



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRICOLAS

INDUCCIÓN DE POLIPLOIDÍA EN *Milla biflora* POR APLICACIÓN DE COLCHICINA

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE

INGENIERO AGRÓNOMO EN FLORICULTURA

PRESENTA:

SONIA CRESENCIO LÓPEZ

MODALIDAD: TESIS INDIVIDUAL

ASESOR:

DR. JOSE LUIS PIÑA ESCUTIA

febrero de 2023

CAMPUS UNIVERSITARIO "EL CERRILLO" TOLUCA, MÉXICO.



ÍNDICE

Índice de cuadros	iii
Índice figuras	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivo general	2
2.2. Objetivos específicos	2
III. HIPÓTESIS	3
IV. JUSTIFICACIÓN	4
V. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
5.1. Clasificación botánica	5
5.2. Morfología	5
5.3. Distribución	7
5.4. Importancia.....	7
5.5. Comercialización.....	8
5.6. Variación cromosómica.....	8
5.7. Poliploidía.....	9
5.8. Colchicina.....	10
5.9. Estudios del uso de colchicina en la inducción de poliploidía	10
5.10. Citogenética.....	10
5.11. Preparación del tejido meristemático	11
5.12. Citología del género <i>Milla</i>	12
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	13
6.1. Ubicación.....	13
6.2. Material vegetativo.....	13
Establecimiento en invernadero.....	14
6.3. Polinización	15
6.4. Cosecha de semillas	15
6.5. Evaluación de colchicina	16

6.6.	Desinfección de semillas	16
6.7.	Aplicación de colchicina	17
6.8.	Siembra <i>in vitro</i>	17
6.9.	Germinación	17
6.10.	Observación de cromosomas:	18
6.10.1.	Pretratamiento:	18
6.10.2.	Fijación:	18
6.10.3.	Hidrólisis:	18
6.10.4.	Tinción:	18
6.10.5.	Aplastamiento celular:	19
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
7.1.	Germinación de semillas	20
VIII.	CONCLUSIONES	26
IX.	GLOSARIO	27
X.	LITERATURA CITADA	29

Índice de cuadros

Cuadro 1. Dosis y tiempo de exposición en tratamientos de colchicina en semillas de <i>Milla biflora</i>	16
Cuadro 2. Porcentaje de germinación de semillas sembradas in-vitro de <i>Milla biflora</i>	20

Índice figuras

Figura 1. <i>Milla biflora</i>	6
Figura 2. Distribución geográfica de <i>Milla biflora</i>	7
Figura 3. A, B, cariotipos de <i>Milla biflora</i> ($2n=6x=42$).	12
Figura 4. Ubicación geográfica de Barrio Buenavista, Jocotitlán, México.....	13
Figura 5. Ubicación en campo, recolección y limpieza de cormos de <i>Milla biflora</i>	14
Figura 6. Establecimiento de cormos y emergencia de hojas y botones florales de plantas de <i>Milla biflora</i>	14
Figura 7. Emasculación y autopolinización de flores de <i>Milla biflora</i> . a) disección de anteras, b) distribución del polen sobre la antera receptiva, c) rotulación de las cruizas.....	15
Figura 8. Cosecha, conteo e incubación de semillas de <i>Milla biflora</i>	16
Figura 9. Células radiculares en metafase de <i>Milla biflora</i> en distintas horas para determinar la hora de colecta.....	21
Figura 10. Célula de testigo de <i>Milla biflora</i> en metafase, $2x=6x=42$, $x=7$	22
Figura 11. Célula en metafase, tratamiento 1 (T1) de <i>Milla biflora</i>	22
Figura 12. Célula en metafase, tratamiento 2 (T2) de <i>Milla biflora</i>	23
Figura 13. Célula en metafase, tratamiento 3 (T3) de <i>Milla biflora</i>	23
Figura 14. Célula en metafase, tratamiento 4 (T4) de <i>Milla biflora</i>	24
Figura 15. Célula en metafase, tratamiento 4 (T5) de <i>Milla biflora</i>	24

RESUMEN

INDUCCIÓN DE POLIPLOIDÍA EN *Milla biflora* POR APLICACIÓN DE COLCHICINA

En México existen variedades de plantas silvestres que poseen cualidades interesantes para el mercado ornamental, pero no alcanzan los estándares demandados por este, por lo que es necesario potenciar dichas características. Estudios previos en diferentes especies han demostrado la eficiencia de la colchicina en la inducción de poliploidía, obteniendo individuos con diferencias cromosómicas dependiendo de las dosis y el tiempo de exposición. *Milla biflora* es una planta silvestre con número cromosómico $2n=42$ (Tapia-Pastrana, 2013). Esta especie presenta cualidades sobresalientes como fragancia y belleza que se presentan en su inflorescencia. En esta investigación se evaluó el efecto de cinco dosis de colchicina (0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%), aplicadas durante 24 horas en semillas de *Milla biflora*. De las plántulas obtenidas, se colectaron meristemos radiculares para el análisis y conteo de cromosomas por el método de squash (Arroyo-Martínez 2014). Los resultados mostraron variación en el número de cromosomas, destacando que con la dosis de 0.2%, se obtuvo $2n=3x=120$ y en 0.4%; $2n=5x=176$, respectivamente; variación, que podría reflejarse en características de importancia ornamental en la especie. Actualmente, las plantas obtenidas continúan su crecimiento para la formación del cormo y posteriormente ser transferidas a condiciones de invernadero para observar y evaluar el fenotipo.

PALABRAS CLAVE: Poliploidía, Colchicina, Cromosoma, Citogenética.

ABSTRACT

INDUCTION OF POLYPLOIDY IN *Milla biflora* BY COLCHICINE APPLICATION

In Mexico there are varieties of wild plants that have interesting qualities, however, they don't meet the standards demanded in the market and need to enhance these characteristics. Previous studies in different species have shown the efficiency of colchicine in inducing polyploidy, obtaining individuals with chromosomal differences depending on the dose and exposure time. *Milla biflora* is a wild plant with chromosome number $2n=42$ (Tapia-Pastrana, 2013), which has outstanding qualities such as fragrance and beauty that are presented in its inflorescence. In this research, the effect of five doses of colchicine (0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%) applied for 24 hours on *Milla biflora* seeds was evaluated. From the seedlings obtained, root meristems were collected for analysis and chromosome counting by the squash method (Arroyo-Martínez 2014). The results showed variation in the number of chromosomes, highlighting that with the dose of 0.2%, $2n=3x=120$ and 0.4% were obtained; $2n=5x=176$, respectively; variation, which could be reflected in characteristics of ornamental importance in the species. Currently, the plants obtained continue their growth for the formation of the corm and later to be transferred to greenhouse conditions to observe and evaluate the phenotype.

KEY WORDS: Polyploidy, Colchicine, Chromosome, Cytogenetics

I. INTRODUCCIÓN

La comercialización de flores en México se enfoca a variedades mejoradas de cultivos ornamentales introducidos, tomando en cuenta morfología color y aroma. Características que también se pueden encontrar en especies silvestres, las cuales, sin embargo, son poco consideradas para ser introducidas en el sector florícola.

Milla biflora se encuentra de forma silvestre y se distribuye desde el sur de Estados Unidos, hasta Honduras, siendo México el país que cuenta con mayor densidad de población de esta especie (Tapia-Pastrana, 2013) la cual es utilizada como ornamental, alimenticia y medicinal. Aunque su flor es poco llamativa, tiene cualidades sobresalientes como el aroma y belleza de su flor que le pueden conferir el potencial para ser considerada como especie de interés, por lo que el uso de métodos de mejoramiento genético puede favorecer lo anterior y así ampliar la posibilidad de aceptación en el mercado, tanto nacional como internacional.

En la actualidad, existen distintos métodos de mejoramiento genético que son utilizados para generar plantas con cualidades mejores a las que ya se tienen, mostrando así nuevas variedades sobresalientes. La poliploidía, es un fenómeno que puede originarse de manera espontánea como una forma evolutiva en las plantas, no obstante, este fenómeno también puede inducirse utilizando métodos artificiales, entre ellos, el uso de colchicina, la cual ha mostrado efectos positivos para generar Poliploidía (Verhoeven *et. al.*, 2017).

Para verificar que la poliploidía se haya producido, es necesario analizar el cariotipo de la especie en estudio, mediante este, se puede observar si existe algún cambio en el número de cromosomas, o bien, en la estructura de estos.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la colchicina en la inducción de poliploidía en *Milla biflora*.

2.2. Objetivos específicos

Evaluar cinco dosis de colchicina (0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%) en la inducción de poliploidía en semillas de *Milla biflora*.

Determinar la dosis letal media de colchicina.

Evaluar el porcentaje de germinación de semillas sometidas a las dosis de colchicina.

Determinar los cambios cromosómicos originados por las dosis de colchicina evaluadas.

III. HIPÓTESIS

La aplicación de colchicina induce poliploidía en semillas de *Milla biflora*.

IV. JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo de investigación busca evaluar el efecto de diferentes dosis de colchicina en la inducción de poliploidía en *Milla biflora*, así como observar los cambios cromosómicos generados en comparación de otros reportados. Para así presentar una opción con cualidades mejoradas que bien podrían ser a nivel de fenotipo como lo es aumento en el tamaño de flor o inclusive un mayor número de inflorescencias, lo que se podría presentar como una mayor eficiencia a nivel comercial, trayendo como consecuencia la integración de esta en un mercado más amplio al que se encuentra actualmente.

V. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1. Clasificación botánica

El género *Milla* pertenece a la familia Asparagaceae (Chase *et. al.*, 2009) y está conformado por 11 especies (Gutiérrez y Solano, 2015). *Milla biflora* fue descrita por Cavanilles en 1793. Su clasificación botánica es la siguiente:

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Liliopsida*

Orden: *Asparagales*

Familia: *Asparagaceae*

Subfamilia: *Brodiaeoideae*

Género: *Milla* CAV.

Especie: *Milla biflora* Cav.

5.2. Morfología

Milla biflora comúnmente conocida como “estrellita”, “flor de San Juan”, “Mexican Star”, entre otros, es una planta de pastizales que tiene perfume nocturno, crece de manera silvestre como hierbas de 40-45 cm de alto. Los cormos subglobosos, de 1-2 cm de largo y 1-3 cm de diámetro, cubiertos por catáfilas membranáceas de color pardo claro. Hojas 1-3, linear-filiformes, de 15-65 cm de largo, 1-3 mm de ancho. aplanadas, canaliculadas en el haz, redondeadas en el envés, ocasionalmente subcilíndricas, los nervios diminutamente hialino-denticulados (Moore, 1953), las flores se disponen de 1 a 3 en pseudombelas; con pedicelos filiformes, lisos, glabros; flores tubulares de forma hipocraterimorfa, fragantes de color blanco cambiando a púrpuras, el tubo del perianto es de 0.5 a 14 cm de largo, delgado en la base, expandido arriba; tres tépalos externos e internos son anatómicamente indiferenciados, tienen una línea longitudinal verde en el envés, son oblongos largamente ovados, glabros, con ápice obtuso, nervados, los estambres son seis, connados, formando

una corona; los filamentos son de color blanco, papilosos; las anteras son amarillas, singenéticas hasta poco antes de la senectud, lineares; el estilo es filiforme; el estigma es discoidal, abierto y papiloso (Gutiérrez *et al.*, 2022). (Figura 1). Su forma de reproducción no ha sido descrita, pero de forma silvestre se ha observado que es por semillas.

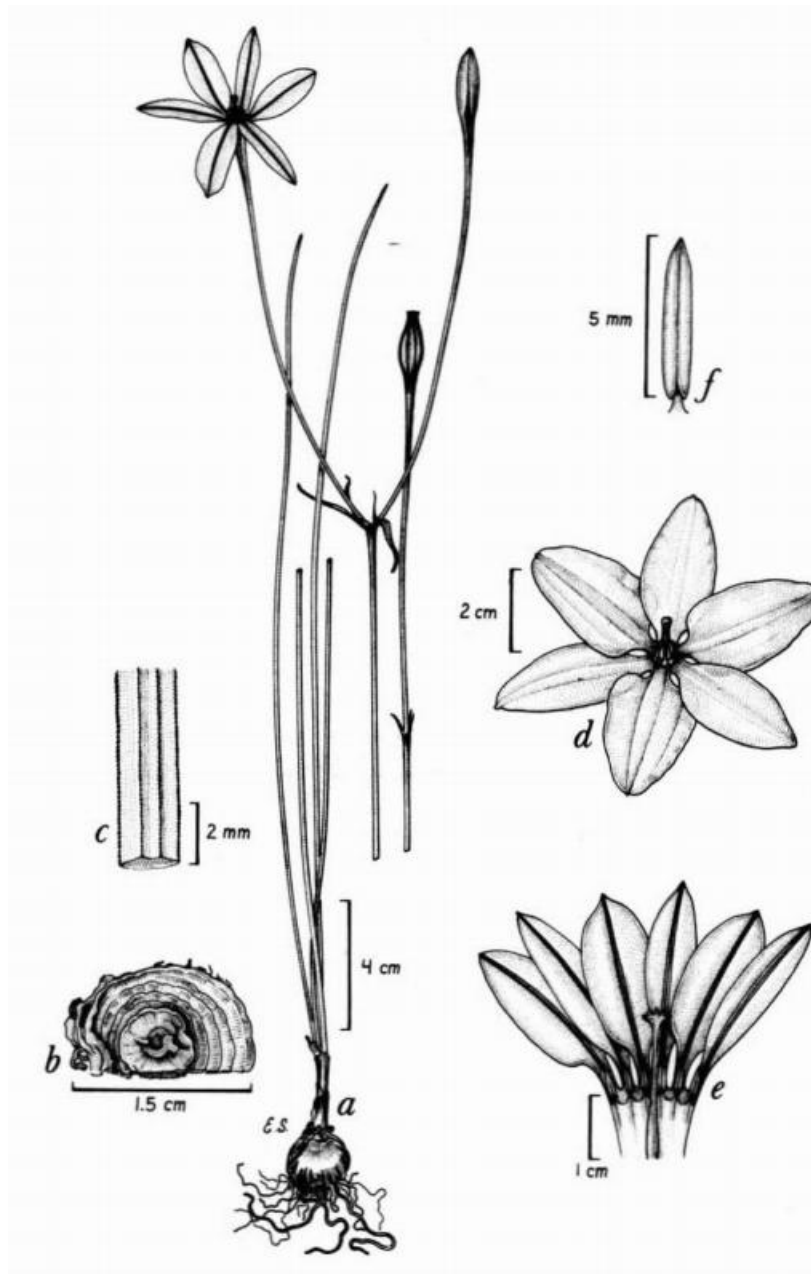


Figura 1. *Milla biflora*. A, hábito; b, cormo, detalle sin catáfilas; c, tallo, detalle; d, flor superior; e, flor, vista lateral, flor disecada; f, antera. Ilustración por E. Saavedra basada en el ejemplar C. Horvitzet al. 182. Obtenida de: FLORA DE VERACRUZ, Espejo-Serna y López-Ferrari. (2003).

5.3. Distribución

Su distribución abarca desde del sur de Estados Unidos; México (Aguascalientes, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Veracruz y Zacatecas), Guatemala y Honduras (Figura 2) (Moore, 1953).

Crece en bosques de encino, bosques de coníferas y los matorrales xerófilos, en los meses de junio y julio emergen las hojas y posteriormente en los meses de agosto-septiembre llegan a floración, pasando a fructificación a finales de septiembre y maduración del fruto a inicios de octubre.

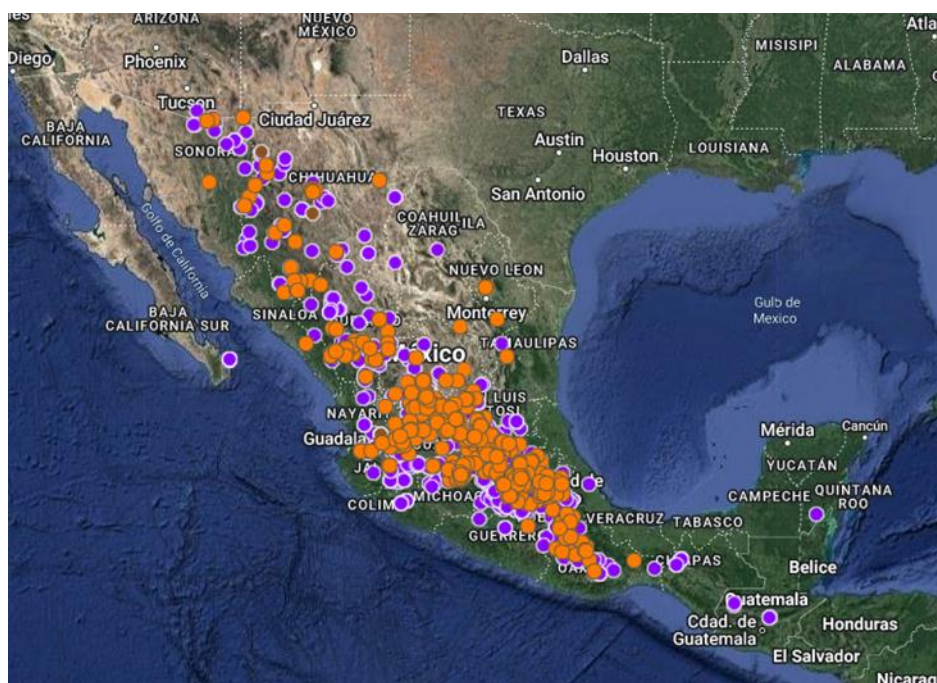


Figura 2. Distribución geográfica de *Milla biflora*. Obtenida de Enciclovida.
<https://enciclovida.mx/especies/159249-milla-biflora>.

5.4. Importancia

Sus flores se utilizan en infusión para aliviar la tos, también se utiliza como ornamental (Rzedowski, 2005), y en algunos lugares se utiliza con fines gastronómicos. El uso más importante que presenta es ornamental, debido a la forma de su inflorescencia y fragancia, esto ocasiona que sea recolectada por los habitantes de las zonas donde crece de forma natural para decoración en los hogares y en floristería por algunos decoradores.

5.5. Comercialización

En el Estado de México: los pobladores aledaños a las zonas donde crece de manera silvestre, con frecuencia recolectan la planta completa para comercializarla en distintos puntos, además de ser comercializadas en el mercado de la flor en el municipio de Tenancingo. Esta extracción desmedida puede traer como consecuencia una erosión genética que, en el futuro podría ocasionar la pérdida de la diversidad o aún más, la extinción de la especie, provocando cambios en la funcionalidad de los ecosistemas (Tellería, 2013).

En la actualidad, no existe un mercado definido de esta flor. Sin embargo, en los últimos meses se han encontrado en algunas páginas web de países asiáticos la venta de cormos como semilla botánica para establecimiento en jardines, donde el precio va de entre ¥1,500 (aprox. \$195 MNX) por un cormo y ¥4,420 (aprox. \$444.6MNX) por 3 cormos (Takii, 2022). De igual manera se encuentran blogs donde reportan el crecimiento y desarrollo de estas. En México solo se encontró una página web donde lo que se comercializa es la semilla obtenida del fruto, teniendo un costo de \$70 MNX por 10 semillas (Mercado Libre 2022).

5.6. Variación cromosómica

Cuando es definida la constancia en número y morfología de los cromosomas de una especie, y se presentan modificaciones en estos, se le denominan variaciones cromosómicas. (Universidad de Oviedo, s.f.).

Una variación cromosómica se refiere a cualquier cambio que modifique la disposición lineal de los genes con respecto a los cromosomas o a su número. Estas se dividen en estructurales; las cuales deben analizar la composición molecular y los cambios que hay en el proceso de ciclo celular; y numéricas que tienen un cambio en el número de cromosomas del individuo (Universidad de Oviedo, s.f.).

Bridges (1919) puntualizó a la duplicación como un cambio cromosómico estructural que produce la duplicación o repetición de una sección del genoma de las células, es decir una ganancia de un segmento cromosómico. Comúnmente no son percibidas y los organismos las soportan, tienen

comportamientos estables y muestran mayor adaptación al cambio evolutivo (Universidad de Oviedo, s.f.).

5.7. Poliploidía

El término “ploidía” se refiere al número de juegos de cromosomas de un individuo y se le denomina como “x”. Un individuo con dos juegos de cromosomas (2x) se refiere como un diploide, con 3x, triploide y sucesivamente. Por definición un individuo poliploide tiene un número de cromosomas diferente del número básico “n” correspondiente a las gametas de la especie. Los organismos superiores que están formados por dos series de genomas se consideran diploides (Alderete *et al.*, 2007).

Aunque la poliploidía es generada naturalmente, también puede ser generada de forma artificial.

Comúnmente la inducción de tetraploides o de duplicación genómica, se duplica la cantidad de material genético y le confiere al individuo, mayor adaptación a cambios evolutivos, por lo cual la divergencia funcional de los genes duplicados se puede considerar importante para la evolución de plantas, debido a que genera diversificación evolutiva, lo cual es una ventaja selectiva a largo plazo (De Bodt *et al.*, 2005; Alcántar, 2014).

La poliploidía es importante en la historia evolutiva de plantas y animales, ya que, dependiendo de varios factores, puede dar lugar a linajes que persisten a través del tiempo evolutivo (Otto, 2007; Alcántar, 2014). Comúnmente surge debido a una falla en el proceso de división celular de la meiosis, durante la primera división, ocasionando permutaciones de uno o los dos gametos diploides, lo cual da como resultado triploidía o tetraploidía, respectivamente (Otto y Whitton, 2000; Futuyma, 2005; Ryan, 2006; Alcántar, 2014).

Aunque la poliploidía juega un papel importante dentro de la evolución de las plantas, no ha logrado alto impacto para ser aplicado en programas de mejoramiento de cultivos. Al ser solamente una duplicación al material cromosómico, no se introduce nueva información genética a los materiales, por el contrario, solo aumenta la cantidad de ADN la cual debe ser duplicada en cada proceso de división, provocando una mayor duración al ciclo mitótico, por lo tanto, la duplicación de este material aumenta el tamaño celular lo cual provoca desbalances anatómicos (Ranney, 2000; Alcántar, 2014).

5.8. Colchicina

La colchicina es un alcaloide extraído de *Colchicum autumnale* que se une a los dímeros de tubulina e impide la formación del huso mitótico. Se ha demostrado que la colchicina se une con gran afinidad a las células de mamíferos e induce la detención de la metafase en concentraciones de 10^{-7} M (Jordan y Wilson, 1999). Este agente es efectivo a niveles milimolares en plantas Morejohn *et al.*, 1984; Planchas *et al.*, 2000). Es el producto químico más utilizado para la inducción de poliploidía de plantas (Urwin, 2014; Salazar *et al.*, 2018).

5.9. Estudios del uso de colchicina en la inducción de poliploidía

En 2007 Lui *et al.*, lograron la duplicación cromosómica sometiendo a diferentes dosis de colchicina semillas y meristemas de plántulas jóvenes de *Platanus acerifolia*, y obtuvieron mayor número de tetraploides con el método de aplicación en semillas, aunque estos no llegaron a madurez por el efecto nocivo causado por la colchicina en las raíces, mientras que en los tratamientos que se sometieron en los meristemas, las hojas y los tallos se vieron afectados temporalmente, pero lograron recuperarse.

Urwin en 2014 realizó aplicación de colchicina en tres explantes diferentes de *Lavandula x intermedia*, híbridos naturales de *Lavandula angustifolia* y *Lavandula latifolia* que son utilizados para la producción de aceites y también de manera ornamental. Donde obtuvieron plantas con morfología similar a la de los padres, pero estas eran plantas más grandes al igual que sus inflorescencias comparadas con dichos padres. En un tratamiento de esta investigación se presentó que la descendencia era uniforme y continuo así en las siguientes generaciones.

En 2020 Ferrer-Cervantes *et al.*, evaluaron el efecto de colchicina en cuatro especies distintas de *Polianthes*, sugiriendo como tratamiento las dosis de 0.0, 0.001, 0.01, 0.05, 0.1 y 0.2% durante 24 y 48h respectivamente, reportando que la concentración de 0.2% mostró una mayor precisión en la obtención de poliploides.

5.10. Citogenética

En los últimos años, los estudios citogenéticos se han enfocado al estudio de la estructura y evolución de los diferentes genomas entre especies silvestres y cultivadas. A través de ellos se ha facilitado una

mayor percepción sobre la organización y estructura de los genomas, atribuyendo gran importancia para la realización de mapeos genéticos entre las distintas especies. Los mapas citogenéticos o cromosómicos constituyen una etapa intermedia entre los mapas físicos y los mapas genéticos. La disponibilidad de un mapa citogenético permite posicionar los genes, y los marcadores ligados a éstos, con respecto a los marcadores de tipo estructural propios de regiones cromosómicas específicas. Por lo tanto, la información citogenética detallada es importante para combinar de manera análoga la información genética disponible con la estructura física de los cromosomas (Herrera, 2007).

5.11. Preparación del tejido meristemático

En un estudio citogenético, se debe realizar previamente un tratamiento por el cual es preparado el tejido que será utilizado para el estudio ya mencionado. De acuerdo a Arroyo-Martínez (2014) la metodología utilizada para la preparación de tejido implica los siguientes pasos:

Determinación de la hora mitótica.

Pretratamiento.

Fijación.

Hidrólisis.

Tinción.

5.12. Citología del género *Milla*

La literatura especializada sobre la arquitectura cromosómica de la especie es muy escueta, encontrándose recuentos cromosómicos como $2n= 14, 28$ y 42 , que corresponden a una serie poliploide con número base $x=7$, con diploides, tetraploides y hexaploides (Tapia-Pastrana, 2013).

En otros dos recuentos se ha observado un $2n= 16$ y 48 (Lenz, 1971).

Sin embargo, Tapia-Pastrana (2013) realizó un análisis sobre la arquitectura y el comportamiento de los cromosomas encontrados en células radiculares de *Milla biflora* reportado la presencia de rompimientos, fragmentos cromosómicos y heterocromosomas, evidenciando un mecanismo activo de rearrreglos cromosómicos en el cariotipo. Además, se confirmó un número cromosómico $2n= 6x=42$ ($x=7$), y se obtuvo el cariotipo de *Milla biflora* donde se señalan los rompimientos cromosómicos y heterocromosomas (Figura 3).

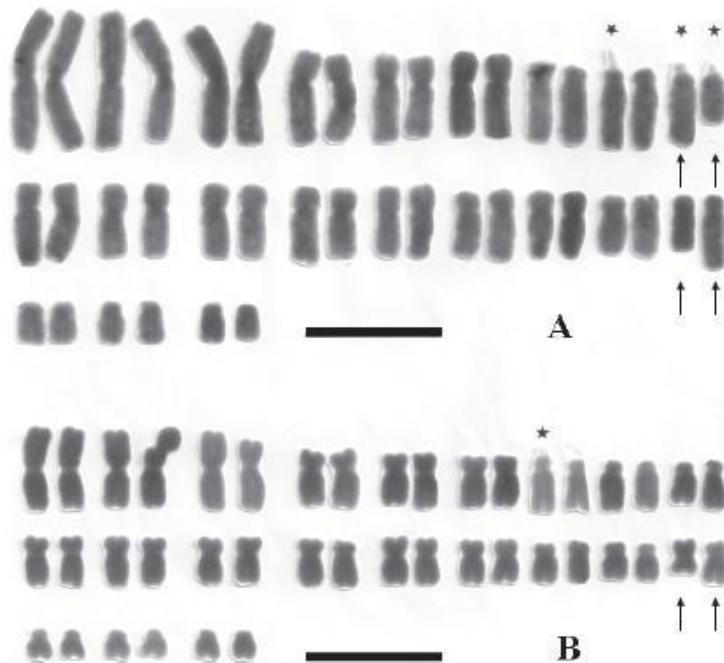


Figura 3. A, B, cariotipos de *Milla biflora* ($2n=6 \ 6x=42$). Los cromosomas se muestran alineados por el centrómero y en orden decreciente de tamaño. En B, se aprecia un rompimiento en un cromosoma metacéntrico grande. Las flechas señalan heterocromosomas. * Cromosomas con satélite. Escala= $10\mu\text{m}$. (Figura tomada de Tapia-Pastrana, 2013).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Ubicación

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas (FCAgri), de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx).

6.2. Material vegetativo

Se utilizaron plantas de *Milla biflora* colectadas en la localidad de barrio Buenavista, ubicado en la localidad de Jocotitlán, Estado de México, México (Figura 4), con un Latitud: 19.71528° o 19° 42' 55" norte. Longitud: -99.81306° o 99° 48' 47" oeste. Altitud: 2,617 metros (Mapcarta, s.f.). De las plantas, los cormos serán limpiados, desinfectados, secados (Figura 5) y serán sometidos a un periodo de dormancia durante cuatro meses.

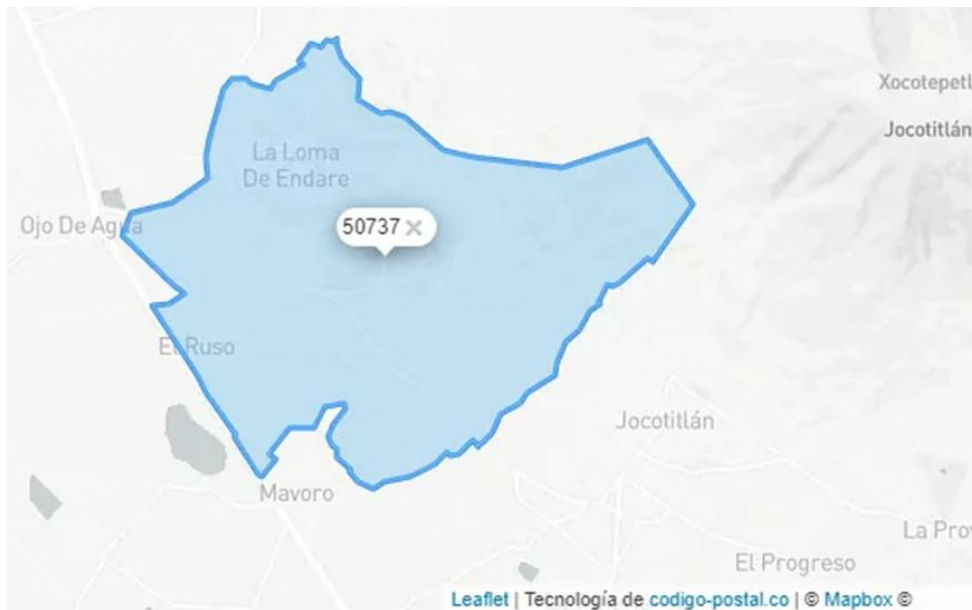


Figura 4. Ubicación geográfica de barrio Buenavista, Jocotitlán, México. Obtenida de Código Postal 50737. (s.f.). <https://codigo-postal.co/mexico/cp/50737/>.



Figura 5. Ubicación en campo, recolección y limpieza de cormos de *Milla biflora*

Establecimiento en invernadero

Pasados cuatro meses, en el invernadero 9 de la Facultad de Ciencias Agrícolas, los cormos se establecieron en macetas con un sustrato 3:1 de turba (peat moss) y perlita (agrolita), donde se colocaron de 3 a 4 cormos por cada maceta (Figura 6), realizando un riego abundante cada semana.

Una vez comenzada la emergencia de los primeros brotes, se realizaron fertilizaciones constantes cada semana hasta la emergencia de los botones florales, continuando así con los riegos semanales.

Cada planta presentaba de 1 a dos botones florales, los cuales poseían de 1 a 3 inflorescencias por tallo (Figura 6).



Figura 6. Establecimiento de cormos y emergencia de hojas y botones florales de plantas de *Milla biflora*.

6.3. Polinización

Una vez iniciada la apertura de las inflorescencias, se inició el monitoreo de cada una de estas, para realizar autopolinizaciones a cada una, para este procedimiento se realizó una emasculación (Figura 7) en la que se retiraron los estambres, extrayendo el polen de estas y colocándolo directamente al estigma. Las polinizaciones se llevaron a cabo en distintas horas del día para determinar la hora en que el estigma se encontraba receptivo. Cada una de estas fue rotulada con la fecha, hora y tipo de polinización.

Pasadas las polinizaciones los riegos comenzaron a disminuir siendo realizados cada 10 días hasta la maduración de los frutos.

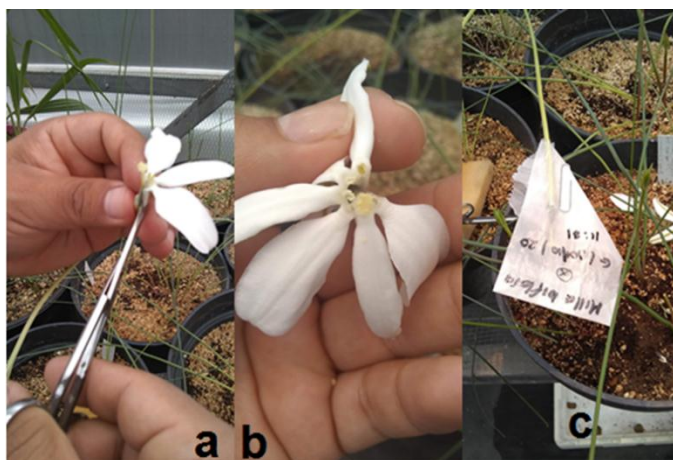


Figura 7. Emasculación y autopolinización de flores de *Milla biflora*. a) disección de anteras, b) distribución del polen sobre la antera receptiva, c) rotulación de las cruces.

6.4. Cosecha de semillas

Tres meses después, una vez maduras las cápsulas que contenían las semillas, se realizó la cosecha de estas para posteriormente incubarlas en oscuridad a 4°C. Dos meses después alcanzada la madurez fisiológica de la cápsula se realizó el conteo de semillas y selección de éstas. Figura 8.



Figura 8. Cosecha, conteo e incubación de semillas de *Milla biflora*.

6.5. Evaluación de colchicina

Las dosis de colchicina consideradas en esta investigación fueron con base a lo reportado por Lui *et al.* (2007). Cuadro 1.

Cuadro 1. Dosis y tiempo de exposición en tratamientos de colchicina en semillas de *Milla biflora* (Lui *et. al.*, 2007).

Tratamientos	Concentración de colchicina (%)	Tiempo de exposición
Testigo	0%	24 horas
Tratamiento 1 (T1)	0.1%	24 horas
Tratamiento 2 (T2)	0.2%	24 horas
Tratamiento 3 (T3)	0.3%	24 horas
Tratamiento 4 (T4)	0.4%	24 horas
Tratamiento 5 (T5)	0.5%	24 horas

6.6. Desinfección de semillas

Las semillas fueron lavadas con jabón antibacterial a chorro de agua por 5 minutos en constante agitación.

Posteriormente el proceso continuó bajo campana de flujo laminar, aquí, las semillas se colocaron durante 2 minutos en etanol al 70% v/v en constante agitación. Pasado este tiempo se transfirieron a una solución de hipoclorito de calcio al 2.5% durante 10 minutos en agitación constante. Seguido de esto, se transfirieron nuevamente a una solución de hipoclorito de sodio por 5 minutos de igual forma en agitación constante. Finalmente se enjuagaron dos veces con agua destilada esterilizada.

Una vez desinfectadas, se mantuvieron durante 3 días en agua destilada esterilizada en refrigeración a 4°C.

6.7. Aplicación de colchicina

Posteriormente se sometieron a los cinco tratamientos (Cuadro 1), cada tratamiento constaba de diez semillas por repetición contando con 2 repeticiones cada una, más un testigo de igual forma. Se conservaron en refrigeración a 4°C durante 24 h.

6.8. Siembra *in vitro*

Las semillas fueron sembradas en frascos tipo gerber con medio MS (Murashige & Skoog, 1962) al 50%, colocando cinco semillas por frasco, obteniendo así cuatro frascos por tratamiento, para después ser sometidas 24 h en oscuridad para inducir germinación.

Pasadas las 24 horas en oscuridad, se colocaron los frascos en cuarto de incubación y se mantuvieron en observación.

6.9. Germinación

Pasadas una semana después de la siembra se comenzó a observar la germinación de las semillas. Por lo que se dio seguimiento al crecimiento de sus raíces, hasta conseguir un tamaño de 2cm aproximadamente y una cantidad mayor a dos de éstas, para realizar las pruebas citogenéticas.

6.10. Observación de cromosomas:

Una vez obtenidas raíces con el tamaño y cantidad mencionadas, se realizó el análisis citogenético, dentro del cual se realizaron distintos pasos, como lo son:

6.10.1. Pretratamiento:

Se colectaron raíces jóvenes de cada tratamiento incluyendo el testigo y se colocaron en una solución de 8-hidroxiquinolina al 0.02% y se mantuvieron en oscuridad durante 5 h.

6.10.2. Fijación:

Pasadas las 5 h en oscuridad, las raíces se lavaron con agua destilada y se secaron, posteriormente se pasaron a una solución FARMER y se mantuvieron ahí durante 24h a temperatura ambiente.

6.10.3. Hidrólisis:

Pasadas las 24 h, las raíces fueron retiradas de la solución FARMER, se enjuagaron con agua destilada y se secaron, después se colocaron en una solución de HCl 1N y se colocaron en baño maría de 8 a 10 minutos a 60°C.

6.10.4. Tinción:

Luego de extraer las raíces del HCl se secaron y se pasaron a solución feulgen durante 30 min en oscuridad.

6.10.5. Aplastamiento celular:

Pasados los 30 min, en un microscopio compuesto, se colocó una raíz en un porta objetos y con la ayuda de un bisturí se realizó un corte separando el meristemo del resto del tejido, desechando este último, seguido de esto se agregó una gota de aceto-orceína al 2% evitando deshidratación y se colocó un cubreobjetos.

Con la ayuda de una aguja de disección se esparció en tejido en el portaobjetos con ligeros golpecitos. A continuación, se observaron las laminillas en un microscopio de contraste de fases.

6.10.6. Conteo de cromosomas

Este procedimiento se efectuó en cinco individuos, cada uno de ellos presentaba aproximadamente de tres a siete meristemas, donde se descartaron todos aquellos que presentaban oxidación, se observaron de dos a tres células por meristemo.

El conteo se realizó con base a la observación a través del microscopio de contraste de fases.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Germinación de semillas

La germinación de semillas comenzó una semana después de sembradas. Aunque no fue homogénea, el crecimiento de las plántulas continuó y, pasadas cuatro semanas se comenzaron a formar pequeños cormos en algunos frascos.

En las dosis aplicadas no se encontró dosis letal media, pues en las semillas en las que no se observó germinación (Cuadro 2), se determinó que eran semillas vanas en las que no se tenía embrión o endospermo (datos no publicados), sugiriendo que este bajo nivel de germinación no fue afectado por la colchicina.

Cuadro 2. Porcentaje de germinación de semillas sembradas in-vitro de *Milla biflora*.

Tratamiento	Porcentaje de germinación
Testigo	95%
0.1%	85%
0.2%	95%
0.3%	90%
0.4%	90%
0.5%	85%

7.2. Determinación de la hora de colecta de raíces

Pruebas para determinar hora de colecta:

Para determinar la hora de colecta de raíces en el pre tratamiento se realizaron distintas pruebas para evaluar la hora en que mejor se observara un mayor número de células en metafase, proceso mediante el cual se estimaron cinco horarios diferentes (5:30, 6:00, 7:00, 8:00 y 9:00am) donde las 8:00 am fue la hora donde se registró mayor número de células en metafase y donde se observaban de mejor manera los cromosomas. (Figura 9).

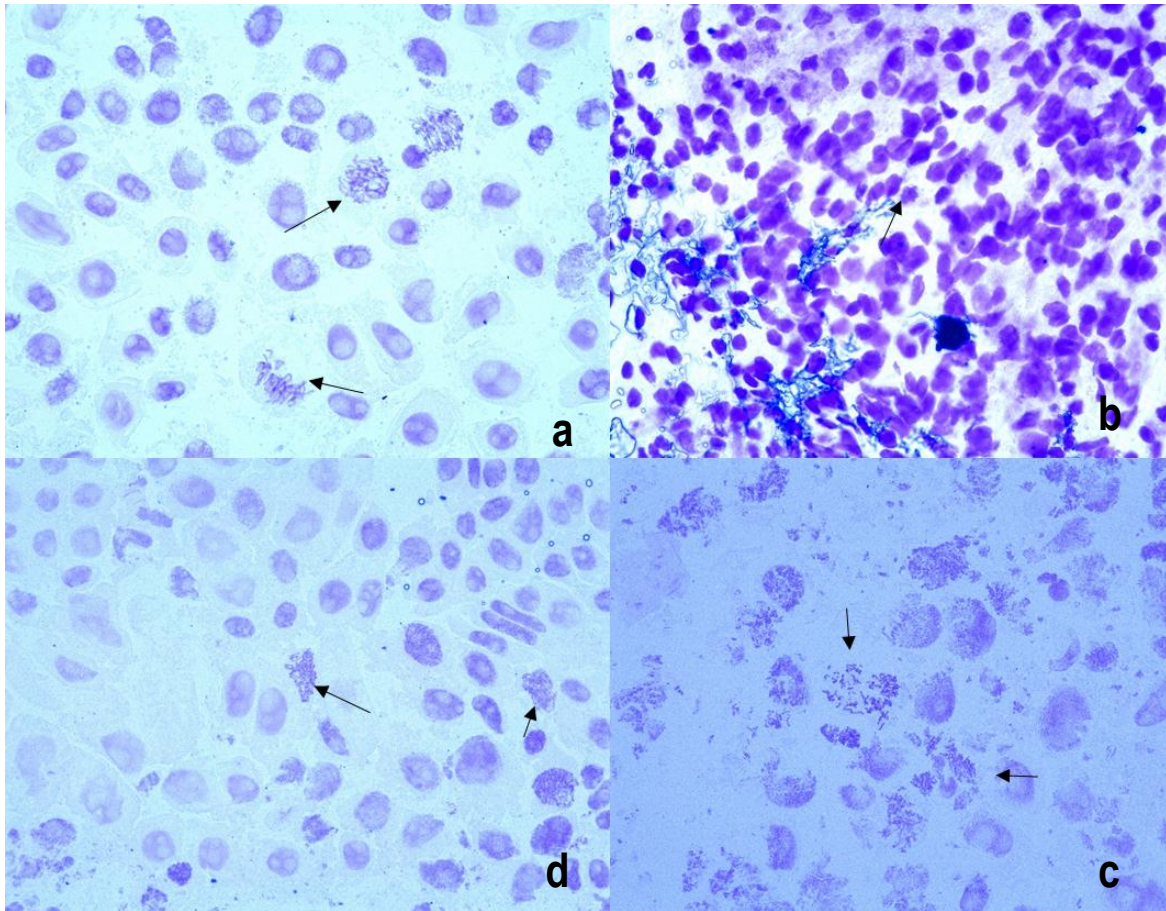


Figura 9. Células radiculares en metafase de *Milla biflora* en distintas horas para determinar la hora de colecta. a) 5:30 am, b) 6:00 am, c) 7:00 am, d) 9 am. Las flechas señalan células imperceptibles para el estudio.

7.3. Efecto de la colchicina en el cariotipo

El efecto de colchicina consiste en el aumento del número de cromosomas, debido a que esta inhibe la formación de huso mitótico, evitando división celular, trayendo como resultado la duplicación del material genético.

En el presente estudio, se encontraron resultados similares porque en el análisis citogenético se observaron diferencias en el número de cromosomas, en función de las diferentes dosis de colchicina evaluadas, mostrando cambios respecto al testigo ($2n=6x=42$, donde $x=7$) (Tapia-Pastrana, 2013).

Con base a lo reportado, se comprobó en el testigo el nivel de poliploidía $6x=42$. Figura 10.

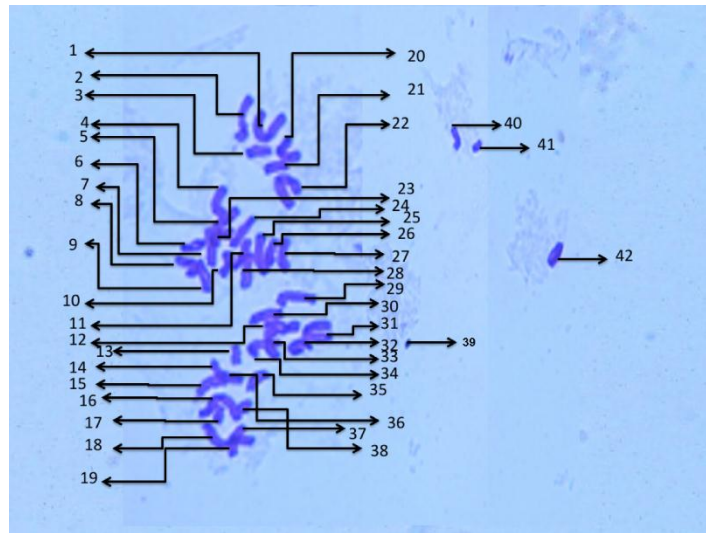


Figura 10. Célula de testigo de *Milla biflora* en metafase,, $2x=6x=42$, $x=7$

En el tratamiento 1 (T1) que corresponde a la concentración de 0.1% de colchicina, se lograron contar 77 cromosomas (Figura 11).

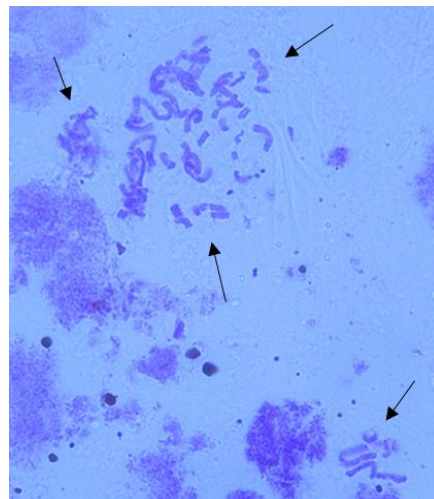


Figura 11. Célula en metafase, tratamiento 1 (T1) de *Milla biflora* expuesto a 0.1% de colchicina, $11x=77$. Las flechas indican los 77 cromosomas dispersos correspondientes a una célula en metafase.

En el tratamiento 2, correspondiente a 0.2% de colchicina se contó un total de 119 cromosomas, dando como nivel de ploidía $17x= 119$ (Figura 12).

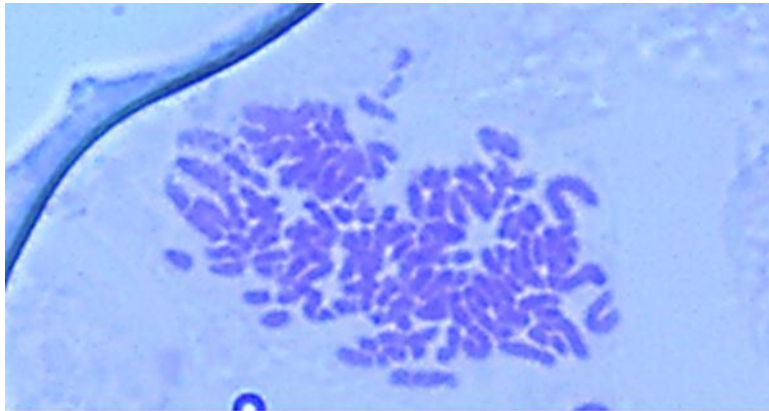


Figura 12. Célula en metafase tratamiento 2 (T2) de *Milla biflora* expuesta 0.2% de colchicina en la que se expresan 120 cromosomas, $17x= 119$.

En el tratamiento 3, correspondiente a 0.3% de colchicina, se observaron 91 cromosomas, donde se determinó $13x= 91$ (Figura 13).

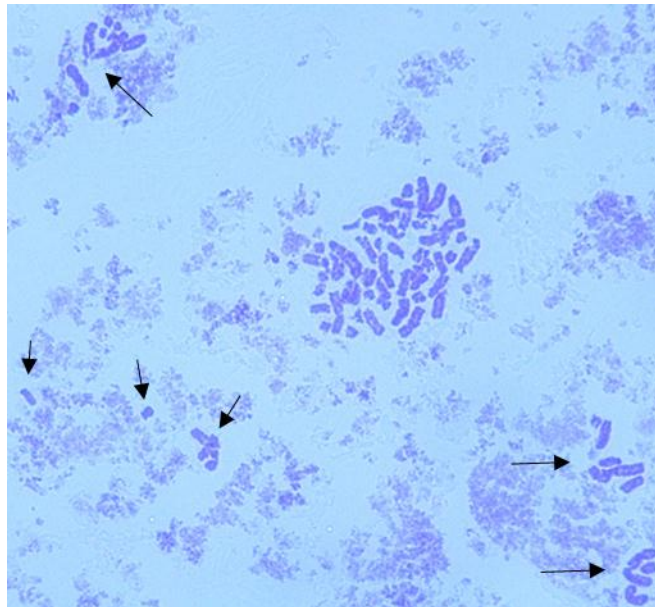


Figura 13. Célula en metafase tratamiento 3 (T3) de *Milla biflora*, expuesta a 0.3% de colchicina. Mostrando 91 cromosomas, dispuestos en una misma célula, las flechas señalan a aquellos dispersos.

En el tratamiento 4, se contaron 175 cromosomas, donde se sugirió: $25x=175$, (Figura 14).

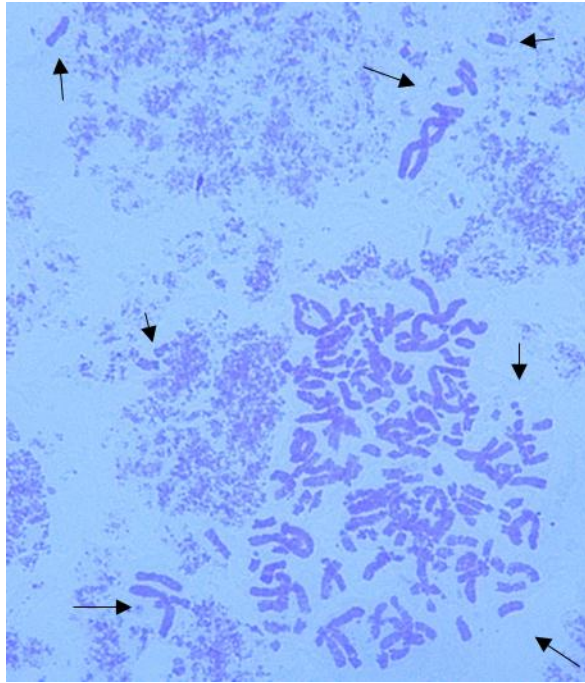


Figura 14. Célula en metafase tratamiento 4 (T4) de *Milla biflora*, expuesta a 0.4% de colchicina $25x=175$.

Respecto al tratamiento 5, (0.5% de colchicina), se observó $11x=77$, donde $x=7$. Figura 15.

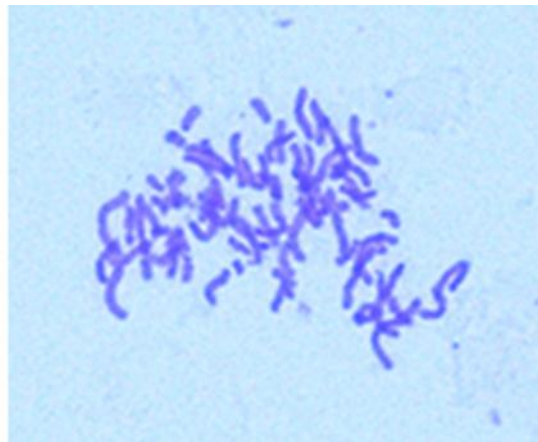


Figura 15. Célula en metafase tratamiento 5 (T5) de *Milla biflora* expuesto a 0.5% de colchicina, $11x=77$

Como se puede observar, la aplicación de colchicina produjo variaciones en el número de cromosomas de la célula, lo cual coincide con lo reportado por Molero *et. al.* (2018), quienes mencionan que, dependiendo de la dosis y el tiempo en que son expuestas, las células pueden mostrar diferentes números de cromosomas. Sánchez y Matos (2012), mencionan que una mayor concentración de colchicina y por un periodo más largo genera cambios a nivel morfológico de la planta que a su vez, repercute de igual forma en la obtención de mayor número de ploidía.

Por otro lado, en 2019 Gómez-Sanabria, realizó aplicación de colchicina en *Laelia autumnalis* y *Oncidium tigrinum* utilizando protocormos y semillas. En sus resultados, encontraron que en los protocormos se observó una reducción de tamaño lo que pudo deberse a que estos no tienen la testa que protege a las semillas, en las cuales, se presentó un mayor tamaño. Mientras que en 2020 Ferrer-Cervantes *et al* reportaron que en especies de *Polianthes* tratados con colchicina se presentó necrosis en los explantes correspondientes al tratamiento 0.2%, sin embargo, las plantas mostraron un 100% de supervivencia, por lo anterior, se asume que al realizar la aplicación de los tratamientos directamente en semilla, no sufrieron intoxicación en ninguna de las dosis aplicadas debido a la testa.

Salazar *et. al.*, (2018) observaron que en plantas de *Kalanchoe daigremontiana* tratadas con colchicina y que presentaron poliploidía tenían un mejor desarrollo morfológico, así como tamaño de planta al igual que un mayor número de hijuelos, en comparación con las plantas no tratadas. Por lo cual se infiere que en los individuos poliploides generados presenten estas características. En el presente estudio no se evaluó el fenotipo, sin embargo, se espera la existencia de cambios morfológicos debido a que el aumento del número de cromosomas que algunos tratamientos presentaron fue significativo.

Estudios previos mencionan que la poliploidía forma parte esencial en las plantas para su adaptación en el medio, por lo cual el que se hayan observado individuos poliploides quiere decir que es un indicador para la adaptación de esta especie en el medio, esperando que en un futuro se muestre en el fenotipo. Aunque, por otro lado, las especies que presentan poliploidía y originan cambios en el fenotipo pueden tener afectaciones el metabolismo y la regulación de genes en el desarrollo de la planta (Rodríguez *et. al.*, 2018). En algunos otros casos, cuando un cromosoma se involucra en una asociación múltiple, se forman gametos desequilibrados y la fertilidad se reduce (Ramsey y Schemske 2002). También en las plantas poliploides, las posibilidades de autofecundación y apomixis son mayores, por otro lado, también son más tolerantes al estrés, debido a que una mayor cantidad de enzimas dan una mayor flexibilidad y aumentan la capacidad adaptativa (Ranney, 2000).

VIII. CONCLUSIONES

La aplicación de colchicina en semillas de *Milla biflora*, muestra resultados positivos para la inducción de poliploidía.

Las dosis empleadas no muestran índices de mortalidad en el proceso de germinación de las semillas.

El horario conveniente para la recolección de raíces es a las 8:00 am, en el cual se permite un mayor número de células en metafase.

La hidrólisis de las raíces en HCl 1N durante 10 minutos en baño maría a 60°C muestra mayor efectividad en el rompimiento de pared celular en comparación de 8 minutos.

Se comprobó que el número de ploidía de *Milla biflora* es $6x=42$.

Las dosis de 0.2% y 0.4%, muestran mayor efectividad en el proceso de inducción de poliploidía.

IX. GLOSARIO

Cariotipo

Conjunto de los cromosomas de una célula de un individuo o de una especie, después del proceso en el que se unen por pares de cromosomas idénticos y se clasifican según determinados criterios.

Citogenética

Rama de la genética que estudia el material hereditario dentro de la célula. Análisis de la estructura, función y comportamiento del ADN que se condensa durante la división celular y forma los cromosomas.

Colchicina

Fármaco antimitótico que detiene o inhibe la división celular en metafase, y permite la realización del cariotipo.

Cormo

Tallos engrosados subterráneos, de ase hinchada y crecimiento vertical que contiene nudos y abultamientos de los que salen yemas, los cuales cumplen a función de órgano de reserva de nutrientes.

Cromosoma

Orgánulo en forma de filamento que se halla en el interior del núcleo de una célula eucariota y que contiene el material genético. El número de cromosomas es constante para células de la misma especie.

Fenotipo

Conjunto de caracteres visibles que un individuo presenta como resultado de la interacción entre su genotipo y el medio.

Genotipo

Conjunto de los genes que existen el núcleo celular de cada individuo.

Meristemo

Tejido joven o embrionario de los vegetales superiores que se halla en los lugares de crecimiento de la planta y está conformado por células que se dividen continuamente para originar otros tejidos.

Mutación

Cambio o modificación de algo.

Poliploidía

Variación o cambio en el número cromosómico característico de una especie.

Variación genética

Diferencia en el ADN entre los individuos. Existen múltiples fuentes de variación genética, incluyendo la mutación y la recombinación genética.

X. LITERATURA CITADA

Alcantár J. P. 2014. LA POLIPLOIDÍA Y SU IMPORTANCIA EVOLUTIVA. Temas de Ciencia y Tecnología. Vol. 18. 17-29.

Alderete M., Bologna P., Facciuto G., Hagiwara J.C., Kato A, Salvio E.A. (2007). *EL USO DE MUTÁGENOS EN EL MEJORAMIENTO DE GERMOPLASMA ORNAMENTAL NATIVO*. Revista Brasileña de Horticultura Ornamental, 13, suplemento.

Arroyo-Martínez H. 2014. *DETERMINACIÓN DEL CARIOTIPO EN TRES ESPECIES SILVESTRES DE Tigrídia spp.* [Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de México]. Repositorio Institucional. <http://hdl.handle.net/20.500.11799/65259>

Bridges, C., J, 1919. LA GENÉTICA DEL COLOR DE OJOS MORADO EN DROSOPHILA. Revista de zoología experimental. Vol. 28, Edición 2, 265-305. <https://doi.org/10.1002/jez.1400280205>.

Cavanilles, 1793. Icon. 2:76, plate 196.

Chase, M.W., Reveal, J.L. y Fay, M.f. 2009. *A SUBFAMILIAL CLASSIFICATION FOR THE EXPANDED ASPARAGALEAN FAMILIES AMARYLLIDACEAE, ASPARAGACEAE AND XANTHORRHOEACEAE*: APG III Botanical Journal of the Linnean Society 161:132-136

Código Postal 50737. S.f. MéxicoCodigo-postal.co. Recuperado el 1 de noviembre de 2022, de <https://codigo-postal.co/mexico/cp/50737/>.

De Bodt, S., Maere, S., Van de Peer, Y.V. 2005. *GENOME DUPLICATION AND THE ORIGIN OF ANGIOSPERMS. TRENDS IN ECOLOGY AND EVOLUTION*. Vol. 20. 591-597.

Espejo-Serna A. y López-Ferrari A. 2003. *FLORA DE VERACRUZ*. Xalapa, Veracruz, México: Instituto de Ecología, A. C.

Enciclovida. Mx. 2022. *MILLA BIFLORA*. Recuperado el 24 de abril 2022 de, <https://enciclovida.mx/especies/159249-milla-biflora>.

Ferrer-Cervantes M.J., Rodríguez-Domínguez, J.M., Barba-González, R., Castañeda-Saucedo M.C. y E. Tapia-Campos. 2020. *OBTAINING POLYPLOIDS IN WILD SPECIES OF THE GENUS POLIANTHES*. Ornamental Crops, Edición 1288, 65-69 (2020). doi 10.17660/ActaHortic.2020.1288.9

Futuyma, D.J. 2005. *EVOLUTION*. Tercera Edición. USA; Sinauer Associates Inc.

Gómez-Sanabria J. (2019). *INDUCCIÓN IN VITRO DE POLIPLOIDIA EN LAELIA AUTUMNALIS Y ONCIDIUM TIGRINUM, DOS ESPECIES NATIVAS DE MÉXICO*. [Tesis de Licenciatura, Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo]. Repositorio Institucional de la Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo. http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/2082

Gutiérrez, J., Terrazas, T., Hernández, L. y Martínez-Cabrera, D., 2022. *ANATOMÍA FLORAL DE LOS GÉNEROS DEL COMPLEJO MILLA (THEMIDACEAE)*. [en línea] Scielo.org.mx. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0366-21282010000200001> [Consultado el 23 de abril de 2022].

Gutiérrez, J. y Solano, E. 2015. *MILLA VALLIFLORA (THEMIDACEAE), A NEW SPECIES FROM SOUTHERN MÉXICO*. Brittonia 67:43-47

Herrera J.C. 2007. *LA CITOGENÉTICA MOLECULAR Y SU APLICACIÓN EN EL ESTUDIO DE LOS GENOMAS VEGETALES*. Agronomía Colombiana, 25(1), 26-35.

Liu G., Li Z. & Bao M. 2007. *COLCHICINE-INDUCED CHROMOSOME DOUBLING IN PLATANUS ACERIFOLIA AND ITS EFFECT ON PLANT MORPHOLOGY*. Euphytica, 157, 145–154 . doi 10.1007/s10681-007-9406-6

Jordan, MA y Wilson, L. 1999. *METHODS IN CELL BIOLOGY*. (Rieder, CL, Ed.), vol. 61, págs. 267–295

Lenz, L. W. 1971. *CHROMOSOME NUMBERS IN THE GENUS MILLA CAV. (LILIACEAE)*. *Aliso* 7:321-324.

Mapcarta. s/f. *BARRIO BUENAVISTA*. Recuperado el 1 de noviembre de 2022, de <https://mapcarta.com/es/30075582>.

Mercado libre. 2022. *Milla Biflora, Estrellita, 10 Semillas*. Recuperado 24 de abril 2022 de, https://articulo.mercadolibre.com.mx/MLM-957433819-milla-biflora-estrellita-10-semillas-sapc-_JM

Molero T., Vilorio M. & Vilorio E. (2018). *INDUCCIÓN DE POLIPLOIDÍA CON COLCHICINA EN VITROPLANTAS DE ALOE VERA (L.)*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, Vol. XX. No.1, 97-105.

Morejohn L. C., Bureau T. E., Lee P. T., and Fosket D. E. 1984. *TUBULINS FROM DIFFERENT HIGHER PLANT SPECIES ARE IMMUNOLOGICALLY NONIDENTICAL AND BIND COLCHICINE DIFFERENTIALLY*. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES*, 81 (5), 1440 - 1444.

Moore, H. E. Jr. 1953. *THE GENUS MILLA (AMARYLLIDACEAE-ALLIAE) AND ITS ALLIES*. *Gentes Herb.* 8:263-294

Murashige, T., y Skoog, F. 1962. *A REVISED MEDIUM FOR RAPID GROWTH AND BIOASSAYS WITH TOBACCO TISSUE CULTURES*. *Physiology Plant*, 15, 473-497.

Otto, S.P. 2007. *THE EVOLUTIONARY CONSEQUENCES OF POLYPLOIDY*. *CELL*. Vol. 131(3). 452-462.

Otto, S.P. y Whitton J. 2000. *POLYPLOID INCIDENCE AND EVOLUTION*. *Annual Review of Genetics*. Vol. 34. 401-437.

Planchas S, Glab N, Inzé D, Bergounioux C. 2000. *CHEMICAL INHIBITORS: A TOOL FOR PLANT CELL CYCLE STUDIES*. *FEBS Lett.* Vol. 476 (1-2) 78-83. doi: 10.1016/s0014-5793(00)01675-6.

Ramsey J., Schemske D. (2002). *NEO POLYPLOIDY IN FLOWERING PLANTS*. Annual Reviews in Ecology and Systematics. 33:589-639.

Ranney, T.G. 2000. *POLYPLOIDY: FROM EVOLUTION TO LANDSCAPE PLANT IMPROVEMENT. PROCEEDINGS OF THE 11TH TREE IMPROVEMENT ALLIANCE (METRIA)*. Gresham, Oregon, USA, August 23-24.

Rodríguez G, Segura S. D., Cruz S., Corona T., López J., Gutiérrez M. A., Cruz N. & Valenzuela L. M. 2018. *POLIPLOIDÍA EN ZARZAMORAS SILVESTRES (Rubus spp L.)*. Nova Scientia. Vol. 10. No. 21. Doi:102164/ns.v10i21.1385

Ryan, F.P. 2006. *GENOMIC CREATIVITY AND NATURAL SELECTION: A MODERN SYNTHESIS*. Biological Journal of the Linnean Society. Vol. 88. 655-672.

Rzedowski, G. C. de, J. Rzedowski y colaboradores, 2005. *FLORA FANEROGÁMICA DEL VALLE DE MÉXICO*. 2a. ed., 1a reimp., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán), 1406 pp.

Sánchez A., Matos A. 2012. *EFFECTOS DEL USO DE LA COLCHICINA COMO INDUCTOR DE POLIPLOIDÍA EN PLANTAS DE ZÁBILA (Aloe vera L.) IN VIVO*. Revista de la Universidad de Zulia. 3(6), 119-139.

Salazar M., S. A., Valderrama R., G. J., & Quintero C., J. D. 2018. *EFFECTO DE LA COLCHICINA SOBRE LA MORFOLOGÍA FOLIAR Y LOS ESTOMAS DE KALANCHOE DAINGREMONTIANA RAYM-HAMET & HPERRIER (CRASSULACEAE)*. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas, 12(1), 212–222. <https://doi.org/10.17584/rcch.2018v12i1.7059>.

Takii. Co. Jp. 2022. *MILLA BIFLORA*. Recuperado 24 de abril de 2022 de, <https://shop.takii.co.jp/products/detail/QHZ170>

Tapia-Pastrana F. 2013. *LOS ROMPIMIENTOS CROMOSÓMICOS Y TRANSLOCACIONES MODELAN EL CARIOTIPO TRIMODAL DE UNA POBLACIÓN HEXAPLOIDE DE MILLA BIFLORA (ASPARAGACEAE) DE LA RESERVA ECOLÓGICA DEL PEDREGAL DE SAN ÁNGEL, DISTRITO FEDERAL, MÉXICO*. Revista Mexicana de Biodiversidad 85:598-605.

Tellería J.L. 2013. PERDIDA DE BIODIVERSIDAD. CAUSAS Y CONSECUENCIAS DE LA DESAPARICION DE LAS ESPECIES. MEMORIAS R. SOC. ESP. Hist. Nat. 2ª ép. 10.

UNIVERSIDAD DE OVIEDO - UNIVERSIDAD DE OVIEDO, LA UNIVERSIDAD DE ASTURIAS. s. f.. Citogenética, Apuntes: 2 parte. Recuperado del 7 de mayo de 2022, de <https://www.unioviedo.es/A.Roca/citogenetica/apuntes2.pdf>

Urwin, N., 2014. GENERATION AND CHARACTERISATION OF COLCHICINE-INDUCED POLYPLOID LAVANDA X INTERMEDIA. Euphytica 197(3), 331-339. Doi: 10.1007/s10681-014-1069-5.

Verhoeven, HA, Sree Ramulu, K. & Dijkhuis, P. 2017. UNA COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS DE VARIAS TOXINAS DEL HUSO EN LA DETENCIÓN DE LA METAFASE Y LA FORMACIÓN DE MICRONÚCLEOS EN CULTIVOS DE SUSPENSIÓN CELULAR DE *NICOTIANA PLUMBAGINIFOLIA*. *Planta* 182, 408–414 (1990). <https://doi.org/10.1007/BF02411392>.