción de núcleos (CyStain® UV Precise T, Nuclei Extration Buffer; Sysmex), se mezcló con 0.8 ml de solución de tinción (CyStain® UV Precise T, DAPI Staining; Sysmex), se agitó durante 1 min y se filtró a través de una malla de nylon de 50 µm (CellTrics® filters, Sysmex). Los filtrados, que contenían más de 5000 núcleos teñidos, se analizaron en un citómetro de flujo Partec PA-II.

$$NP = \left(\frac{\text{Pocision media del pico G1 (A)}}{\text{Posicion media del pico G1(B)}} \right) X NP (B)$$

NP=Nivel de ploidia

A =Muestra a analizar.

B =Muestra con nivel de ploidia conocido.

c) Tamaño de genoma (TG)

Se realizaron 3 corridas para cada muestra y se preparó la suspensión nuclear descrita por Doležel (2007). Se colocó 1 cm² de hoja fresca de aguaymanto androgénico con la misma cantidad de tejido fresco del estándar de referencia dentro de una placa Petri fría que contenía

1 ml de OTTO I (100 mM Ácido cítrico, 0.50% (v/v) +/Tween 20; pH 2-3) y con la ayuda de una hoja de afeitar (Gillette®) se cortó hasta obtener una muestra homogénea. La solución obtenida se filtró a través de una malla de nylon de 40 µm, se centrifugó a 1500 rpm, a la temperatura de 5°C, durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y los sedimentos se resuspendieron en 500 µl de OTTO I, seguido de la adición de 500 µl de OTTO II (400 mM Na₂PO₄.12H₂O, pH 8–9) suplementado con 50 µg/ml de Ioduro de Propidio (Sigma-Aldrich Company, EE. UU) y 50 µg/ml de RNAsa (Sigma-Aldrich Company, EE. UU). La resuspensión se incubó a 5°C durante 10 minutos y se analizó en el citómetro de flujo Attune Nxt (Thermo Fisher Scientific) donde se contabilizaron al menos 5000 núcleos en cada corrida. El contenido de ADN nuclear de las muestras se calculó de la siguiente manera:

$$TG = \left(\frac{\text{Posición media del pico G1 (A)}}{\text{Posición media del pico G1 (B)}} \right) \times TG(B) \text{ pg}$$

TG = Tamaño de genoma

A = Muestra a analizar.

B = Muestra con TG conocido.

3.3.2. Determinaciones Morfológicas

a) Dimensiones de estoma

Se colectaron las hojas del 4^{to} y 5^{to} nudo (contando desde la parte apical hacia abajo), éstas fueron enjuagadas con agua destilada para la eliminación de algún material inerte. Una porción de tejido se colocó bajo el estereoscopio Olympus SZX7 para la extracción de la epidermis abaxial con ayuda de una pinza. Una vez extraída, se colocó en el porta objeto, se adicionó una gota de agua y se cubrió con el cubre objeto (Beck et al., 2003). La muestra fue observada en el microscopio Olympus BX40F4 donde se visualizó y evaluó las variables establecidas.

b) Dimensiones de pistilo

Se extrajeron flores en antesis y se extirpó el pistilo con ayuda de una pinza. El órgano obtenido fue trasladado a una hoja de papel milimétrico para la captura fotográfica, luego la foto fue procesada con la ayuda de software Imagej (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

c) Viabilidad de polen

Para la determinación de la viabilidad del grano de polen, en un tubo eppendorf de 1.5 ml, se colectó granos de polen de una flor en antesis, con ayuda de una pinza. Luego los granos de polen se colocaron en un porta objeto y se le añadió unas gotas de acetocarmín + glicerol al 2% y se lo cubrió con un cubre objeto. Esta muestra fue visualizada a través de una cámara Dino-capture montada al microscopio Olympus BX40F4, para la toma de mediciones y la viabilidad del grano de polen, solo se consideró un polen viable, aquel grano que presentó color rosado.

d) Área de corola y cáliz

Se colectaron 5 flores a las que se le extrajeron cuidadosamente el cáliz y la corola. Este tejido se pegó sobre una hoja bond A4 con una fina capa de goma, una vez seca se lleva al scanner y se procesaron las imágenes con el software Imagej (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

3.4. ANÁLISIS EXPERIMENTAL

3.4.1. Diseño experimental

No se empleó diseño experimental, se trabajó en base a plantas individuales.

3.4.2. Procesamiento de la información

- **Análisis de correlación**

Se realizó el análisis de correlación entre las variables independientes (Carácter morfológico: Diámetro de polen, largo de gineceo, área de cáliz, área de corola, densidad de estomas, ancho de ovario, largo y ancho de estomas) y la variable dependiente (Tamaño de genoma).

- **Análisis de regresión simple**

A partir de este análisis se determinó una ecuación de regresión para la población androgénica. La ecuación se expresa de la siguiente manera:

$$Y_1 = \beta_0 + \beta_1 * X_i$$

Donde:

Y_1 : Variable dependiente (Carácter morfológico).

X_1 : Variable independiente (Tamaño de genoma).

β_0 : valor constante.

β_1 : Coeficiente de regresión.

3.4.3. Análisis de Datos

Los datos fueron analizados utilizando Modelos Lineales Generalizados Mixtos (GLMM) y la prueba de Tukey en un intervalo de confianza del 95% para comparar las dimensiones del estoma, largo de gineceo y ancho de ovario entre el nivel de ploidía. Se empleó una distribución de error gaussiana con función de enlace de identidad para cumplir con el supuesto de normalidad probado por la prueba de Shapiro-Wilk. Así mismo, se ajustó el GLMM con la familia Gamma y enlace "log". Por otro lado, se aplicó un Modelo Lineal Generalizado (GLM) y una prueba de Tukey para comparar la densidad estomática entre el nivel de ploidía y la evaluación de la viabilidad del grano de polen fue analizada mediante la prueba no paramétrica de Kruskal – Wallis y el post hoc de Dunn ($\alpha=0.05$)

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. NIVEL DE PLOIDÍA Y CONTEO CROMOSÓMICO

La medición de la intensidad de fluorescencia (IF) de los núcleos intactos a través de la citometría de flujo permitió la identificación de 3 grupos en los que 15 individuos presentaron 50 de IF (G_0/G_1), 5 con 100 de IF (G_0/G_1) y 1 con 150 de IF (G_0/G_1). Así mismo, se contabilizó los cromosomas de individuos con 50 y 100 de IF, observándose 24 y 48 cromosomas respectivamente (Figura 5 y 6) y a través de la estandarización interna (Figura 5 D y E) se estableció la cantidad de cromosomas para los siguientes individuos (Tabla 10).

Liberato *et al.* (2014) describen la existencia de genotipos 2x de Polonia y 4x de Colombia y de la India con 24 y 48 cromosomas respectivamente. Así mismo, el reporte de ploidía de los anteriores trabajos descritos, se basó en el conteo de cromosomas mediante técnicas clásicas, proceso que resulta ser engorroso y presentar dificultades que pueden desencadenar resultados erróneos por 1) la poca evaluación de células, 2) las impurezas o precipitados en la tinción pueden generar interferencia en el conteo de cromosomas, 3) el exceso de fuerza en el aplastamiento celular (squash) puede generar pérdida o ganancia cromosómica y el déficit el aglutinamiento que conlleva al conteo erróneo de los cromosomas.

Por ello, el conteo de cromosomas a través de la aplicación de enzimas degradantes de la pared celular y la tinción de cromosomas con sondas fluorescentes, disminuye los errores. De igual manera el uso de la citometría de flujo, resulta ser importante para la detección de anomalías cromosómicas o presencia de mixoploidía. Así mismo, la focalización en el estudio citológico de estándares de referencia interno (de la misma especie) para el conteo de cromosomas o nivel de ploidia (Dolezel *et al.*, 2007) rentabilizan en tiempo el análisis completo de poblaciones androgénicas y ginogénicas, generadas a través de técnicas biotecnológicas (Bohanec, 2003).

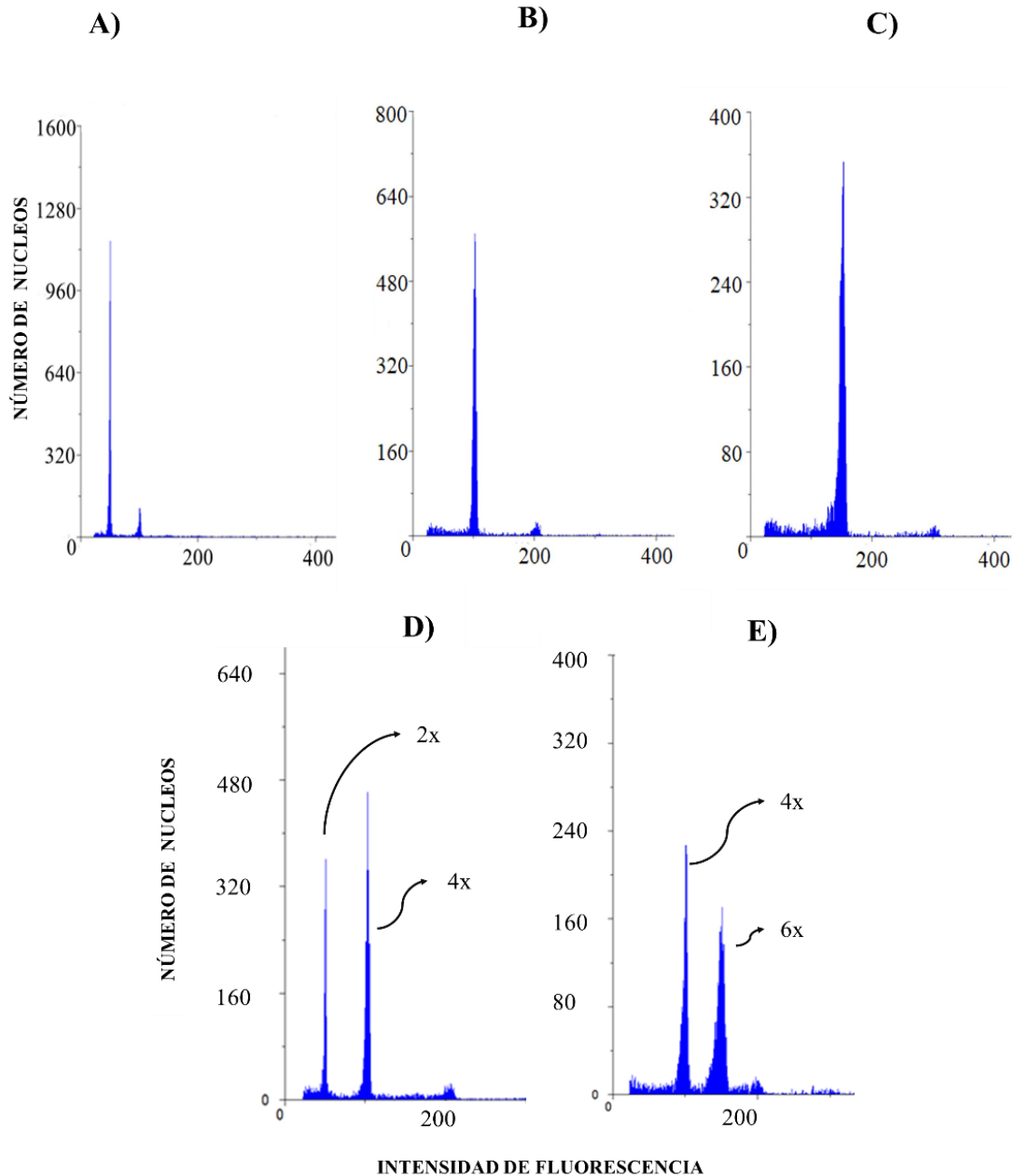


Figura 5: **A)** Aguaymanto androgénico Dihaploide ($2n=2x=24$), **B)** Aguaymanto androgénico Tetraploide ($2n=4x=48$), **C)** Aguaymanto androgénico Hexaploide ($2n=6x=72$), **D)** Estandarización interna 2x y 4x, **E)** Estandarización externa 4x y 6x

Las plantas evaluadas proceden del cultivo *in vitro* de anteras y se espera tener individuos dihaploides (2x). Sin embargo, la presencia de tetraploides (4x) se pudo originar a partir de la pared celular externa de la antera o de una célula binucleada o de la fusión de núcleos dentro de la microsporogénesis (Segui-Simarro y Nuez 2007, Germanà 2011) y el origen del 6x se pudo deber a la anomalía mitótica dentro del proceso de regeneración de la

planta mediante una embriogénesis indirecta donde se genera un individuo a partir de callos, siendo este un tejido en constante división celular (Oleszczuk et al. 2011, Segui-Simarro y Nuez 2007).

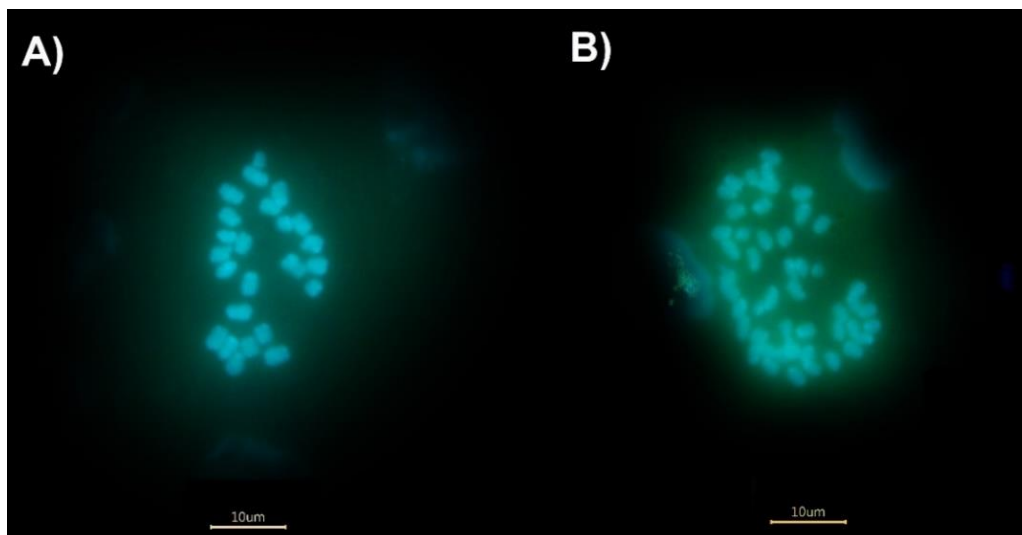


Figura 6: Conteo de cromosomas teñido con DAPI **A)** Aguaymanto Dihaploide ($2n=2x=24$) **B)** Aguaymanto Tetraploide ($2n=4x=48$)

4.2. DENSIDAD ESTOMÁTICA Y TAMAÑO DE ESTOMA

Las dimensiones del estoma del grupo 2x fueron las más pequeñas con 23.35-27.77 µm para largo y 18.37-20.80 µm para ancho (Anexo 2). La longitud del estoma de los grupos 4x y 6x presentaron un aumento en las dimensiones de 32.11 y 86.58 % respectivamente (Tabla 10). Así mismo, se evidencia diferencias significativas en el largo, ancho y densidad del estoma (Tabla 10) de los grupos identificados a través de la citometría de flujo (Figura 5) y del conteo de cromosomas (Tabla 9).

Se encontró relación positiva de las dimensiones del estoma, y una relación negativa de la densidad estomática respecto al tamaño de genoma (Figura 7); esto concuerda con los trabajos en *Anthurium andreanum* (Winarto et al., 2010), *Solanum tuberosum* & *Solanum kurtzianum* (Marfil et al., 2018) . Así mismo, Beaulieu et al. (2008) y Hodgson et al. (2010) reportan que el tamaño del estoma predice el tamaño del genoma dentro de las angiospermas con un alto grado de correlación entre esas variables.

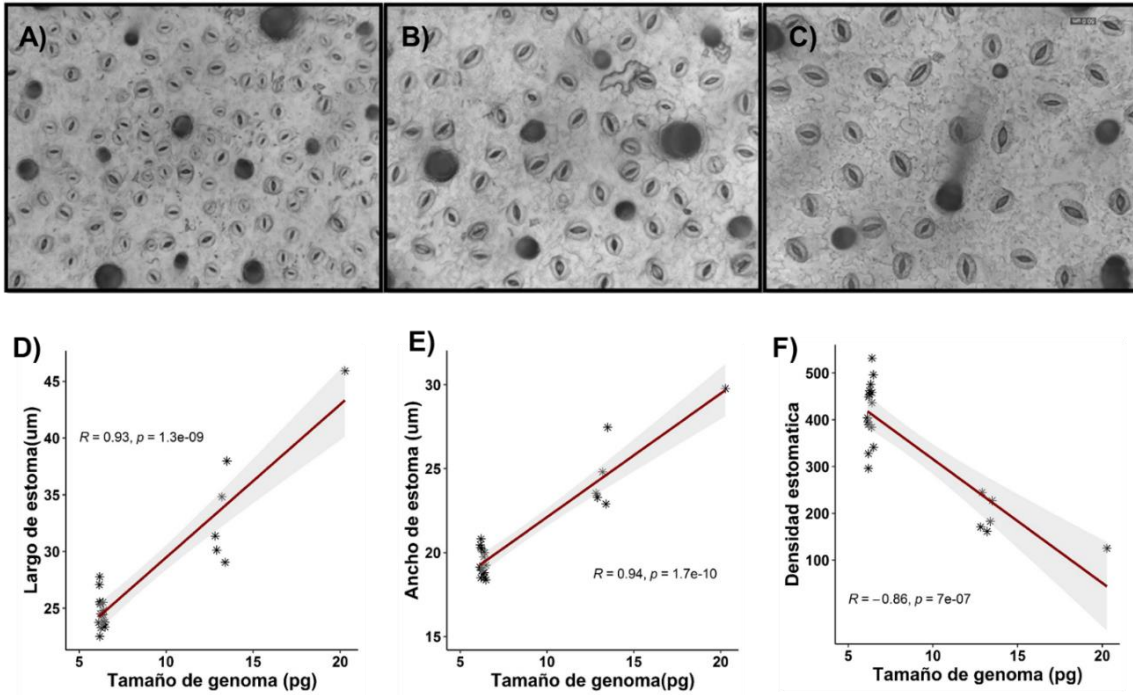


Figura 7: Distribución de estomas en el envés de hoja A) dihaploide B) tetraploide C) hexaploide D, E y F) Regresión lineal del largo, ancho y densidad de estoma respecto al tamaño de genoma

Por otro lado, Pauk *et al.* (2003) y Zheng *et al.* (2003) consideran las dimensiones del estoma como mecanismo rápido para la detección de la ploidia dentro de individuos androgénicos, debido que, los estomas de plantas haploides son generalmente más pequeños que los de plantas diploides. Además, la estructura del estoma y la densidad estomática son características efectivas para la determinación de ploidía de poliploides naturales o artificiales (Padoan *et al.*, 2013; Rao *et al.*, 2019; Tang *et al.*, 2010; Winarto *et al.*, 2010) y en plantas regeneradas a partir de órganos sexuales (J. Maluszynski *et al.*, 2003).

En la Figura 8 se observa dentro de los grupos dihaploides ($2n=2x=24$) y tetraploides ($2n=4x=48$) variabilidad en el largo y ancho del estoma. Tel-zur *et al.* (2010) menciona que la variabilidad en las dimensiones del estoma están asociadas a la variabilidad genética de las especies.

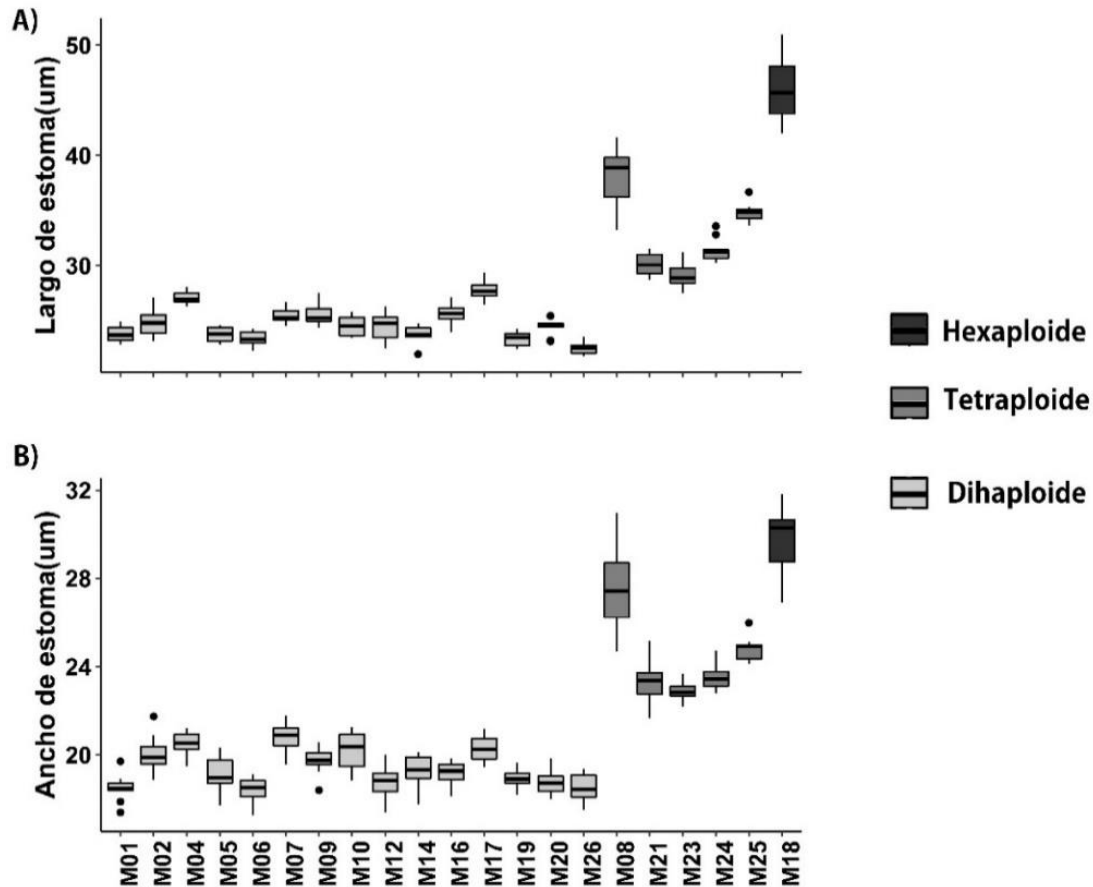


Figura 8: A) Diagrama de caja de largo de estoma; B) Diagrama de cajas ancho de estomas

La variabilidad genética presente en las especies vegetales se debe al intercambio de genes que se da a través de la polinización cruzada (Baranski *et al.*, 2016; Leimu & Fischer, 2010; Ralls *et al.*, 2013; Whitehead *et al.*, 2018) y las flores de aguaymanto son fácilmente polinizadas, por ello presenta una polinización cruzada de 53-54% (Lagos *et al.* 2006). En consecuencia, la diferencia entre los individuos de las poblaciones androgénicas encontradas se debe a la alta variabilidad genética que está presente en el ecotipo Cajamarquino de Aguaymanto ($2n=4x=48$).

Tabla 8: Valores medios y prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) del largo, ancho y densidad del estoma y los diferentes grupos de ploidia (2x, 4x, 6x)

Genotipo (Grupos)	Estoma		Densidad (# estomas/mm ² ±EE)
	Largo ($\mu\text{m} \pm\text{EE}$)	Ancho ($\mu\text{m} \pm\text{EE}$)	
Dihaploide (2n=2x=24)	24.6±0.59 ^c	19.4±0.32 ^c	420±5.12 ^a
Tetraploide (2n=4x=48)	32.5±1.36 ^b	24.3±0.71 ^b	197±8.87 ^b
Hexaploide (2n=6x=72)	45.9±4.31 ^a	29.8±1.94 ^a	125±19.83 ^c

Dentro de cada columna, las medias con letras iguales no difieren estadísticamente según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$)

4.3. TAMAÑO DE GENOMA (TG)

Se evaluaron 4 genotipos con contenido de ADN nuclear conocido como posibles estándares de referencia primario para la estimación del tamaño de genoma (TG) de 21 individuos androgénicos de aguaymanto a través de la estandarización interna y se seleccionó a *Pisum sativum* cv “Ctirad” (PS) con 9.09 pg de ADN nuclear para individuos 4x y 6x y *Secale cereale* cv “Dankovske” (SC) con 16.19 pg de ADN nuclear para individuos 2x (Tabla 10). La adición del centrifugado de la suspensión de núcleos y el descarte de sobrenadante (Doležel 2007, Doležel y Bartos 2005) ayudó a la generación de 2 picos estrechos y simétricos con CV < 5% que representan los núcleos G₁ del estándar de referencia y los núcleos G₁ del individuo androgénico de aguaymanto (Figura 9). Así mismo, la correcta distancia de los picos de fluorescencia del estándar de referencia y del individuo androgénico aseguró el análisis preciso del tamaño de genoma.

Tabla 9: Estimación del valor "C" de individuos androgénicos de aguaymanto

Genotipo	Valor "C"			CV (%)	ER ^a	NP ^b	IF ^c	NCR ^d
	2C	4C	6C					
GM01	6.40±0.04	12.79±0.08	19.19±0.12	3.8	SC	2x	50	24
GM02	6.40±0.01	12.80±0.03	19.20±0.05	4.7	SC	2x	50	24
GM04	6.16±0.20	12.33±0.39	18.49±0.59	4.1	SC	2x	50	24
GM05	6.13±0.04	12.26±0.09	18.40±0.14	4.9	SC	2x	50	24
GM06	6.49±0.05	12.98±0.10	19.47±0.15	4.5	SC	2x	50	24
GM07	6.20±0.07	12.40±0.14	18.61±0.21	3.4	SC	2x	50	24
GM09	6.37±0.07	12.73±0.15	19.10±0.23	4.5	SC	2x	50	24
GM10	6.24±0.04	12.47±0.08	18.71±0.12	4.1	SC	2x	50	24
GM12	6.39±0.04	12.78±0.09	19.17±0.14	4.0	SC	2x	50	24
GM14	6.48±0.07	12.96±0.13	19.44±0.20	4.8	SC	2x	50	24
GM16	6.18±0.13	12.37±0.27	18.55±0.40	4.0	SC	2x	50	24
GM17	6.18±0.06	12.36±0.12	18.54±0.18	4.0	SC	2x	50	24
GM19	6.25±0.07	12.50±0.14	18.74±0.21	3.0	SC	2x	50	24
GM20	6.32±0.03	12.64±0.07	18.96±0.11	3.4	SC	2x	50	24
GM26	6.19±0.03	12.38±0.06	18.57±0.09	3.4	SC	2x	50	24
GM08	6.75±0.08	13.49±0.16	20.24±0.24	4.3	PS	4x	100	48
GM21	6.45±0.14	12.90±0.29	19.35±0.44	4.0	PS	4x	100	48
GM23	6.70±0.08	13.39±0.16	20.09±0.24	4.3	PS	4x	100	48
GM24	6.41±0.05	12.82±0.11	19.23±0.16	2.6	PS	4x	100	48
GM25	6.60±0.04	13.20±0.09	19.80±0.14	3.7	PS	4x	100	48
GM18	6.76±0.03	13.51±0.06	20.27±0.10	2.7	PS	6x	150	72

^a Estándar de referencia primario; ^b Nivel de ploidía; ^c Intensidad de fluorescencia ; ^d Número de cromosomas

Liberato (2014) reporta 2.33 y 7.65 pg para individuos 2x y 4x de aguaymanto; sin embargo, en el presente trabajo se obtuvo 6.29 y 13.16 pg en promedio para 2x y 4x, siendo estos superiores en más de 2.69 y 1.72 veces. Esta diferencia notoria se pudo deber a los procedimientos descritos por Liberato (2014) donde estima el tamaño de genoma mediante el uso de glóbulos rojos de trucha a través de una estandarización externa, siendo métodos no recomendables por el taller de citometría de flujo de 1997 (Bennett y Leitch 2000) y Doležel & Bartos (2005).

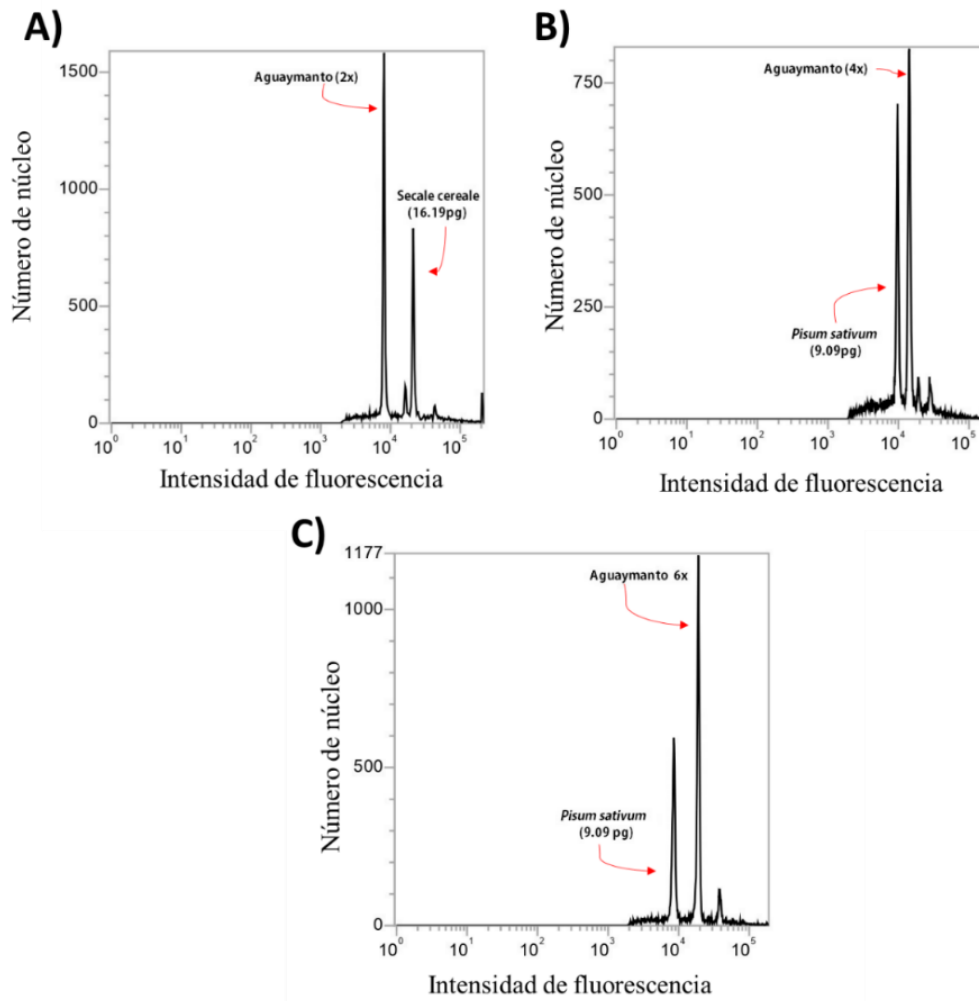


Figura 9. Estimación de la cantidad absoluta de ADN nuclear (tamaño del genoma) en individuos androgénicos de aguaymanto. **A)** Comparación de pico G1 de *Secale cereale* “Dankovske” y genotipo dihaploides ($2n=2x=24$) de aguaymanto **B)** Comparación de pico G1 de *Pisum sativum* “Ctirad” y genotipo Tetraploide ($2n=4x=48$) de aguaymanto **C)** Comparación de pico G1 de *Pisum sativum* “Ctirad” y genotipo Hexaploide ($2n=6x=72$) de aguaymanto

Se tiene registrado el tamaño de genoma de *Physalis alkekengi* con 5.10 pg (Pustahija et al., 2013) y *Physalis heterophylla* con 8.01pg (Bai et al., 2012) ambas especies $2n=2x=24$ según Menzel (1951) y los genotipos $2x$ evaluados en el presente estudio registraron entre 6.16 y 6.49 pg de ADN, lo cual confirma la estimación correcta del tamaño de genoma para individuos $2x$ y por ende para los demás niveles de ploidia.

4.4. DIÁMETRO DE POLEN

El diámetro de polen (DP) del grupo 6x fue superior y significativo al grupo de 2x y 4x (Tabla 11). El diámetro del grano de polen del grupo 6x fue superior en 8.08% respecto al grupo 4x y 6.22% respecto al grupo de 2x. Dicho aumento también fue observado en *Eriotheca* (Marinho et al., 2014) y *Streptocarpus* (Möller, 2018). De igual manera, Bennett (1972) y Crespel et al. (2006) afirman que el tamaño del grano de polen se ve influenciado por el nivel de ploidía y esto se ve demostrado en otras especies como: *Avena* (Katsiotis & Forsberg, 1995), *Citrus* (Garavello et al., 2019), *Solanum* (Ojiewo et al., 2006), *Vicia villosa* (Tulay & Unal, 2010), *Hylocereus* (Cohen et al., 2013; Cohen & Tel-Zur, 2012), *Tanacetum parthenium* (Majdi et al., 2010), *Rosa* (Crespel et al., 2006; Zlesak et al., 2005), *Arabidopsis* (Tsukaya, 2013). Por otro lado, la comparación del DP del grupo 4x y 2x no muestra diferencia estadística entre ellos (Tabla 10), probablemente debido a la formación del gameto no reducido (Alexander, 2020; Tränkner et al., 2019) que ocurre en la incorrecta división citoplasmática durante la metafase II de la meiosis (Gao et al., 2019).

Tabla 10: Diámetro del grano de polen de los grupos androgénicas reconocidos a través de citometría de flujo y conteo de cromosomas

Grupos	Diámetro de polen Promedio (μm) \pm EE
Dihaploide ($2n=2x=24$)	32.324 \pm 0.356 ^b
Tetraploide ($2n=4x=48$)	31.767 \pm 0.472 ^b
Hexaploide ($2n=6x=72$)	34.335 \pm 0.301 ^a

Dentro de cada columna, las medias con letras iguales no difieren estadísticamente según la prueba de Kruskal-Wallis y el post hoc de Dunn ($\alpha=0.05$)

4.5. VIABILIDAD DE GRANO DE POLEN

Maluszynski *et al.*,(2003), Seguí-Simarro & Nuez, (2008), Waara (1996) y Wang et al. (2014) reportan que los individuos androgénicos con carga cromosómica reducida, presentan esterilidad masculina, concordando con lo encontrado en el presente estudio donde el 93.33% de individuos 2x presento una baja viabilidad de polen (Figura 10A y Anexo 1). Esta disminución en la viabilidad de polen se pudo deber a: a) la carencia de

juegos cromosómicos completos que generan una microsporogénesis anómala en la interferencia del emparejamiento de cromosomas homólogos durante la profase I, b) distribución anormal de la anafase I, c) pobre homología cromosómica y d) cromosomas rezagados constituyen micronúcleos durante la etapas esporádicas (Cai et al., 2012; Gao et al., 2019; Gaut et al., 2007; Lyrene et al., 2003; Singhal et al., 2012).

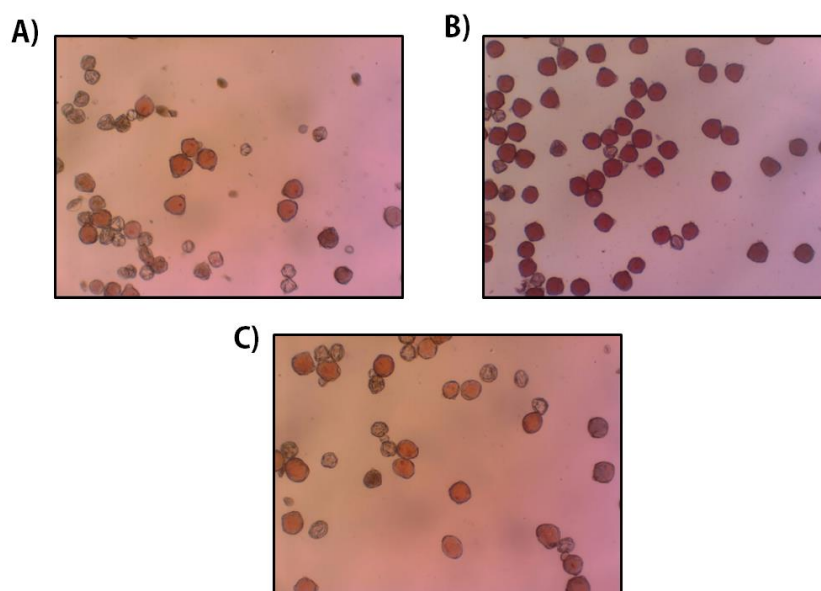


Figura 10: Viabilidad de polen de plantas androgénicas de aguaymanto **A)** Genotipo M17 ($2n=2x=24$), **B)** Genotipo M21 ($2n=4x=48$), **C)** Genotipo M18 ($2n=6x=72$)

4.6. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICOS A NIVEL FLORAL

Los valores de R^2 de las características morfológicas florales respecto al tamaño de genoma (Figura 11 C, D, F y G) demuestran que el largo del gineceo (0.6724) y el área de la corola (0.5476) presentan fuerte correlación. Sin embargo, el ancho de ovario (0.3249) y el área del sépalo (0.2116) una moderada relación. Por otro lado, la alteración en el nivel de ploidia de las plantas se traduce en el aumento o disminución del tamaño de las células u órganos (Sattler et al., 2016; Wu et al., 2012) y bajo esa conceptualización se esperaba incremento o la disminución significativa del tamaño en los diferentes niveles de ploidia; sin embargo, en el grupo de $6x$ incrementó el tamaño del pistilo pero no fue significativo y el ancho de ovario, área de cáliz y corola se produjo la reducción significativa respecto al grupo tetraploide (Tabla 11). Esta incongruencia se debe a que los organismos de mayor nivel de ploidía presentan el síndrome de “alta ploidía” donde

la división celular es lenta y a su vez requiere mayores recursos. Por ello, algunos organismos con ploidía inferiores muestran características superiores a organismos de mayor ploidía (Yildiz, 2013)

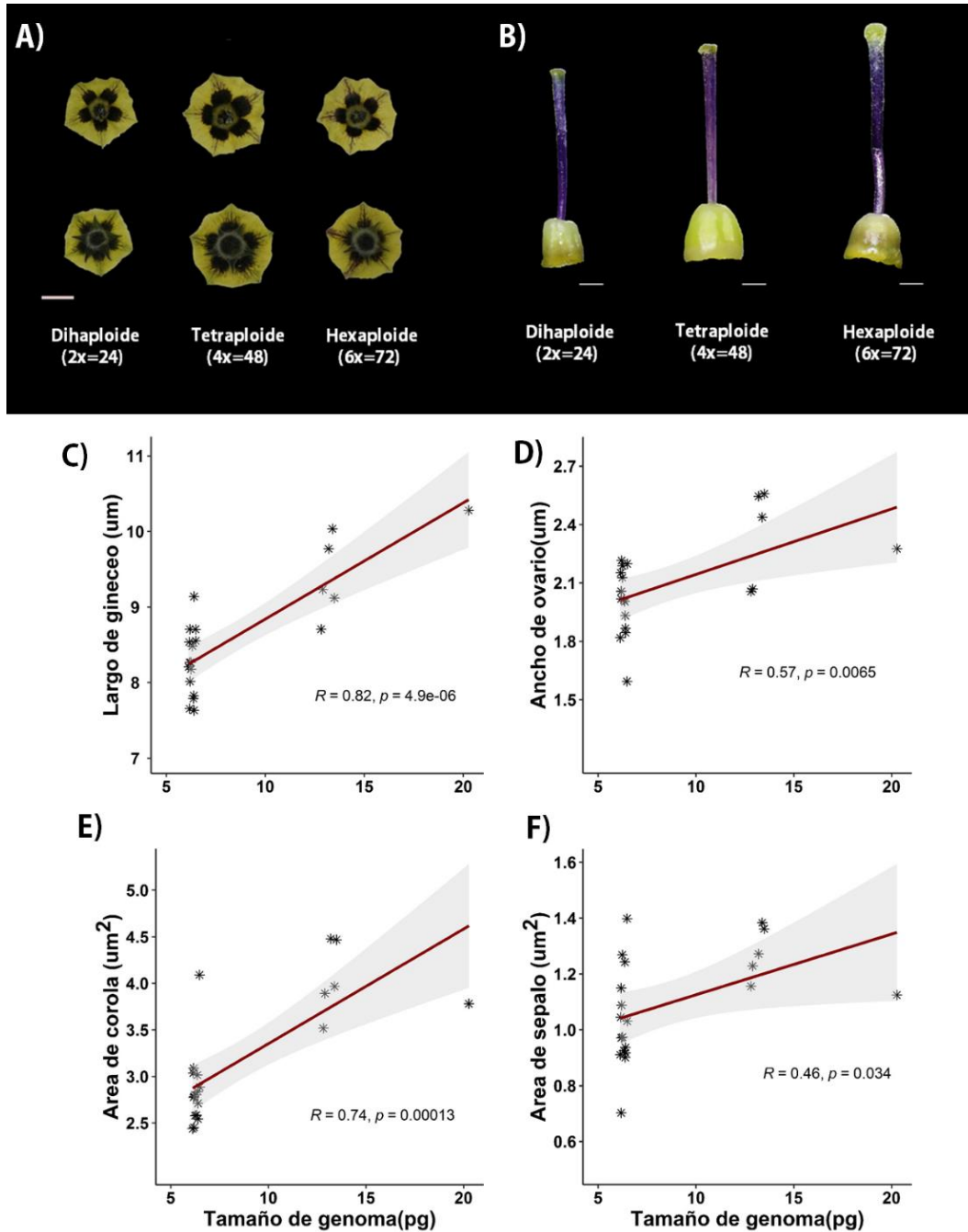


Figura 11:A) Vista frontal y posterior de flores. Bar=1cm, **B)** Tamaño de pistilo a diferentes niveles de ploidia. Bar=1mm; Regresión lineal de los órganos de flores

respecto al tamaño de genoma **C)** Largo de gineceo) Ancho de ovario, **E)** Área de corola, **F)** Área de sépalo

Asímismo, las características evaluadas para el grupo 2x demostró disminución significativa respecto a los 4x y 6x (Figura 11 A y B). Datos semejantes fueron reportados en *Vicia villosa* (Tulay & Unal, 2010) y *Tanacetum parthenium* (Majdi et al., 2010) donde el área floral de un 2x fue inferior a sus 4x.

Tabla 11 : Valores medios y prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) de las Medición de pistilo, ancho de ovario, área de cáliz y corola de diferentes grupos de ploidia (2x, 4x, 6x)

Ploidía	Pistilo (mm \pm EE)		Área de flor (mm ² \pm EE)	
	Largo de pistilo	Ancho de ovario	Cáliz	Corola
Dihaploide (2n=2x=24)	8.25 \pm 0.146 ^a	2.00 \pm 0.062 ^a	1.01 \pm 0.051 ^b	2.81 \pm 0.013 ^b
Tetraploide (2n=4x=48)	9.30 \pm 0.260 ^b	2.31 \pm 0.114 ^b	1.27 \pm 0.101 ^a	4.08 \pm 0.027 ^a
Hexaploide (2n=6x=72)	10.28 \pm 0.705 ^b	2.28 \pm 0.274 ^{ab}	1.12 \pm 0.219 ^{ab}	3.79 \pm 0.583 ^{ba}

Dentro de cada columna, las medias con letras iguales no difieren estadísticamente según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$)

4.7. DEFORMACIÓN DEL ÓRGANO FLORAL

Las estructuras florales son las más complejas de las plantas y su arquitectura tiene una conservación estable respecto a otros órganos (Alvarez-Buylla et al., 2010). La Figura 12 muestra las anomalías dentro del desarrollo floral y este desorden solo se presentó en un solo individuo dihaploide (Genotipo M19). Dentro de las anomalías florales se visualizó la transformación de anteras a pétalos (Figura 12B), corola a cáliz (Figura 12C) y una mayor cantidad de anteras (Anexo 2). La presencia de estas anomalías se produjo en la temporada de invierno – otoño; sin embargo, los demás individuos dihaploides no presentaron alteraciones y conservaron la misma cantidad de anteras, pétalos, sépalos respecto a los tetraploides y hexaploides. La presencia de estas anomalías pueden estar acondicionadas por el medio ambiente (How Kit et al., 2010), la regulación

hormonal y cambios en la expresión de genes. Stitz et al. (2014) reportaron que la presencia y derivados del ácido jasmónico juegan un papel importante en el desarrollo y la maduración floral. Así mismo, Lozano *et al.* 1998, refieren que las bajas temperaturas afectan el correcto desarrollo del botón floral en tomate, causando transformaciones y alteraciones homeóticas (cambios en la identidad de los estambres y carpelos). Estas anomalías se deben a cambios en la expresión de genes MADS-box y estos están involucrados en el desarrollo floral (Trevaskis et al., 2003).

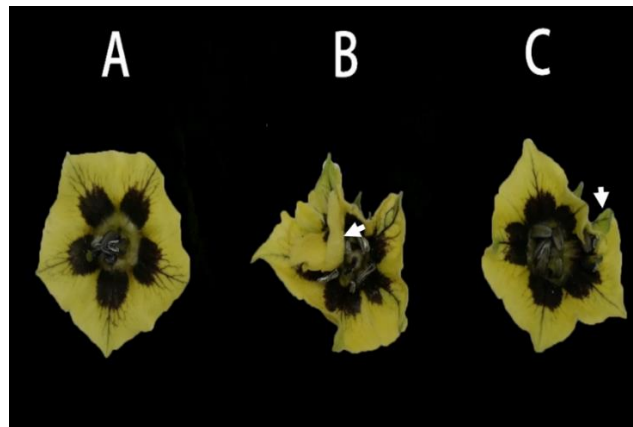


Figura 12: A) Flor normal dihaploide ($2n=2x=24$); B y C) Presencia de anomalías homeóticas de la planta dihaploide ($2n=2x=24$)

Los resultados en las anomalías florales de aguaymanto concuerdan con las anomalías reportadas por Lozano *et al* (1998). En consecuencia, esta anomalía en Genotipo M19 se podría deber a cambios en la expresión de genes MADS-box a causa de las bajas temperaturas de otoño-invierno.

V. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

1. La técnica del conteo de cromosomas permitió determinar el nivel de ploidía de los genotipos estudiados.
2. Las dimensiones y densidad del estoma se encuentran relacionadas positivamente con el tamaño de genoma y nivel de ploidia.
3. La viabilidad del grano de polen se ve influenciado por el nivel de ploidia mientras que el diámetro del grano de polen del grupo 2x y 4x no mostró variación alguna, sin embargo, fueron significativamente inferiores a 6x.
4. Las alteraciones morfológicas de los órganos florales no se ven influenciadas por los niveles de ploidia sino por condiciones externas.
5. Los valores de tamaño de genoma para individuos androgénicos 2x, 4x y 6x fueron 6.29, 13.16, y 20.27 respectivamente.
6. La reducción del nivel de ploidia influye en la longitud del pistilo, ancho de ovario, largo de estoma, ancho de estoma, área de cáliz y área de corola.

VI. RECOMENDACIONES

- Incluir estudios sobre el desarrollo de la microspora dentro de la androgénesis de los grupos dihaploides y hexaploides.
- Estudiar los genes MADS-box en las accesiones que presenta anomalías florales.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 163–176. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>
- Alexander, L. (2020). Ploidy Level Influences Pollen Tube Growth and Seed Viability in Interploidy Crosses of *Hydrangea macrophylla*. *Frontiers in Plant Science*, 11(February), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00100>
- Aleza, P., Juárez, J., Ollitrault, P., Navarro, L. (2009). Production of tetraploid plants of non apomictic citrus genotypes. *Plant Cell Reports*, 28(12), 1837–1846. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0783-2>
- Alvarez-Buylla, E. R., Benítez, M., Corvera-Poiré, A., Chaos Cador, Á., de Folter, S., Gamboa de Buen, A., Garay-Arroyo, A., García-Ponce, B., Jaimes-Miranda, F., Pérez-Ruiz, R. V., Piñeyro-Nelson, A., Sánchez-Corrales, Y. E. (2010). Flower Development. *The Arabidopsis Book*, 8(1), e0127. <https://doi.org/10.1199/tab.0127>
- Anchalee, J. (2014). Colchicine and duration time on survival rate and micropropagation of *Dionaea muscipula* Ellis. *African Journal of Plant Science*, 8(6), 291–297. <https://doi.org/10.5897/AJPS2014.1177>
- Bai, C., Alverson, W. S., Follansbee, A., Waller, D. M. (2012). New reports of nuclear DNA content for 407 vascular plant taxa from the United States. *Annals of Botany*, 110(8), 1623–1629. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs222>
- Baranski, R., Goldman, I., Nothnagel, T., & Scott, J. W. (2016). Improving Color Sources by Plant Breeding and Cultivation. In *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages* (pp. 429–472). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100371-8.00019-1>

- Bartish, I. V., Korkhovoy, V. I., Fomina, Y. L., Lim, Y. K. (1998). A new approach to obtain polyploid forms of apple. In *Acta Horticulturae* (Vol. 484, pp. 561–564). <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1998.484.95>
- Beck, S. L., Dunlop, R. W., Fossey, A. (2003). Stomatal length and frequency as a measure of ploidy level in black wattle, *Acacia mearnsii* (de Wild). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 141(2), 177–181. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8339.2003.00132.x>
- Bennett, M. D., Leitch, I. J., Price, H. J., Johnston, J. S. (2003). Comparisons with *Caenorhabditis* (~100 Mb) and *Drosophila* (~175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be ~157 Mb and thus ~25% larger than the *Arabidopsis* genome initiative estimate of ~125 Mb. *Annals of Botany*, 91(5), 547–557. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg057>
- Bohanec, B. (2003). Ploidy determination using flow cytometry. In *Doubled Haploid Production in Crop Plants* (pp. 397–403). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1293-4_52
- Cai, D., Rodríguez, F., Teng, Y., Ané, C., Bonierbale, M., Muller, L. A., Spooner, D. M. (2012). Single copy nuclear gene analysis of polyploidy in wild potatoes (*Solanum* section *Petota*). *BMC Evolutionary Biology*, 12, 70. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-70>
- Castro, M., Castro, S., & Loureiro, J. (2012). Genome size variation and incidence of polyploidy in *Scrophulariaceae sensu lato* from the Iberian Peninsula. *AoB Plants*, 2012(0), pls037–pls037. <https://doi.org/10.1093/aobpla/pls037>
- Cimò, G., Marchese, A., Germanà, M. A. (2017). Microspore embryogenesis induced through in vitro anther culture of almond (*Prunus dulcis* Mill.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 128(1), 85–95. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1086-2>
- Cires R, E., Cuesta M, C. (2011). Una herramienta eficaz en el estudio de la Botánica: la citometría de flujo. *Cuadernos de Biodiversidad*, 37, 19–25. <https://doi.org/10.14198/cdbio.2011.37.03>

- Cohen, H., Fait, A., Tel-Zur, N. (2013). Morphological, cytological and metabolic consequences of autopolyploidization in *Hylocereus* (Cactaceae) species. *BMC Plant Biology*, 13(1), 173. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-173>
- Cohen, H., & Tel-Zur, N. (2012). Morphological changes and self-incompatibility breakdown associated with autopolyploidization in *Hylocereus* species (Cactaceae). *Euphytica*, 184(3), 345–354. <https://doi.org/10.1007/s10681-011-0536-5>
- Comai, L. (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics*, 6(11), 836–846. <https://doi.org/10.1038/nrg1711>
- Cook, RL. 1997. Tendencias Internacionales en el Sector de Frutas y Hortalizas Frescas. *Economía Agraria* 181: 189-190.
- Crespel, L., Ricci, S. C., & Gudin, S. (2006). The production of 2n pollen in rose. *Euphytica*, 151(2), 155–164. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-9136-1>
- Doležel, J. (1998). Plant Genome Size Estimation by Flow Cytometry: Inter-laboratory Comparison. *Annals of Botany*, 82(SUPPL. A), 17–26. <https://doi.org/10.1006/anbo.1998.0730>
- Doležel, J., & Bartoš, J. (2005). Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, 95(1), 99–110. <https://doi.org/10.1093/aob/mci005>
- Doležel, J., Greilhuber, J., & Suda, J. (2007). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols*, 2(9), 2233–2244. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.310>
- Doležel, J., Sgorbati, S., & Lucretti, S. (1992). Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum*, 85(4), 625–631. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb04764.x>
- Eeckhaut, T. G. R., Werbrouck, S. P. O., Leus, L. W. H., Van Bockstaele, E. J., & Debergh, P. C. (2004). Chemically induced polyploidization in *Spathiphyllum wallisii* Regel through somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78(3), 241–246. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000025659.19232.04>

- Espinoza, G. (2011). Aguaymanto para la exportación de la región de Cajamarca (Perú). el caso de la asociación provincial de productores Ecológicos de Cajamarca-APPEC. Tesis Esp. Buenos Aires, Argentina, UBA. 39 p.
- Flórez, V., Fisher, G., Sora, A. (2000). Producción, Poscosecha y Exportación de la Uchuva (*Physalis peruviana* L.).
- Frossasco, A., Trenchi, A., & Urdampilleta, J. D. (2015). Estimación del tamaño del genoma en especies de la tribu Cestreae (Solanaceae) mediante citometría de imagen. *Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica*, 50(3), 353–360.
- Galitski, T., Saldanha, A. J., Styles, C. A., Lander, E. S., & Fink, G. R. (1999). Ploidy regulation of gene expression. *Science*, 285(5425), 251–254. <https://doi.org/10.1126/science.285.5425.251>
- Ganga, M., & Chezhiyan, N. (2002). Influence of the antimitotic agents colchicine and oryzalin on in vitro regeneration and chromosome doubling of diploid bananas (*Musa* spp.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 77(5), 572–575. <https://doi.org/10.1080/14620316.2002.11511540>
- Gao, S., Yang, M., Zhang, F., Fan, L., & Zhou, Y. (2019). The strong competitive role of 2n pollen in several polyploidy hybridizations in *Rosa hybrida*. *BMC Plant Biology*, 19(1), 127. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1696-z>
- Garavello, M., Cuenca, J., Dreissig, S., Fuchs, J., Houben, A., & Aleza, P. (2019). Assessing Ploidy Level Analysis and Single Pollen Genotyping of Diploid and Euploid Citrus Genotypes by Fluorescence-Activated Cell Sorting and Whole-Genome Amplification. *Frontiers in Plant Science*, 10(September), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01174>
- Gaut, B. S., Wright, S. I., Rizzon, C., Dvorak, J., & Anderson, L. K. (2007). Recombination: an underappreciated factor in the evolution of plant genomes. *Nature Reviews Genetics*, 8(1), 77–84. <https://doi.org/10.1038/nrg1970>
- Geok-Yong, T., & Dunn, G. M. (1973). Relationship of Stomatal Length and Frequency and Pollen-Grain Diameter to Ploidy Level in *Bromus inermis* Leyss. *Crop Science*, 13, 332–334.

- Germanà, M. (2011). Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 104(3), 283–300. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9852-z>
- Germanà, M. A., Chiancone, B., Lain, O., & Testolin, R. (2005). Anther culture in *Citrus clementina*: a way to regenerate tri-haploids. *Australian Journal of Agricultural Research*, 56(8), 839. <https://doi.org/10.1071/AR05025>
- Greplová, M., Polzerová, H., & Domkářová, J. (2009). Intra- and inter-specific crosses of *Solanum* materials after mitotic polyploidization in vitro. *Plant Breeding*, 128(6), 651–657. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2009.01632.x>
- He, P., Li, L., Cheng, L., Wang, H., & Chang, Y. (2018). Variation in Ploidy Level and Morphological Traits in the Progeny of the Triploid Apple Variety Jonagold. 2018(1), 1–8.
- How-Kit, A., Boureau, L., Stammitti-bert, L., Rolin, D., Teyssier, E., & Gallusci, P. (2010). Functional analysis of SIEZ1 a tomato Enhancer of zeste (E (z)) gene demonstrates a role in flower development. 201–213. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9657-9>
- Johnston, J. S., Bennett, M. D., Rayburn, A. L., Galbraith, D. W., & Price, H. J. (1999). Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *American Journal of Botany*, 86(5), 609–613. <https://doi.org/10.2307/2656569>
- Katsiotis, A., & Forsberg, R. A. (1995). Pollen grain size in four ploidy levels of genus *Avena*. *Euphytica*, 83(2), 103–108. <https://doi.org/10.1007/BF01678036>
- Kron, P., Suda, J., & Husband, B. C. (2007). Applications of Flow Cytometry to Evolutionary and Population Biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38(1), 847–876. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095504>
- Lantos, C., & Pauk, J. (2016). Anther Culture as an Effective Tool in Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.) Breeding. *Генетика*, 52(8), 910–918. <https://doi.org/10.7868/S0016675816080075>

- Lavania, U. C. (2005). Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phyto-pharmaceuticals. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 3(02), 170–177. <https://doi.org/10.1079/PGR200576>
- Leimu, R., & Fischer, M. (2010). Between-Population Outbreeding Affects Plant Defence. *PLoS ONE*, 5(9), e12614. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012614>
- Levin, D. (2004). The Role of Chromosomal Change in Plant Evolution by Donald A. Levin . *Systematic Botany*, 29(2), 460–461. <https://doi.org/10.1600/036364404774195656>
- Loureiro, J., Rodriguez, E., Doležel, J., & Santos, C. (2006). Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. *Annals of Botany*, 98(3), 679–689. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl141>
- Lyrene, P. M., Vorsa, N., & Ballington, J. R. (2003). Polyploidy and sexual polyploidization in the genus *Vaccinium*. *Euphytica*, 133(1), 27–36. <https://doi.org/10.1023/A:1025608408727>
- Lysák, M. A., Rostková, A., Dixon, J. M., Rossi, G., & Doležel, J. (2000). Limited genome size variation in *Sesleria albicans*. *Annals of Botany*, 86(2), 399–403. <https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1200>
- Mable, B. K. (2003). Breaking down taxonomic barriers in polyploidy research. *Trends in Plant Science*, 8(12), 582–590. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2003.10.006>
- Majdi, M., Karimzadeh, G., Malboobi, M. A., Omidbaigi, R., & Mirzaghaderi, G. (2010). Induction of Tetraploidy to Feverfew (*Tanacetum parthenium* Schulz-Bip.): Morphological, Physiological, Cytological, and Phytochemical Changes. *HortScience*, 45(1), 16–21. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.45.1.16>
- Maluszynski, J., Kasha, K. ., Foster, B. ., & Szarejko, I. (2003). Doubled Haploid Production in Crop Plants. In M. Maluszynski, K. J. Kasha, B. P. Forster, & I. Szarejko (Eds.), *Doubled Haploid Production in Crop Plants* (1st ed.). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-1293-4>
- Marfil, C. F., Duarte, P. F., & Masuelli, R. W. (2018). Phenotypic and epigenetic variation induced in newly synthesized allopolyploids and autopolyploids of potato. *Scientia*

Horticulturae, 234(November 2017), 101–109.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.022>

Marhold, K., Kudoh, H., Pak, J. H., Watanabe, K., Španiel, S., & Lihová, J. (2010). Cytotype diversity and genome size variation in eastern Asian polyploid Cardamine (Brassicaceae) species. *Annals of Botany*, 105(2), 249–264.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcp282>

Marinho, R. C., Mendes-Rodrigues, C., Bonetti, A. M., & Oliveira, P. E. (2014). Pollen and stomata morphometrics and polyploidy in *Eriotheca* (Malvaceae-Bombacoideae). *Plant Biology*, 16(2), 508–511. <https://doi.org/10.1111/plb.12135>

Matsuoka, Y. (2011). Evolution of polyploid triticum wheats under cultivation: The role of domestication, natural hybridization and allopolyploid speciation in their diversification. *Plant and Cell Physiology*, 52(5), 750–764.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcr018>

Mayakaduwa, D. M. R. G., & Silva, T. D. (2021). In vitro response of Indica rice microspores subjected to cold stress: a cytological and histological perspective. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. <https://doi.org/10.1007/s11627-021-10177-1>

MEF.2016. Pautas Metodológica para la Elaboración de Planes de Negocio de Aguaymanto en el Marco de la Ley Procompite. Lima-Perú: Procompite.

Messmer, M., Schaefer, F., P. Willbois, K., & Arncken, C. (2015). Plant Breeding Techniques: An assessment for organic farming. Dossier, January, 37.
<https://shop.fibl.org/fileadmin/documents/shop/1202-plant-breeding.pdf>

Minagri.2016.Notas informáticas: Noviembre 2016 .Revizado.5/21/2018.
Disponibile:<http://www.minagri.gob.pe/portal/download/pdf/re>

Möller, M. (2018). Nuclear DNA C-values are correlated with pollen size at tetraploid but not diploid level and linked to phylogenetic descent in *Streptocarpus* (Gesneriaceae). *South African Journal of Botany*, 114(x), 323–344.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.11.017>

- Monakhos, S. G., Nguen, M. L., Bezbozhnaya, A. V., & Monakhos, G. F. (2014). A relationship between ploidy level and the number of chloroplasts in stomatal guard cells in diploid and amphidiploid brassica species. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*, 5, 44–54. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2014.5.44eng>
- Morton, J. F. (1987). *Fruits of Warm Climates*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b22001-27>
- Moscone, E. A., Baranyi, M., Ebert, I., Greilhuber, J., Ehrendorfer, F., & Hunziker, A. T. (2003). Analysis of nuclear DNA content in Capsicum (Solanaceae) by flow cytometry and feulgen densitometry. *Annals of Botany*, 92(1), 21–29. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg105>
- Münzbergová, Z. (2006). Ploidy level interacts with population size and habitat conditions to determine the degree of herbivory damage in plant populations. *Oikos*, 115(3), 443–452. <https://doi.org/10.1111/j.2006.0030-1299.15286.x>
- Naik, N., Rout, P., Umakanta, N., Verma, R. L., Katara, J. L., Sahoo, K. K., Singh, O. N., & Samantaray, S. (2016). Development of doubled haploids from an elite indica rice hybrid (BS6444G) using anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 128(3), 679–689. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1149-4>
- National Research Council. (1989). *Lost Crops of the Incas: Little-Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation Report*.
- Nishiyama, I., Miyazaki, T., & Sakamoto, S. (1975). Evolutionary autoploidy in the sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and its progenitors. *Euphytica*, 24(1), 197–208. <https://doi.org/10.1007/BF00147186>
- Ojiewo, C. O., Agong, S. G., Murakami, K., & Masuda, M. (2006). Chromosome duplication and ploidy level determination in African nightshade *Solanum villosum* Miller. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 81(2), 183–188. <https://doi.org/10.1080/14620316.2006.11512048>
- Oleszczuk, S., Rabiza-Swider, J., Zimny, J., & Lukaszewski, A. J. (2011). Aneuploidy among androgenic progeny of hexaploid triticale (XTriticosecale Wittmack). *Plant Cell Reports*, 30(4), 575–586. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0971-0>

- Omran, S. A., Guerra-Sanz, J. M., & Cardenas, J. A. G. (2008). Methodology of tetraploid induction and expression of microsatellite alleles in triploid watermelon 1. 381–384.
- Ortuño-Olea, L., Manzo-González, A., & Peña-Lomelí, A. (1998). Cultivo de Anteras en Tomate de Cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 4(1), 39–43.
- Otto, S. P., & Whitton, J. (2000). Polyploid Incidence and Evolution. *Annual Review of Genetics*, 34(1), 401–437. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.34.1.401>
- Padoan, D., Mossad, A., Chiancone, B., Germana, M. A., & Khan, P. S. S. V. (2013). Ploidy levels in Citrus clementine affects leaf morphology, stomatal density and water content. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 25(4), 283–290. <https://doi.org/10.1590/S2197-00252013000400006>
- Pellicer, J., & Leitch, I. J. (2020). The Plant DNA C-values database (release 7.1): an updated online repository of plant genome size data for comparative studies. *New Phytologist*, 226(2), 301–305. <https://doi.org/10.1111/nph.16261>
- Peloquin, S. ., Boiteux, L. ., & Carputo, D. (1999). Meiotic Mutants in Potato: Valuable Variants. *Genetics Society of America*, 153, 1493–1499. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1460881>
- Pereira, R. C., Ferreira, M. T. M., Davide, L. C., Pasqual, M., Mittelman, A., & Techio, V. H. (2014). Chromosome duplication in *Lolium multiflorum* Lam. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 14(4), 251–255. <https://doi.org/10.1590/1984-70332014v14n4n39>
- Pinheiro, A. A., Pozzobon, M. T., Do Valle, C. B., Penteado, M. I. O., & Carneiro, V. T. C. (2000). Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicine. *Plant Cell Reports*, 19(3), 274–278. <https://doi.org/10.1007/s002990050011>
- Poggio, L., Gonzales, G., Ferrari, M. R., Garcia, A. M., Wulff, A., Greizerstein, E., Tomás, P., & Schrauf, G. (2004). Aportes de la Citogenética al Estudio de Genomas Vegetales (Parte V). In G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp, & L. Mroginski (Eds.), *Biología y Mejoramiento Vegetal II* (pp. 379–387). *Biología y*

Mejoramiento Vegetal II. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología.

Przywara, L., Pandey, K. K., & Sanders, P. M. (1988). Length of stomata as an indicator of ploidy level in *actinidia deliciosa*. *New Zealand Journal of Botany*, 26(2), 179–182. <https://doi.org/10.1080/0028825X.1988.10410110>

Pustahija, F., Brown, S. C., Bogunić, F., Bašić, N., Muratović, E., Ollier, S., Hidalgo, O., Bourge, M., Stevanović, V., & Siljak-Yakovlev, S. (2013). Small genomes dominate in plants growing on serpentine soils in West Balkans, an exhaustive study of 8 habitats covering 308 taxa. *Plant and Soil*, 373(1–2), 427–453. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1794-x>

Ralls, K., Frankham, R., & Ballou, J. D. (2013). Inbreeding and Outbreeding. In *Encyclopedia of Biodiversity* (Vol.4,pp.245–252).Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00073-3>

Ramadan, M., El-Ghorab, A., & Ghanem, K. (2015). Volatile compounds, antioxidants, and anticancer activities of Cape gooseberry fruit (*Physalis peruviana* L.): An in-vitro study. *Journal of The Arab Society for Medical Research*, 10(2), 56. <https://doi.org/10.4103/1687-4293.175556>

Ramanna, M. S., & Jacobsen, E. (2003). Relevance of sexual polyploidization for crop improvement - A review. *Euphytica*, 133(1), 3–18. <https://doi.org/10.1023 / A: 1025600824483>

Rao, S., Kang, X., Li, J., & Chen, J. (2019). Induction, identification and characterization of tetraploidy in *Lycium ruthenicum*. *Breeding Science*, 69(1), 160–168. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.18144>

Rivas-Sendra, A., Campos-Vega, M., Calabuig-Serna, A., & Seguí-Simarro, J. M. (2017). Development and characterization of an eggplant (*Solanum melongena*) doubled haploid population and a doubled haploid line with high androgenic response. *Euphytica*, 213(4), 89. <https://doi.org/10.1007/s10681-017-1879-3>

- Rodríguez, N. C., & Bueno, A. M. L. (2006). Estudio de la diversidad citogenética de *Physalis peruviana* L. (Solanaceae). Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá., 48–48.
- Rotino, G. L. (2016). Anther Culture in Eggplant (*Solanum melongena* L.). In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1359, pp. 453–466). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_25
- Sattler, M. C., Carvalho, C. R., & Clarindo, W. R. (2016). The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*, 243(2), 281–296. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2450-x>
- Schmidt-Lebuhn, A. N., Fuchs, J., Hertel, D., Hirsch, H., Toivonen, J., & Kessler, M. (2010). An Andean radiation: Polyploidy in the tree genus *Polylepis* (Rosaceae, Sanguisorbeae). *Plant Biology*, 12(6), 917–926. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2009.00297.x>
- Schreiber, F. 2012. Estudio de pre-factibilidad para la producción y comercialización de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) en condiciones de valles interandinos-Sierra Exportadora. Lima-Peru.
- Segui-Simarro, J. M., & Nuez, F. (2007). Embryogenesis induction, callogenesis, and plant regeneration by in vitro culture of tomato isolated microspores and whole anthers. *Journal of Experimental Botany*, 58(5), 1119–1132. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl271>
- Singhal, V. K., Kaur, M., Kumar, H. P., & Gupta, R. C. (2012). High Pollen Sterility and 2n Pollen Grains in an Asynaptic 4x Cytotype (2n=48) of *Solanum nigrum* L. *Cytologia*, 77(3), 333–342. <https://doi.org/10.1508/cytologia.77.333>
- Siicex. 2018. Exportación del producto aguaymanto según sus principales mercados. Consultado 10 abr 2018. Disponible en: http://www.siicex.gob.pe/siicex/portal5ES.asp?_page_=160.00000
- Soltis, D. E., Albert, V. A., Leebens-Mack, J., Bell, C. D., Paterson, A. H., Zheng, C., Sankoff, D., de Pamphilis, C. W., Wall, P. K., & Soltis, P. S. (2009). Polyploidy and angiosperm diversification. *American Journal of Botany*, 96(1), 336–348. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800079>

- Sosa, M. M., Angulo, M. B., Greppi, J. A., & Bugallo, V. (2016). Chromosome numbers and DNA content in some species of *Mecardonia* (Gratiolae, Plantaginaceae). *Comparative Cytogenetics*, 10(4), 769–780. <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v10i4.10362>
- Spooner, D. M., van den Berg, R. G., Rivera-Pena, A., Velguth, P., del Rio, A., & Salas-Lopez, A. (2005). Taxonomy of Mexican and Central American Members of *Solanum* Series *Conicibaccata* (sect . *Petota*). *Systematic Botany*, 26(4), 743–756. <https://doi.org/10.1043/0363-6445-26.4.743>
- Supena, E. D. J., Muswita, W., Suharsono, S., & Custers, J. B. M. (2006). Evaluation of crucial factors for implementing shed-microspore culture of Indonesian hot pepper (*Capsicum annum* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 107(3), 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.08.006>
- Tang, Z.Q., Chen, D.L., Song, Z.-J., He, Y.C., & Cai, D.T. (2010). In vitro induction and identification of tetraploid plants of *Paulownia tomentosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 102(2), 213–220. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9724-6>
- Tel-Zur, N., Abbo, S., Bar-Zvi, D., & Mizrahi, Y. (2004). Genetic relationships among *Hylocereus* and *Selenicereus* vine cacti (Cactaceae): Evidence from hybridization and cytological studies. *Annals of Botany*, 94(4), 527–534. <https://doi.org/10.1093/aob/mch183>
- Tel-Zur, N., Dudai, M., Raveh, E., & Mizrahi, Y. (2011). In situ induction of chromosome doubling in vine cacti (Cactaceae). *Scientia Horticulturae*, 129(4), 570–576. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.04.027>
- Tränkner, C., Krüger, J., Wanke, S., Naumann, J., Wenke, T., & Engel, F. (2019). Rapid identification of inflorescence type markers by genotyping-by-sequencing of diploid and triploid F1 plants of *Hydrangea macrophylla*. *BMC Genetics*, 20(1), 60. <https://doi.org/10.1186/s12863-019-0764-6>
- Trevaskis, B., Bagnall, D. J., Ellis, M. H., Peacock, W. J., & Dennis, E. S. (2003). MADS box genes control vernalization-induced flowering in cereals. *Proceedings of the*

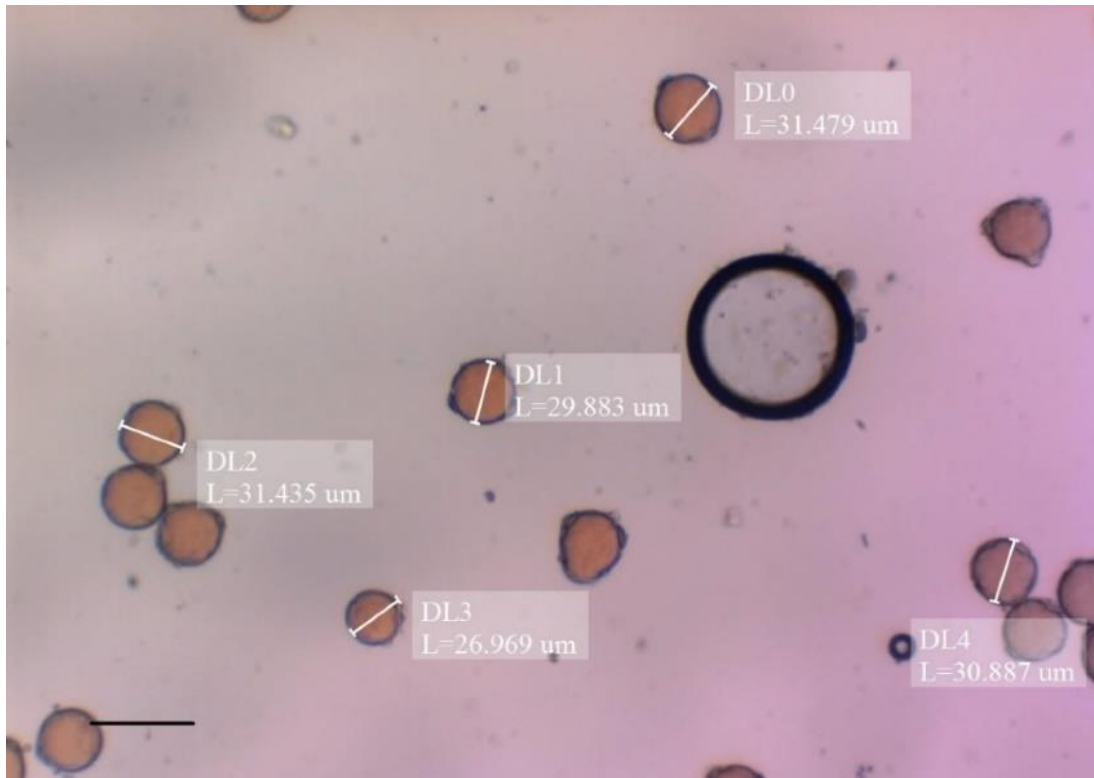
National Academy of Sciences, 100(22), 13099–13104.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1635053100>

- Tsukaya, H. (2013). Does ploidy level directly control cell size? Counterevidence from arabidopsis genetics. *PLoS ONE*, 8(12), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083729>
- Tsukaya, H., Sawada, Y., Oikawa, A., Shiratake, K., Isuzugawa, K., Saito, K., & Hirai, M. Y. (2015). Intraspecific comparative analyses of metabolites between diploid and tetraploid *Arabidopsis thaliana* and *Pyrus communis*. *New Negatives in Plant Science*, 1–2, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.neps.2015.06.001>
- Tulay, E., & Unal, M. (2010). Production of colchicine induced tetraploids in *Vicia villosa* roth. *Caryologia*, 63(3), 292–303. <https://doi.org/10.1080/00087114.2010.10589739>
- Vallejo, F., & Estrada, E. (2002). Mejoramiento Genético de Plantas.
- Whitehead, M. R., Lanfear, R., Mitchell, R. J., & Karron, J. D. (2018). Plant Mating Systems Often Vary Widely Among Populations. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6(APR), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00038>
- Wilkerson, M. J. (2012). Principles and Applications of Flow Cytometry and Cell Sorting in Companion Animal Medicine. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 42(1), 53–71. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.09.012>
- Winarto, B., Mattjik, N. A., Teixeira da silva, J. A., Purwito, A., & Marwoto, B. (2010). Ploidy screening of anthurium (*Anthurium andreaum* Linden ex André) regenerants derived from anther culture. *Scientia Horticulturae*, 127(5), 86–90. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.09.004>
- Wu, J.-H., Ferguson, A. R., Murray, B. G., Jia, Y., Datson, P. M., & Zhang, J. (2012). Induced polyploidy dramatically increases the size and alters the shape of fruit in *Actinidia chinensis*. *Annals of Botany*, 109(1), 169–179. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr256>
- Yildiz, M. (2013). Plant Responses at Different Ploidy Levels. In *Current Progress in Biological Research*. InTech. <https://doi.org/10.5772/55785>

Zlesak, D. C., Thill, C. A., & Anderson, N. O. (2005). Trifluralin-mediated polyploidization of *Rosa chinensis minima* (Sims) Voss seedlings. *Euphytica*, 141(3), 281–290. <https://doi.org/10.1007/s10681-005-7512-x>.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Medición del grano de polen de un tetraploide (Bar= 50um)



Anexo 2 : Características del estoma (largo, ancho y densidad), intensidad de fluorescencia, cantidad de cromosomas y nivel de ploidia

GENOTIPOS	ESTOMA±EE			VIABILIDAD DE POLEN (%)	GI		FLORES (n=10)			
	LARGO	ANCHO	DENSIDAD		PI	AN	SE	PE	PL	LO
GM01	23.786±0.243	18.500±0.192	531.616±5.434	5.72	1	5	5	5	2	2
GM02	24.827±0.396	19.996±0.278	436.088±3.924	2.79	1	5	5	5	2	2
GM04	27.073±0.169	20.459±0.187	395.889±9.543	1.88	1	5	5	5	2	2
GM05	23.741±0.210	19.130±0.268	404.245±18.60	2.53	1	5	5	5	2	2
GM06	23.351±0.216	18.372±0.193	341.237±7.175	3.58	1	5	5	5	2	2
GM07	25.386±0.217	20.809±0.215	448.509±5.581	4.90	1	5	5	5	2	2
GM09	25.537±0.305	19.751±0.199	383.920±8.931	76.59	1	5	5	5	2	2
GM10	24.517±0.296	20.205±0.282	453.703±6.108	4.76	1	5	5	5	2	2
GM12	24.461±0.392	18.814±0.244	457.994±6.969	5.14	1	5	5	5	2	2
GM14	23.765±0.253	19.240±0.251	496.160±5.475	1.85	1	5	5	5	2	2
GM16	25.559±0.309	19.103±0.188	295.844±5.764	20.70	1	5	5	5	2	2
GM17	27.777±0.309	20.283±0.181	327.461±4.189	40.66	1	5	5	5	2	2
GM19	23.297±0.214	18.931±0.126	462.059±1.089	5.09	1	5.5	5	5.3	2.5	2.4
GM20	24.395±0.225	18.725±0.173	475.835±6.669	9.44	1	5	5	5	2	2
GM26	22.527±0.182	18.490±0.204	389.792±7.364	5.34	1	5	5	5	2	2
GM08	37.973±0.934	27.451±0.637	226.964±9.758	78.04	1	5	5	5	2	2
GM21	30.126±0.332	23.276±0.316	244.579±4.109	86.18	1	5	5	5	2	2
GM23	29.058±0.349	22.894±0.134	182.700±4.685	93.92	1	5	5	5	2	2
GM24	31.368±0.333	23.537±0.195	170.957±2.880	82.81	1	5	5	5	2	2
GM25	34.819±0.263	24.799±0.177	161.246±2.319	68.66	1	5	5	5	2	2
GM18	45.916±0.941	29.769±0.528	125.112±3.212	59.15	1	5	5	5	2	2

PI=Pistilo, AN=Antera, GI=Gineceo, SE=Sépalos, PE=Pétalos, PL=Placenta, LO=Lóculo