

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura

Licenciatura en Ciencias Biológicas

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

**Caracterización citogenética y reproductiva de poliploides impares en
Paspalum indecorum Mez. de importancia para el NEA**

ONETO, Camila Lucia

Directora: REUTEMANN, Anna Verena

Co-directora: KOVALSKY, Ivana Evelin

Laboratorio de Genética y Mejoramiento de Especies Forrajeras

IBONE-UNNE CONICET

2024

Contenido

Resumen	5
Introducción	6
Objetivos Generales	9
Objetivos Particulares.....	9
Hipótesis de Trabajo.....	9
Materiales y métodos	10
Material vegetal	10
Parentales.....	10
Cruzamientos y obtención de progenies	10
Progenie	11
Fertilidad, germinación y supervivencia de la progenie	12
Análisis de la microsporogénesis	12
Determinación de la viabilidad de polen y estimación de su ploidía	12
Determinación de niveles de ploidía de la progenie	13
Recuentos cromosómicos	13
Citometría de Flujo para estimación de contenido de ADN	14
Determinación del origen reproductivo de la progenie.....	14
Citometría de Flujo de semillas (FCSS)	14
Prueba de progenie con marcadores moleculares.....	14
Resultados.....	17
Fertilidad, germinación y supervivencia de la progenie	17
Análisis de la microsporogénesis	19
Viabilidad del polen y estimación de su ploidía.....	23
Análisis del tamaño de los granos de polen.....	23
Determinación de niveles de ploidía de la progenie	26
Conteos cromosómicos	26
Citometría de Flujo para estimación de contenido de ADN	27
Determinación del origen reproductivo de la progenie.....	28
Citometría de Flujo de semillas (FCSS)	28
Prueba progenie con ISSRs	28
Discusión	30
Conclusiones	34
Bibliografía.....	35

Índice de Tablas

Tabla 1. Poblaciones de <i>Paspalum indecorum</i> utilizadas como parentales.	10
Tabla 2. Cruzamientos y familias resultantes en <i>Paspalum indecorum</i>	11
Tabla 3. Cebadores utilizados para determinar el origen reproductivo de la progenie.	15
Tabla 4. Fertilidad estimada con el índice de hibridación (<i>H</i>), germinación (<i>G</i>) y supervivencia (<i>L</i>) de la progenie obtenida de cada familia.	17
Tabla 5. Porcentaje de Anormalidades observadas por fase meiótica en las 3212 células madre del polen analizadas.	19
Tabla 6. Anormalidades meióticas observadas en cada fase de la microsporogénesis.	20
Tabla 7. Configuraciones cromosómicas en la meiosis masculina <i>Paspalum indecorum</i> triploide.	22
Tabla 8. Medidas de Resumen del diámetro de los granos de polen de <i>Paspalum indecorum</i>	23
Tabla 9. Variaciones del tamaño de los granos de polen del citotipo triploide, y su frecuencia absoluta, relativa y acumulada.	24
Tabla 10. Variaciones del tamaño de los granos de polen del citotipo diploide, y su frecuencia absoluta, relativa y acumulada.	24
Tabla 11. Números cromosómicos observados en las progenies sobrevivientes dentro de cada Familia.	26
Tabla 12. Estimación de los niveles de ploidía de las progenies por citometría de flujo.	27

Índice de figuras

Figura 1. Material vegetal utilizado. A. Una de las plantas parentales correspondientes al genotipo H1729 #9 (citotipo triploide). B. A la izquierda, progenie F ₁ E; a la derecha, progenie F ₁ A. C. Progenie obtenida de los cruzamientos intercitotípicos post ataque de arañuela. Las letras encima de las líneas indican a que familia pertenecen. D. Progenie obtenida de los cruzamientos previo al ataque por arañuela.	11
Figura 2. Gráfico de cajas con los valores observados en los cruzamientos donde el citotipo triploide se usó como planta madre. <i>Referencias</i> : las cajas indican el primer (Q1), segundo (Q2) y tercer cuartil (Q3). El segundo cuartil (Q2) es la Mediana de la muestra. La equis (x) dentro de las cajas indica la media de la muestra. Los bigotes se corresponden a tres desvíos estándar.	18
Figura 3. Numero de progenies obtenidas (NPT) y sobrevivientes (NPS) de cada familia al inicio y fin de cuatro semanas. <i>Referencias</i> : Familia A, triploide como padre; Familias B-E, triploide como madre; Familia F, control positivo.	18
Figura 4. Porcentajes de hibridación intercitotipo (<i>H</i>), germinación (<i>G</i>) y supervivencia (<i>L</i>) de las progenies obtenidas en cada cruzamiento realizado y el control positivo. <i>Referencias</i> , se presentan los valores promedio para el triploide como madre. Para el triploide como padre y polinización abierta se presenta el único valor observado.	19
Figura 5. Porcentajes de células madres del polen (CMPs) normales y anormales en cada fase de la meiosis de <i>Paspalum indecorum</i> triploide.	20
Figura 6. Observaciones de anormalidades meióticas en diferentes fases en el citotipo triploide. A. Paquiteno, célula madre del polen con dos nucléolos. B. Metafase I con migración precoz de	

cromosomas. C-E. Anafase I, destacando cromosomas rezagados (C), cromosomas pegajosos (D), y un puente anafásico con cromosomas pegajosos (E). F-H. Profase II (F) y Telofase II (H) presentan micronúcleos y cromosomas pegajosos. En Metafase II (G) se muestra migración precoz de cromosomas. I-J. Tétradas con citocinesis anormal, micronúcleos y cromosomas rezagados (I). *Referencias:* los puntos rojos indican la presencia de micronúcleos, mientras que los puntos azules marcan cromosomas rezagados. Escala: 10 μm . 22

- Figura 7. Configuración cromosómica observada durante la profase I en *Paspalum indecorum*, donde se observan 8 trivalentes (III), 2 bivalentes (II), y 2 univalentes (I). *Referencias:* Las flechas indican la posición de los univalentes. Escala: 10 μm 23
- Figura 8. Granos de polen viables (coloreados) y no viables (flecha negra). Escala: 25 μm . 23
- Figura 9. Diferencias de tamaño entre los granos de polen del citotipo triploide de *P. indecorum*. A. El diámetro del grano de polen es 12,9 μm . B. El diámetro del grano de polen es 18,5 μm . Escala: 10 μm . 24
- Figura 10. Distribución de frecuencias absolutas y porcentaje acumulado del tamaño de granos de polen del citotipo triploide. 25
- Figura 11. Distribución de frecuencias absolutas y porcentaje acumulado del tamaño de granos de polen del citotipo diploide. 25
- Figura 12. Gráfico de cajas indicando la distribución del tamaño de los granos de polen de los citotipos diploide y triploide de *P. indecorum*. *Referencias:* las cajas indican el primer (Q1), segundo (Q2) y tercer cuartil (Q3). El segundo cuartil (Q2) es la Mediana de la muestra. El cuadrado dentro de las cajas indica la media de la muestra. Los bigotes se corresponden a tres desvíos estándar. Los círculos fuera de los bigotes indican valores extremos (*outliers*). 26
- Figura 13. Histograma del contenido relativo de ADN obtenido por citometría de flujo para determinar los niveles de ploidía en progenies de *Paspalum indecorum*. A. Histograma correspondiente a progenie diploide ($2n= 2x$) de la Familia F. B. Histograma correspondiente a progenies triploides ($2n= 3x$) de la Familia F. C. Histograma correspondiente a progenie tetraploide ($2n= 4x$) de la Familia E. D. Histograma correspondiente a progenie pentaploide ($2n=5x$) de la Familia E. E. Histograma correspondiente a progenie hexaploide ($2n=6x$) de la Familia F. 27
- Figura 14. Análisis de Coordenadas Principales (PcoA) de las Familias obtenidas de los cruzamientos heteroploides de *P. indecorum*. *Referencias:* I1, familia A, donde el citotipo triploide actuó como dador de polen. I2, Familias B, C, E y F, donde el citotipo triploide actuó como planta madre. Las letras indican a que familia pertenecen las progenies. Las plantas P8 y P9 son los parentales maternos H1726 #8 ($2x$) y H1726 #9 ($3x$), respectivamente. 29

Resumen

La poliploidía en las angiospermas es un proceso evolutivo clave que permite su diversificación y adaptación mediante la duplicación de genomas completos. A menudo, se asocia con cambios en los sistemas reproductivos, como la autofertilidad o la apomixis, que brindan ventajas para el establecimiento de nuevas poblaciones o la expansión de las mismas a través de la reproducción uniparental. El género *Paspalum* se caracteriza por presentar diploides de reproducción sexual, y poliploides apomícticos. *Paspalum indecorum* Mez es una especie de interés forrajero, que incluye citotipos diploides ($2n=2x=20$), sexuales y autoestériles, y triploides ($2n=3x=30$) apomícticos facultativos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el rol de los citotipos triploides en la formación de complejos agámicos poliploides en el género, a través de la caracterización de la microsporogénesis y viabilidad de polen, su capacidad de hibridación con citotipos diploides y la obtención de progenie, identificando su nivel de ploidía y origen reproductivo mediante el uso de citometría de flujo y pruebas de progenie con marcadores moleculares ISSRs. El análisis de la microsporogénesis del citotipo triploide mostró que la mayoría de las células madre del polen (PMCs) presentaron una configuración cromosómica de $8III+2II+2I$ y $10III$, confirmando el origen autopoliploide de este citotipo. Además, se observó una alta frecuencia de irregularidades meióticas tanto en la meiosis I como II (74,1%), sin embargo, la viabilidad del polen fue elevada (93%). Al analizar el tamaño de los granos de polen para estimar la frecuencia de formación de gametos no reducidos ($2n=3x$) vs. reducidos ($n=x$ o $n=2x$) se observó que un 0,9% de los granos eran no reducidos ($2n=3x$). Los índices de hibridación, germinación y supervivencia fueron mayores cuando se utiliza al citotipo triploide como dador de polen en comparación a cuando actúa como parental materno (en promedio). Del análisis por citometría de los niveles de ploidía de las progenies obtenidas, se observó descendientes con niveles de ploidía mayores, como tetraploides, pentaploides y hexaploides en muy baja frecuencia. Sin embargo, la mayor parte de la progenie analizada mediante citometría de flujo y marcadores moleculares ISSRs resultó diploide y de origen sexual, lo que indica que tanto los gametos femeninos como masculinos euploides reducidos ($n=x$) son funcionales y contribuyen a la formación de nuevos individuos diploides. Además, el análisis de citometría de flujo de semillas reveló que algunos gametos femeninos euploides reducidos ($n=2x$) del triploide son funcionales, dando lugar a progenie triploide. También se observó en menor proporción la formación de tetraploides, pentaploides y hexaploides, indicando el rol de las gametas no reducidas ($2n=3x$) en la formación progenie de ploidías mayores. En conclusión, se puede indicar que los triploides de *Paspalum indecorum* desempeñan un rol crucial en la reciente poliploidización unilateral de la especie, ya que mediante el puente triploide, facilitan la formación de nuevos individuos triploides y ploidías mayores.

Palabras clave: apomixis, citoembriología, citometría de flujo, ISSR, poliploidía impar, puente triploide.

Introducción

La poliploidía, definida como la duplicación completa del genoma, es considerada uno de los mecanismos principales de especiación en las angiospermas (Jiao *et al.*, 2011; Ren *et al.*, 2018). Se han descubierto múltiples eventos de poliploidización durante la historia evolutiva de las angiospermas, y muchos de ellos ligados a la adquisición de innovaciones clave que facilitaron la diversificación (e.g. semillas y estructuras florales; Jiao *et al.*, 2011; Soltis & Soltis, 2016; Ren *et al.*, 2018). Generalmente, los poliploides se clasifican en autopoliploides y alopoliploides según un criterio taxonómico o sistemático, dependiendo del origen de los gametos que participan en su formación (Ramsey & Schemske, 1998; Soltis *et al.*, 2007). Si estos gametos provienen de individuos de la misma especie se consideran autopoliploides, y si provienen de especies diferentes se denominan alopoliploides (Soltis *et al.*, 2004; Soltis & Soltis, 2016).

Existen dos mecanismos frecuentes a través de los cuales se pueden originar poliploides, la poliploidización sexual bilateral y la unilateral (Ramsey & Schemske, 1998). La formación inicial de un neopoliploide dentro de una población diploide por la vía unilateral generalmente involucra un puente triploide, un mecanismo de dos pasos que consiste en fusiones celulares entre gametos frecuentes (reducidos, n) e infrecuentes (no reducidos, $2n$). En este proceso, los diploides generan un individuo triploide, el cual, mediante retrocruzamiento o autopolinización, da origen a un neotetraploide (Ramsey & Schemske, 1998; Kovalsky *et al.*, 2012; Hojsgaard, 2018). Sin embargo, muchos de los gametos producidos por autotriploides no son funcionales, porque poseen un número de cromosomas desequilibrado (*i.e.* aneuploides, Ramsey & Schemske, 1998). No obstante, los triploides generan un pequeño porcentaje de gametos euploides reducidos ($n=x$ y $n=2x$) (Ramsey & Schemske, 1998) y también pueden producir gametos $3x$ por no reducción o apomeiosis ($2n=3x$, Ramsey & Schemske, 1998; Hojsgaard, 2018). Mediante la poliploidización bilateral, los neopoliploides resultan de la unión de dos gametos no reducidos ($2n$) de la población diploide parental (al ser diploides los gametos no reducidos son $2n=2x$, Ramsey & Schemske, 1998; Kovalsky *et al.*, 2012). Por ende, ambas vías de poliploidización dependen de la frecuencia en la que se forman los gametos no reducidos ($2n$) en las poblaciones parentales diploides ($2n=2x$), y en el caso de la poliploidización unilateral, también de los neotriploides ($2n=3x$).

La poliploidía está asociada frecuentemente con cambios en los modos reproductivos, como la autocompatibilidad (*i.e.* autofertilidad) o la apomixis (Hojsgaard & Hörandl, 2019; Siopa *et al.*, 2020). Estos cambios facilitan el establecimiento y perpetuación de los neopoliploides en las poblaciones diploides parentales, evitando el bloqueo triploide (*i.e.* inviabilidad y/o esterilidad de los triploides, que dificulta la poliploidización unilateral, Ramsey & Schemske, 1998) y las desventajas de ser un citotipo minoritario (*i.e.* selección negativa frecuencia-dependiente por apareamientos ineficaces con progenitores diploides, Levin, 1975).

La apomixis es un modo de reproducción que origina progenie genéticamente idéntica a la planta madre mediante semillas (Asker & Jerling, 1992). Este mecanismo evita la recombinación en la meiosis y la fecundación de la oófera (Asker & Jerling, 1992). Existen dos tipos de apomixis, esporofítica y gametofítica (Nogler, 1984). En la apomixis esporofítica, los embriones se desarrollan directamente de células somáticas (Nogler, 1984). Por otro lado, en la apomixis gametofítica, los sacos embrionarios no

reducidos dan lugar a embriones mediante partenogénesis (Nogler, 1984). En la apomixis gametofítica, la formación de las semillas puede requerir (*i.e.* pseudogamia) como no (*i.e.* autónomo) la fecundación de la célula central del saco embrionario para dar origen al endospermo (Asker & Jerling, 1992). No obstante, la apomixis y la sexualidad no son procesos mutuamente excluyentes. Pueden ocurrir simultáneamente en la misma planta e incluso en el mismo óvulo, dando origen a individuos apomícticos facultativos o con sexualidad residual (Nogler, 1984; Reutemann *et al.*, 2022a). Por lo general, las especies apomícticas mantienen una estrecha relación con su contraparte sexual, formando un complejo agámico (Stebbins, 1950). En estos complejos, los biotipos sexuales y apomícticos difieren en sus niveles de ploidía (*i.e.* subtipo de complejo poliploide, Stebbins, 1950). En la mayoría de los casos, los diploides son sexuales y los poliploides son apomícticos (Hojsgaard & Pullaiah, 2023).

El género *Paspalum* L., perteneciente a la familia Poaceae, abarca cerca de 330 especies (Zuloaga & Morrone, 2005). Está ampliamente distribuido en las regiones tropicales y subtropicales de América, y su centro de origen está en la zona tropical de América del Sur (Chase, 1929; Nicora & Rúgolo de Agrasar, 1987; Judziewicz, 1990). Sin embargo, también se han identificado centros secundarios de diversidad en los cerrados de Brasil y en los campos de Argentina, Uruguay y sur de Brasil (Zuloaga & Morrone, 2005). La diversidad ecológica presente en este género podría estar relacionada con la variedad de estrategias reproductivas y los diferentes niveles de ploidía observados intra- e inter-específicamente (Quarin, 1992). El número cromosómico básico del género es $x=10$ y existen desde citotipos diploides hasta hexadecaploides (Quarin, 1992). La poliploidía es un fenómeno significativo en *Paspalum*, estos a menudo exhiben características adaptativas adicionales, como los sistemas reproductivos uniparentales, autogamia (*i.e.* autofertilidad) y apomixis. En *Paspalum*, se pueden encontrar tanto autopoliploides, derivados normalmente de un proceso de poliploidización unilateral mediante un puente triploide, como alopoliploides derivados de la hibridación interespecífica (Quarin, 1992). Normalmente, los autopoliploides son apomícticos facultativos y los alopoliploides son sexuales (Quarin, 1992). En *Paspalum* existen diferentes sistemas genéticos, siendo los complejos poliploides agámicos compuestos por diploides sexuales autoestériles y tetraploides apomícticos facultativos autofértiles los más estudiados hasta la fecha (Ortiz *et al.*, 2013).

Dentro del género, en el grupo informal Caespitosa, se encuentra la especie *Paspalum indecorum* Mez (Zuloaga & Morrone, 2005). Esta especie se distribuye principalmente en suelos rocosos y basálticos de la provincia de Misiones, Argentina (Zuloaga & Morrone, 2005; Reutemann *et al.*, 2022a). Es una especie que posee citotipos diploides ($2n=2x=20$) que son sexuales y autoestériles, y triploides ($2n=3x=30$) apomícticos facultativos autoestériles (Reutemann *et al.*, 2022a). La descripción del citotipo triploide es reciente, lo que introduce un aspecto interesante para el estudio de la poliploidización unilateral en el género, y de cómo la apomixis podría influir en la adaptabilidad y establecimiento de este citotipo, y de cómo podría influir en la formación de un nuevo complejo poliploide agámico en el género. Dado que en *Paspalum* la presencia de triploides está asociada a la autopoliploidización mediante un puente triploide, podría esperarse que de este citotipo triploide se generen neotetraploides apomícticos para esta especie. Sin embargo, los poliploides impares, como los triploides, presentan características reproductivas y meióticas únicas que generan irregularidades en la meiosis y afectan su capacidad para formar gametos euploides viables (revisado en Ramsey & Schemske, 2002; Hojsgaard, 2018). A su vez, si estos forman progonie, estas suelen ser aneuploides o pseudo-euploides en su mayoría, presentando caracteres

fisiológicos y reproductivos drásticamente alterados (Ramsey & Schemske, 2002). Sin embargo, los triploides apomícticos evaden la meiosis en la formación de sus gametos femeninos, ofreciendo una oportunidad para investigar cómo la apomixis podría reestablecer la fertilidad en poliploides impares contribuyendo a la formación de nuevos poliploides dentro de una población diploide (Hojsgaard, 2018).

Esta tesis tiene como objetivo explorar cómo la poliploidía impar en *Paspalum indecorum* influye en la microsporogénesis, la viabilidad del polen y la formación de progenie en cruzamientos recíprocos con diploides de la especie, para entender como la poliploidía combinada con apomixis puede influir en el establecimiento de nuevos complejos poliploides agámicos en el género.

Objetivos Generales

Caracterizar citogenética y reproductivamente a poliploides naturales del género *Paspalum*.

Objetivos Particulares

1. Analizar la microsporogénesis y viabilidad del polen de triploides naturales de *Paspalum indecorum*.
2. Analizar la fertilidad de semillas en triploides naturales de *Paspalum indecorum* obtenidas a partir de cruzamientos intraespecíficos e intercitotipo.
3. Determinar el origen reproductivo de las progenies generadas a partir de las semillas obtenidas en cruzamientos intraespecíficos e intercitotipo de *Paspalum indecorum*.

Hipótesis de Trabajo

1. Los genotipos triploides de *P. indecorum* se comportan como autopoliploides, con meiosis irregular y formación de micrósporas con diferentes números cromosómicos, y, por lo tanto, la viabilidad del polen es baja.
2. La fertilidad en los genotipos triploides de *P. indecorum* es similar a sus contrapartes diploides sexuales.
3. Las progenies que se generan en los cruzamientos intraespecíficos e intercitotipo de los triploides de *P. indecorum* son de origen apomítico.

Materiales y métodos

Material vegetal

Parentales

Las accesiones utilizadas como progenitores en este estudio se encuentran en la Tabla 1, junto con sus números cromosómicos, legajo, localidades de colección, y el herbario donde se depositaron los ejemplares. Los números cromosómicos y la procedencia de las plantas empleadas fueron obtenidos previamente por Reutemann *et al.* (2022a).

Tabla 1. Poblaciones de *Paspalum indecorum* utilizadas como parentales.

Población	2n	Procedencia
H1726	20, 30	A. Mnes. Candelaria, camino a Santa Ana. S 27.403544; W. 55.590077. MNES
H1701	20	A. Mnes. Candelaria. Bonpland. S 27.465667; W 55.429555. MNES
H1870	20	A. Mnes. Candelaria, Reserva Campo San Juan. S 27.403619; WO 55.651694. MNES
H2058	20	A. Mnes. Cainguás, a 18 km de San Vicente, vía a Salto Golondrina. S 27.1285; W 54.489889. MNES

Referencias: H: identificador de la población correspondiente al apellido del colector (Honfi, Ana I.); 2n, número somático de cromosomas; A. Argentina; Mnes: Misiones; MNES: Herbario de la Universidad Nacional de Misiones.

Se empleó como parental cuatro plantas correspondientes a un genotipo triploide de la población H1726 (Planta #9 de la población, Figura 1A) identificado previamente con sacos embrionarios meióticos y apospóricos, y con autoesterilidad (Reutemann *et al.*, 2022a). Además, se utilizaron genotipos diploides provenientes de las cuatro poblaciones con sacos embrionarios meióticos y apospóricos en distintas proporciones (Reutemann *et al.*, 2022a). Con estos parentales se diseñaron tres ensayos de cruzamientos (Tabla 2).

Cruzamientos y obtención de progenies

Las cuatro plantas triploides se usaron como madre en cuatro cruzamientos intraespecíficos con individuos diploides (♀ triploide × ♂ diploide) y también como dadores de polen en dos cruzamientos con plantas diploides actuando como madres (♀ diploide × ♂ triploide) (Tabla 2).

En los parentales masculinos, el polen se recolectó en sobres de papel sulfito durante el día de la antesis. Estos sobres se colocaron sobre inflorescencias en antesis de las plantas madres, y se agitaron delicadamente para forzar la polinización. En los parentales maternos, las inflorescencias se ensobraron la tarde anterior a la antesis. A la mañana siguiente, se removieron los sobres y se le colocaron los sobres con polen previamente colectado de los parentales masculinos. Las inflorescencias polinizadas se ensobraron hasta la mañana siguiente para repetir el proceso hasta completar la antesis de todas las espiguillas. En algunos casos, se usaron dos dadores de polen para asegurar la polinización completa de todas las espiguillas (e.g. Familias E y B; Tabla 2). A los 20-30 días se cosecharon los sobres con las inflorescencias y se secaron en estufa a 37 °C por al menos 24 h. Se utilizó como control negativo a inflorescencias de los triploides en autopolinización, ya que al ser una especie autoestéril (sistema de

autoincompatibilidad gametofítica) no se esperaba producción de semillas. Como control positivo se realizó un ensayo de polinización abierta a campo de la planta triploide, realizado en el campo experimental de la FCA-UNNE.



Figura 1. Material vegetal utilizado. **A.** Una de las plantas parentales correspondientes al genotipo H1729 #9 (citotipo triploide). **B.** A la izquierda, progenie F_1E ; a la derecha, progenie F_1A . **C.** Progenie obtenida de los cruzamientos intercitotípicos post ataque de arañuela. Las letras encima de las líneas indican a que familia pertenecen. **D.** Progenie obtenida de los cruzamientos previo al ataque por arañuela.

Progenie

Se analizaron progenies (Figura 1B-C) de cruzamientos intraespecíficos heteroploides de *Paspalum indecorum* ($2n=3x=30$) con individuos diploides ($2n=2x=20$). Cada cruzamiento fue identificado con una letra específica para facilitar su referencia (Tabla 2). Solo se incluyeron aquellos cruzamientos donde se obtuvieron carióspsides.

Tabla 2. Cruzamientos y familias resultantes en *Paspalum indecorum*

Cruzamiento	Madre ♀	Padre ♂	Familia
Triploide como dador de polen			
	H1726#8 (2x)	H1726#9 (3x)	A
	H1701#9 (2x)	H1726#9 (3x)	G
Triploide como madre			
	H1726#9 (3x)	H1726#8 (2x)	C
	H1726#9 (3x)	H1701#9 (2x)	D
	H1726#9 (3x)	H2058#7 (2x) y #8 (2x)	E
	H1726#9 (3x)	H2058#4 (2x) y H1870#7 (2x)	B
Polinización abierta			
	H1726#9 (3x)	-	F

Referencias: 2x: diploide, 3x: triploide, #: número de identificación del individuo en la población.

Las cariósides obtenidas de estos ensayos de polinización cruzada y abierta se utilizaron para evaluar los niveles de ploidía y el origen reproductivo, ya sea de las semillas o del material vegetal (láminas foliares o raíces) proveniente de las plantas obtenidas de los ensayos de germinación.

Fertilidad, germinación y supervivencia de la progenie

La fertilidad se estimó como el porcentaje de hibridación heteroploide de cada cruzamiento. Este porcentaje se calculó como $H = (NC/NT) * 100$, donde NC es el número de espiguillas con cariósida desarrollada y NT es el número total de espiguillas polinizadas de la inflorescencia.

De las cariósides obtenidas, se sembraron un mínimo de 30 semillas por cruzamiento, siempre que el número de cariósides lo permitiera. En cruzamientos con menos de 30 cariósides, se sembraron todas las semillas disponibles. La siembra se realizó en terrinas con sustrato estéril y las plántulas obtenidas se cultivaron en maceta bajo invernáculo, hasta obtener hojas suficientes para la extracción de ADN. Se determinó el porcentaje de germinación como $G = (NSG/NST) * 100$, donde NSG es el número de semillas germinadas y NST el número total de semillas puestas a germinar. Esto se realizó en cada combinación ♀3x x ♂2x y ♀2x x ♂3x y en el ensayo de polinización abierta de la planta triploide. Una vez obtenidas las plántulas, se contabilizó el número de individuos que llegaron a un estado de desarrollo BBCH 3 (alargamiento de macollos, Meier *et al.*, 2009) para estimar la supervivencia de las plantas, esto se determinó como $L = (NPS/NPT) * 100$, donde NPS es el número de plantas que superaron el estadio BBCH 3 y NPT el número de plantas total obtenidas en el ensayo de germinación.

Análisis de la microsporogénesis

La meiosis masculina se analizó en inflorescencias inmaduras del citotipo triploide fijadas en etanol absoluto-ácido acético glacial (3:1) durante 24 h. Estas inflorescencias se conservaron en etanol 70% hasta su uso. Para observar las células madre del polen (CMP), se realizaron incisiones transversales en las anteras, que luego se maceraron en una gota de carmín acético al 2%. Los preparados permanentes se realizaron utilizando Terpentina de Venecia. Se analizaron más de 3000 CMPs cubriendo todas las fases de la meiosis I y II, y se registraron todas las anomalías observadas en cada fase siguiendo la clasificación de Ziegler *et al.* (2024). Además, se observó el apareamiento de los cromosomas durante la diacinesis y metafase I en al menos 30 CMPs, para determinar las configuraciones cromosómicas más frecuentes. Las observaciones se llevaron a cabo con un microscopio Leica DM RB (Leica Systems GmbH, Alemania), y las imágenes se obtuvieron con una cámara LEICA DMC2900 (Leica Systems GmbH, Alemania).

Determinación de la viabilidad de polen y estimación de su ploidía

La viabilidad del polen se evaluó mediante el método de coloración con carmín glicerina (1:1) en inflorescencias fijadas en antesis del citotipo triploide en etanol absoluto-ácido acético glacial (3:1). Se contabilizó un mínimo de 1000 granos de polen por inflorescencia, para determinar la proporción de polen viable (coloreados) y no viable (incolores). El polen viable se identificó por la presencia de un citoplasma uniformemente coloreado de un rojo intenso, mientras que el polen viable mostró un citoplasma no coloreado y/o colapsado.

La estimación de la ploidía de los granos de polen se realizó midiendo su tamaño. Para ello, se midieron los diámetros a lo ancho y largo de cada grano de polen utilizando el software ImageJ (<https://imagej.net/ij/>; Rasband, 1997). Dado que los granos de polen en *Paspalum* presentan un solo opérculo y son esféricos, se consideró esta característica para la medición. Para identificar los granos de polen euploides no reducidos ($2n=3x$), se usaron dos técnicas, primero se comparó el tamaño de los granos de polen de individuos diploides de *P. indecorum* con el de individuos triploides, utilizando una prueba T en Infostat (<https://www.infostat.com.ar/>). Para representar las diferencias en tamaño entre los dos citotipos se representó la distribución de los datos mediante un gráfico de cajas, realizado con Infostat. Además, se construyó un rango de intervalos para los tamaños de los granos de polen del citotipo triploide, y se calculó la frecuencia absoluta, relativa y relativa acumulada de cada rango de tamaño. Luego, se comparó el histograma de frecuencias de los tamaños de los granos de polen del citotipo triploide con la distribución normal mediante una prueba de Shapiro-Wilks en Infostat.

En la segunda técnica, los granos de polen viables se clasificaron en cuatro categorías según su tamaño: pequeños ($<n$), normales (n), grandes ($2n$) y jumbo ($4n$), siguiendo lo descrito por Kovalsky *et al.* (2018) y García *et al.* (2020). El polen normal se consideró para determinar el diámetro promedio del polen de cada citotipo, donde los granos de polen euploides (normales) en diploides son $n=x$, y los granos de polen euploides (normales) de los triploides son $n=x$ o $n=2x$. Los granos de polen grandes en los diploides se corresponden a gametos euploides no reducidos $2n=2x$ y en los triploides a gametos euploides no reducidos $2n=3x$. Los granos de polen jumbo, en los diploides se consideraron como $4n=4x$, y en los triploides como $4n=6x$. Los granos de polen con un tamaño 0,25 veces menor que el tamaño promedio de los individuos se consideraron polen pequeño (probablemente aneuploides). El polen no reducido se detectó siguiendo a Darlington (1937): los granos de polen que mostraban un tamaño 1,25 veces mayor que el tamaño promedio de los individuos se consideraron granos grandes $2n$ (no reducidos, en los triploides $2n=3x$), mientras que los granos profundamente teñidos que mostraban un tamaño 1,5 veces mayor que el tamaño promedio de los individuos se consideraron granos grandes $4n$ (polen jumbo, en triploides $4n=6x$).

Determinación de niveles de ploidía de la progenie

Recuentos cromosómicos

La determinación del número cromosómico y el nivel de ploidía de la progenie obtenida se llevó a cabo en células del meristema radicular. Para ello, los ápices radicales se pretrataron con solución saturada de α -bromonaftaleno durante 3 h. Posteriormente, se fijaron en una solución de etanol absoluto: ácido acético (3:1) por al menos 1 h, y se almacenaron en etanol 70% en heladera a 4 °C hasta su utilización. Se realizó la tinción convencional de Feulgen (Feulgen & Rossenbeck, 1924). Para ello, las raicillas se hidrolizaron con ácido clorhídrico 1N por 10 min a 60 °C en baño termostático, y luego se tiñeron con el reactivo de Schiff. Una vez lograda la tinción, las raicillas se maceraron con orceína acética al 2%, empleada como coloración de contraste, y se observaron los preparados en un microscopio óptico LEICA DMRB (Leica Systems GmbH, Alemania). Las fotografías se tomaron con una cámara LEICA DMC2900 (Leica Systems GmbH, Alemania). Los conteos cromosómicos mitóticos se realizaron únicamente en los individuos que sobrevivieron al estadio BBHC 3.

Citometría de Flujo para estimación de contenido de ADN

Se analizó la ploidía de todos los individuos que superaron el estadio de plántula, mediante medición del contenido relativo de ADN por citometría de flujo (Galdeano *et al.*, 2016). Para este procedimiento, se utilizaron hojas frescas, seleccionándose la porción media de las láminas foliares. Las muestras se colocaron en una caja de Petri con 0,5 ml de solución de extracción Otto I, y fueron picadas manualmente con bisturí. Se dejaron reposar en el buffer de extracción por 1 min, y luego, se filtraron con mallas de 30 μm . Al filtrado obtenido se le añadieron 1,5 ml de solución de coloración Otto II. Para la coloración del ADN nuclear se utilizó DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) como fluorocromo. El contenido relativo de ADN se estimó comparativamente utilizando un estándar externo diploide de la especie. Las mediciones se realizaron con un citómetro Cyflow Space (Sysmex Partec GmbH, Alemania), y los histogramas se analizaron con el software FloMax Software 2.0 (Quantum Analysis GbmH, Alemania). Se hicieron *pools* de hasta cinco individuos por muestra. En aquellos casos en que se detectó más de un pico, las plantas se analizaron de forma individual.

Determinación del origen reproductivo de la progenie

Citometría de Flujo de semillas (FCSS)

La determinación del origen reproductivo de las progenies mediante citometría de flujo solo se realizó exclusivamente en las familias B y F, debido al alto número de cariósides disponibles ($n > 30$). Se analizaron 31 semillas para evaluar el contenido relativo de ADN del embrión y el endospermo de cada semilla. Para ello, se procesaron manualmente grupos de 2 semillas en 0,5 ml de buffer de extracción Otto I utilizando un bisturí. Posteriormente, el material se filtró con mallas de nylon de 30 μm y se transfirió a un tubo con 1,5 ml de buffer de tinción Otto II, dejándolo reposar durante 5 min. El análisis se realizó con un citómetro Cyflow Space (Sysmex Partec GmbH, Alemania) y el software FloMax Software 2.0 (Quantum Analysis GbmH, Alemania).

Según las diferencias en el contenido relativo de ADN entre el embrión y el endospermo fue posible determinar el origen reproductivo de las semillas (sexual o apomíctico). Dependiendo de si los sacos embrionarios que originaron la semilla eran cromosómicamente reducidos o no, y de si la célula central y/o la ovocélula fueron fertilizadas (por gametos masculinos reducidos o no), diferentes niveles de ploidía pueden esperarse en la relación embrión: endospermo (ver Matzk *et al.*, 2000). Las semillas de origen sexual tienen embriones $2n$ ($n+n$; 2C) y endospermo $3n$ [$(n+n)+n$; 3C], provenientes de la doble fecundación, de la ovocélula y los núcleos polares, respectivamente, por dos gametos masculinos reducidos. Las semillas de origen apomíctico poseen un embrión $2n$ ($2n+0$, 2C) proveniente del desarrollo partenogénico de la ovocélula, y endospermo $5n$ [$(2n+2n)+n$, 5C] producto de la fecundación de los dos núcleos polares no reducidos por un gameto masculino reducido (pseudogamia). Como estándares externos, se emplearon un genotipo triploide y uno diploide.

Prueba de progenie con marcadores moleculares

Además del análisis mediante FCSS, se llevó a cabo una prueba de progenie para determinar el origen apomíctico (clonal) o sexual de las plantas obtenidas de cada cruzamiento, analizando los patrones de bandas de las progenies en comparación con la planta madre utilizada.

Aislamiento de ADN

La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo descrito en [Reutemann et al. \(2024\)](#). El ADN genómico total se aisló de plantas cultivadas en macetas e invernadero. Aproximadamente 50 mg de hojas jóvenes de cada planta fueron maceradas con ayuda de un taladro de mecha de plástico y 700 µl de buffer de extracción 2% CTAB (1 M Tris-HCl pH 7,5, 0,5 M EDTA pH 8, 5 M NaCl, 1% 2-mercaptoetanol) en un tubo de 1,5 ml. Las muestras se incubaron a 60 °C durante 30 min. Luego, se añadieron 700 µl de cloroformo y la mezcla se agitó durante 5 min y se centrifugó durante 10 min. La fase acuosa se recuperó y se transfirió a otro tubo. Los ácidos nucleicos se precipitaron con 500 µl de 2-propanol a -20°C. Luego, los tubos se mantuvieron en un congelador a -20°C durante un mínimo de 24 h. Al otro día, las muestras se centrifugaron a 4°C durante 20 min. El sobrenadante se descartó y el pellet se limpió con una solución de lavado (etanol 70° y acetato de sodio 0,2 M) y se centrifugó nuevamente durante 5 min. Después de la centrifugación, el sobrenadante se descartó y el pellet se suspendió en 25 µL de tampón TE estéril (Tris-HCl 1 M pH 8, EDTA 0,5 M pH 8) y se mantuvo en un refrigerador. El ADN genómico se cuantificó por comparación visual con un patrón conocido mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X (Tris-HCl 40 mM, NaOAc 5 mM, EDTA 0,77 mM, pH 8,0) a 60 V durante 1 h. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (BrEt, 1 µg ml⁻¹) y el ADN genómico se visualizó bajo luz ultravioleta (UV) y se fotografió con el sistema de imágenes GelDoc-It (UVP LLC, Upland, CA, EE. UU.). La calidad de la muestra se verificó midiendo la integridad del ADN y la ausencia de contaminación por ARN. Cada muestra de ADN se ajustó a 20 ng µl⁻¹ para su uso en amplificación por PCR.

Amplificación del ADN genómico con ISSRs

Para determinar si los descendientes se originaron por la vía sexual o por apomixis, se usaron marcadores moleculares ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*), según la técnica descrita por [Reutemann et al. \(2022b\)](#). Cada reacción contó con un volumen final de 25 µl que contenía: 20 ng de ADN genómico, 2,5 µl de 10X buffer de reacción, 1,5 µl de 25mM MgCl₂, 1,5 µl de 5µM *primer*, 1,25 µl de 2mM dNTP, 0,2 µl de 5U ADN *Taq* polimerasa (InBio Highway) y agua ultrapura autoclavada para completar. Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en un termociclador My-Cycler y/o T100 (BioRad, California, USA), con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min; 40 ciclos de 94 °C por 1 min, temperatura de hibridación del primer por 45 s (Tabla 3), 72 °C por 2 min; y una extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos de la amplificación se separaron en geles de agarosa 2% con buffer TAE 1X (400mM Tris-HCl; 50mM NaOAc; 7,7mM EDTA pH 8,0) a 70 V por 3,5 h, posteriormente fueron teñidos con BrEt 1µg ml⁻¹ por 30 min y visualizados con el dispositivo GelDoc It (UVP, California, USA).

Tabla 3. Cebadores utilizados para determinar el origen reproductivo de la progenie.

Cebador	T° hibridación (°C)	Nº de bandas obtenidas
(AC) ₈ T	55	16
CAG(CA) ₇	55	13
(AG) ₈ GC	54	10
GAG(AC) ₇	52	11
(CA) ₈ T	52	18
(GA) ₈ T	48	15
(GA) ₈ TC	46	12

(AG) ₈ T	46	13
Total		108

Análisis de los patrones de banda

Aquellos individuos que mostraron el mismo perfil de amplificación (bandas) que su respectiva planta madre se consideraron de origen apomítico; mientras que aquellas que mostraron un perfil de bandas diferentes se consideraron de origen sexual. Para corroborar el origen clonal de la progenie se utilizó el programa estadístico GENOTYPE y GENODIVE (Meirmans & Van Tienderen, 2004) y se calculó el número efectivo de genotipos (G), utilizando el modelo de alelos infinitos con cinco pasos mutacionales ($M=5$). Se estableció este valor de pasos mutacionales, considerándolo como el margen de error en la interpretación de los geles. Además, se estimó el número de fragmentos totales (TF), el porcentaje de loci polimórfico ($\%PL$) y el número de bandas privadas (BP) utilizando GenAlEx 6 (Peakall & Smouse, 2006). Se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) para observar la distribución de la variabilidad genética dentro y entre familias.

Resultados

Se obtuvieron un total de seis familias de los cruzamientos realizados (Familias A-E y G, Tabla 2). El ensayo de autopolinización del genotipo triploide, utilizado como control negativo, no produjo semillas. El ensayo de polinización abierta del genotipo triploide, usado como control positivo, produjo la séptima familia analizada (Familia F, Tabla 2).

Fertilidad, germinación y supervivencia de la progenie

En los cruzamientos donde el citotipo triploide actuó como madre ($3x \times 2x$, Familias B-E), la fertilidad estimada como el índice de hibridación (H), fue variable presentando valores entre 6,48% y 18,5% (Tabla 4, Figura 2). En los casos donde el triploide actuó como padre ($2x \times 3x$, Familias A y G), la fertilidad estimada con el índice de hibridación fue la más baja (0% en la Familia G) y la más alta (22,8% en la Familia A; Tabla 4). Por último, el control positivo (Familia F) presentó el valor más alto de fertilidad con un 74,6% (Tabla 4), como se esperaba, ya que bajo condiciones a campo este genotipo es capaz de generar una mayor cantidad de cariósides viables posiblemente debido a una mayor oportunidad de polinizaciones por diferentes citotipos del ensayo.

Tabla 4. Fertilidad estimada con el índice de hibridación (H), germinación (G) y supervivencia (L) de la progenie obtenida de cada familia.

Familia	NT	NC	$H(\%)$	NST	NSG	$G(\%)$	NPT	NPS	$L(\%)$
A	70	16	22,8	16	13	81,3	13	2	15,4
G	668	0	0	0	0	0	0	0	0
B	454	36	7,9	30	9	30	9	2	22,2
D	242	16	6,6	16	9	56,3	9	0	0
C	119	22	18,5	21	11	52,4	11	2	18,2
E	664	43	6,5	30	23	76,7	23	1	4,3
F	280	209	74,6	70	65	93	65	7	10,8

Referencias: NT, número total de espiguillas polinizadas; NC, número de espiguillas con cariósido desarrollado; NST, número total de semillas puestas a germinar; NSG, número de semillas germinadas; NPT, número de plantas total obtenidas en el ensayo de germinación; y NPS, número de plantas que superaron el estadio BBCH 3.

En general, los valores de germinación fueron altos, lo que indica que, a pesar de la baja fertilidad en algunos cruzamientos, las cariósides producidas tienen buena capacidad de germinación. Los cruzamientos donde el citotipo triploide actuó como madre ($3x \times 2x$, Familias B-E) presentaron valores de germinación que oscilaron entre el 30% y 76,7% (Tabla 4, Figura 2). El único cruzamiento donde el citotipo triploide actuó como padre y produjo cariósides (Familia A), alcanzó un 81,3% de germinación (Tabla 4). Por otro lado, la Familia F presentó el valor más alto de germinación (Tabla 4).

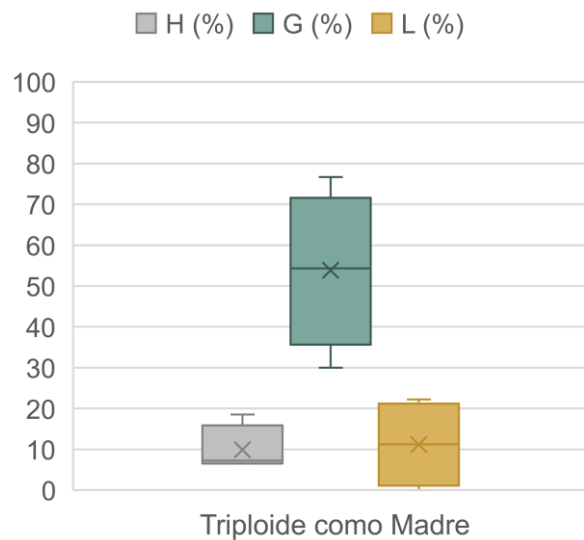


Figura 2. Gráfico de cajas con los valores observados en los cruzamientos donde el citotipo triploide se usó como planta madre. *Referencias:* las cajas indican el primer (Q1), segundo (Q2) y tercer cuartil (Q3). El segundo cuartil (Q2) es la Mediana de la muestra. La equis (x) dentro de las cajas indica la media de la muestra. Los bigotes se corresponden a tres desvíos estándar.

La supervivencia de las plántulas tras la germinación, hasta el estadio BBCH 3, fue baja en todas las familias, con valores entre 0% y 22,2% (Tabla 4 y Figura 3). Esta baja supervivencia se atribuyó a un ataque de arañuelas (*Tetranychus spp.*: Acari: Tetranychidae) en el invernáculo, indicando que las progenies obtenidas presentaron una resistencia baja a esta plaga. La Familia D mostró el porcentaje de supervivencia más bajo (0%, Tabla 4 y Figura 3), lo que podría indicar que la progenie obtenida fue la más afectada por la arañuela. La familia B fue la que presentó el porcentaje de supervivencia más alto (22,2%, Tabla 4 y Figura 3).

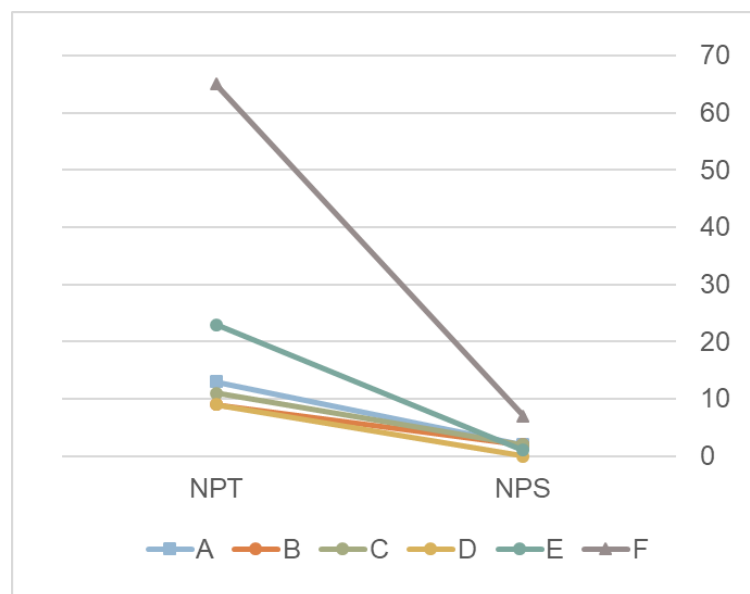


Figura 3. Numero de progenies obtenidas (NPT) y sobrevivientes (NPS) de cada familia al inicio y fin de cuatro semanas. *Referencias:* Familia A, triploide como padre; Familias B-E, triploide como madre; Familia F, control positivo.

Comparativamente, se obtuvo un mayor porcentaje de H, G y L en los cruzamientos donde el citotipo triploide actuó de dador de polen (si se ignora a la familia G) a comparación con el promedio de los cruzamientos donde el triploide actuó como madre (Figura 4). Sin embargo, dentro del rango de variación del comportamiento del citotipo triploide como planta madre, se observaron valores superiores respecto a L en las familias B y C (Tabla 4 y Figura 2).

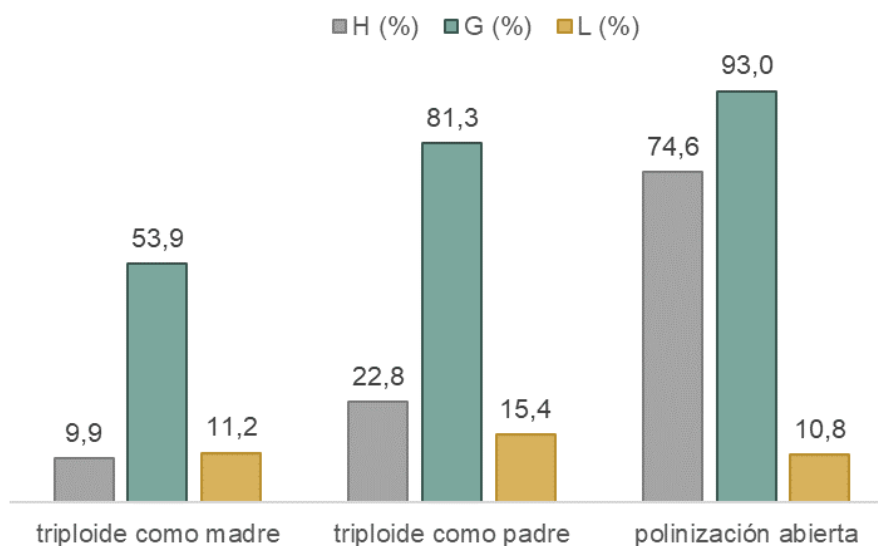


Figura 4. Porcentajes de hibridación intercitotipo (H), germinación (G) y supervivencia (L) de las progenies obtenidas en cada cruzamiento realizado y el control positivo. *Referencias*, se presentan los valores promedio para el triploide como madre. Para el triploide como padre y polinización abierta se presenta el único valor observado.

Análisis de la microsporogénesis

Se analizaron 3212 células madre del polen (CMPs) en distintas fases de la meiosis del citotipo triploide usado en los cruzamientos. El comportamiento meiótico del triploide fue irregular, con un 74,1% de CMPs con anomalías meióticas (Tabla 5). Este alto porcentaje es característico de los citotipos triploides, donde la meiosis irregular suele ser el resultado de una segregación cromosómica desequilibrada, debido a la complejidad de las configuraciones cromosómicas típicas de los autotriploides. Además, estas irregularidades meióticas podrían ser una de las explicaciones en la variación observada en los porcentajes de hibridación de los cruzamientos donde actuó como parental masculino (0-22%, Tabla 4).

Tabla 5. Porcentaje de Anormalidades observadas por fase meiótica en las 3212 células madre del polen (CMPs) analizadas.

Fase meiótica	Nº de CMPs Normales (%)	Nº de CMPs anormales (%)
Profase I	358 (11,1)	3 (0,1)
Metafase I	61 (1,9)	113 (3,5)
Anafase I	22 (0,7)	374 (11,6)
Telofase I	66 (2,1)	430 (13,4)
Profase II	216 (6,7)	681 (21,2)

Metafase II	50 (1,6)	120 (3,7)
Anafase II	1 (0,03)	207 (6,5)
Telofase II	12 (0,4)	173 (5,4)
Tétradas	46 (1,4)	279 (8,7)
Total	832 (25,9)	2380 (74,1)

Referencias: los porcentajes están calculados tomando el valor total de CMPs (N=3212).

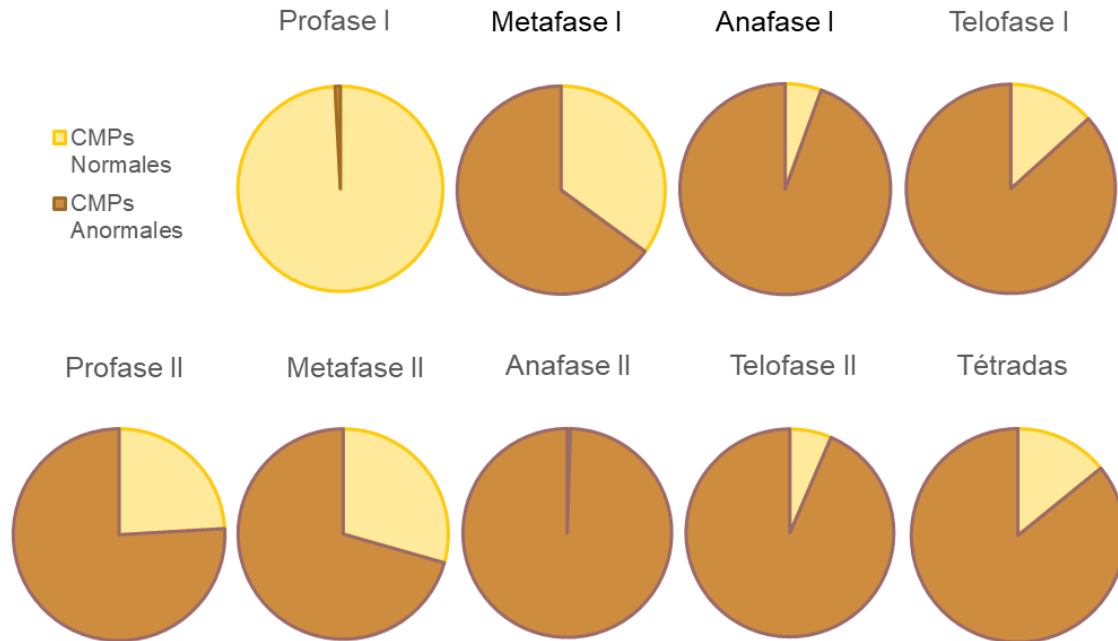


Figura 5. Porcentajes de células madres del polen (CMPs) normales y anormales en cada fase de la meiosis de *Paspalum indecorum* triploide.

Todas las fases meióticas analizadas presentaron porcentajes altos de anomalías (AF>60%, Tabla 6) a excepción de la Profase I (Figura 5). Con respecto a la Meiosis I, en **Paquiteno** (Profase I), la mayoría de las células fueron normales, observándose solo tres células binucleadas con presencia de dos nucléolos (TAF-Tabla 6, Figura 6A). En **Diacinesis** (Profase I) no se observaron anomalías (Tabla 6). Cuando se analizaron las configuraciones cromosómicas, la mayoría de las células presentó 8III+2II+2I (Figura 7), seguidas por la configuración 10III. El promedio y rango de cada configuración cromosómica (III, II & I) puede observarse en la Tabla 7. Esta alta frecuencia de trivalentes (III) confirmaría el origen autoploiploide de este citotipo. Esta alta frecuencia de trivalentes afecta tanto a la segregación de los cromosomas como a la posterior formación de gametos viables, lo que sugiere que, aunque algunos gametos puedan formarse correctamente, una gran proporción estará afectada por aneuploidías u otras irregularidades que comprometen su funcionalidad reproductiva.

Tabla 6. Anormalidades meióticas observadas en cada fase de la microsporogénesis.

Fase meiótica	CF	AF (%)	Tipo de Anormalidades por fase	TAF (%)
Paquiteno	147	3 (2,0)	Células Normales	144 (98)
			Cel. Binucleadas	3 (2)
Diacinesis	214	0 (0)	Células normales	214 (100)
Metafase I	174	113 (64,9)	Células normales	61 (35,1)

			Husos acromáticos múltiples	10 (5,7)
			Migración precoz	103 (59,2)
Anafase I	396	374 (94,4)	<i>Células normales</i>	22 (5,6)
			Cromosomas rezagados	160 (40,4)
			Husos acromáticos múltiples	1 (0,3)
			Segregación irregular	81 (20,5)
			Puente anafásico	91 (23,0)
			Cromosomas pegajosos	41 (10,4)
Telofase I	496	430 (86,7)	<i>Células normales</i>	66 (13,3)
			Binucleadas	5 (1,0)
			Micronúcleos	102 (20,6)
			Citocinesis anormal	48 (9,7)
			Cromosomas rezagados	258 (52,0)
			Cromosomas pegajosos	17 (3,4)
Profase II	897	681 (75,9)	<i>Células normales</i>	216 (24,1)
			Micronúcleos	602 (67,1)
			Cromosomas pegajosos	79 (8,8)
Metafase II	170	120 (70,6)	<i>Células normales</i>	50 (29,4)
			Migración precoz	117 (68,8)
			Husos acromáticos múltiples	3 (1,8)
Anafase II	208	207 (99,5)	<i>Células normales</i>	1 (0,5)
			Cromosomas rezagados	58 (27,9)
			Segregación irregular	103 (49,5)
			Puente anafásico	45 (21,6)
			Husos acromáticos múltiples	1 (0,5)
Telofase II	185	173 (93,5)	<i>Células normales</i>	12 (6,5)
			Cromosomas pegajosos	2 (1,1)
			Micronúcleos	168 (90,8)
			citocinesis anormal	3 (1,6)
Tétradas	325	279 (85,8)	<i>Células normales</i>	46 (14,2)
			Cromosomas rezagados	43 (13,2)
			Micronúcleos	75 (23,1)
			Triadas	5 (1,5)
			Citocinesis anormal	84 (25,8)
			Micrósporas binucleadas	72 (22,2)

Referencias: CF, número total de células observadas por fase; AF, número de células anormales por cada fase; TAF, número de células observadas de cada tipo de anomalía dentro de cada fase meiótica.

En **Metafase I**, la anomalía más frecuente fue la migración precoz de los cromosomas hacia los polos (59,2%, TAF-Tabla 6; Figura 6B). En **Anafase I**, las anomalías más observadas fueron cromosomas rezagados (40,4%), la segregación irregular de los cromosomas (20,5%) y la presencia de puentes anafásicos (23%, TAF-Tabla 6; Figura 6C-E). En **Telofase I** se observaron cromosomas rezagados (52%) y la presencia de micronúcleos (20,6%, TAF-Tabla 6; Figura 6F) como las anomalías más frecuentes.

Respecto a la Meiosis II, la anomalía más frecuente de la **Profase II** fueron los micronúcleos (67,1%, Tabla 6). En **Metafase II**, la anomalía más predominante fue la migración precoz de los cromosomas a los polos opuestos (68,8%) (TAF-Tabla 6 y Figura 6G). La segregación irregular de los cromosomas (49,5%), la presencia de cromosomas rezagados (27,9%) y puentes anafásicos (21,6%) también fueron las irregularidades más comunes en **Anafase II** (TAF-Tabla 6). En **Telofase II**, la presencia de micronúcleos (90,8%, TAF-Tabla 6 y Figura 6H) fue la irregularidad meiótica más frecuente. Por último, en las **Tétradas**, se observaron en mayor frecuencia la presencia de micronúcleos (23,1%), citocinesis anormal (25,8%), y micrósporas binucleadas (22,2%, TAF-Tabla 6 y Figura 6I-J).

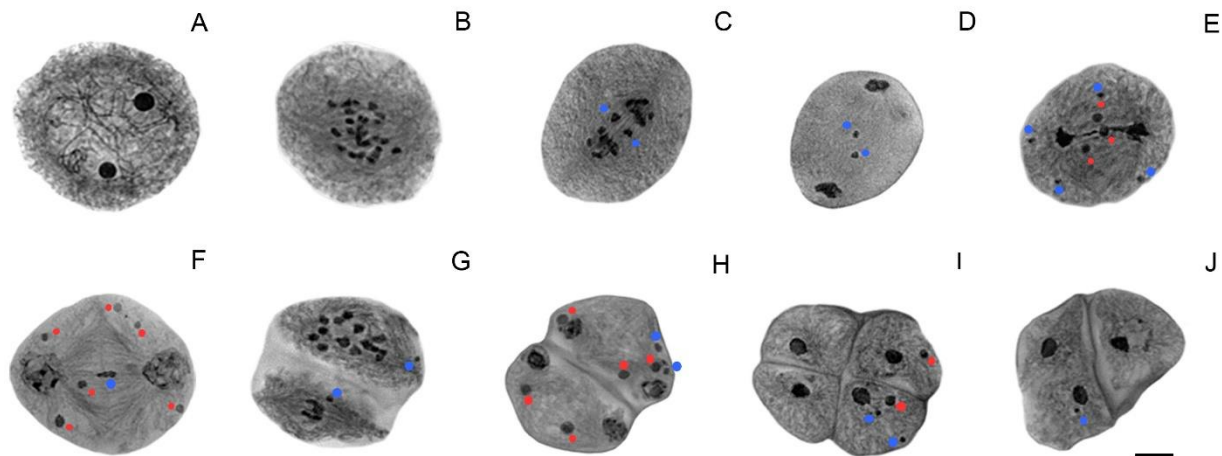


Figura 6. Observaciones de anomalías meióticas en diferentes fases en el citotipo triploide. **A.** Paquiteno, célula madre del polen con dos nucléolos. **B.** Metafase I con migración precoz de cromosomas. **C-E.** Anafase I, destacando cromosomas rezagados (C), cromosomas pegajosos (D), y un puente anafásico con cromosomas pegajosos (E). **F-H.** Profase II (F) y Telofase II (H) presentan micronúcleos y cromosomas pegajosos. En Metafase II (G) se muestra migración precoz de cromosomas. **I-J.** Tétradas con citocinesis anormal, micronúcleos y cromosomas rezagados (I). *Referencias:* los puntos rojos indican la presencia de micronúcleos, mientras que los puntos azules marcan cromosomas rezagados. Escala: 10 μm .

Tabla 7. Configuraciones cromosómicas en la meiosis masculina *Paspalum indecorum* triploide.

Especie	Accesión	N° de CMPs analizadas	Promedio y Rango de configuraciones meióticas observadas		
			I	II	III
<i>P. indecorum</i>	H1726 #9 (3x)	35	4,82±3,39 (0-15)	2,77±1,91 (0-7)	6,54±2,03 (3-10)

CMPs: Células Madres del Polen

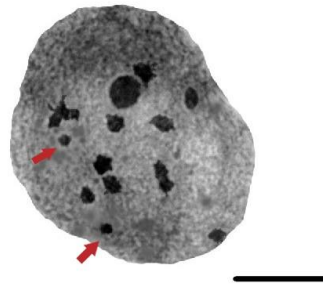


Figura 7. Configuración cromosómica observada durante la profase I en *Paspalum indecorum*, donde se observan 8 trivalentes (III), 2 bivalentes (II), y 2 univalentes (I). Referencias: Las flechas indican la posición de los univalentes. Escala: 10 μm

Viabilidad del polen y estimación de su ploidía

El análisis de la viabilidad del polen del citotipo triploide mostró un valor del 92,7%. En la Figura 8 se pueden observar granos de polen viables de diferentes tamaños y granos de polen no viables.

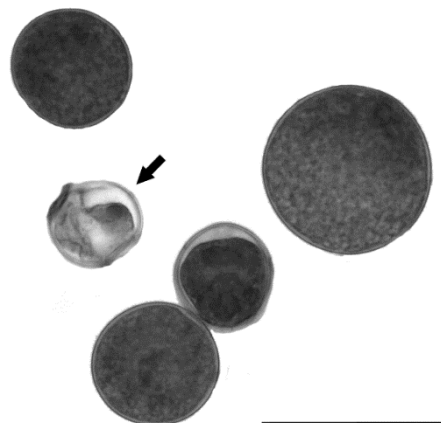


Figura 8. Granos de polen viables (coloreados) y no viables (flecha negra). Escala: 25 μm .

Análisis del tamaño de los granos de polen

El tamaño de los granos de polen del citotipo triploide mostró una gran variabilidad. En un total de 110 granos de polen medidos, el menor tamaño observado fue 12,8 μm , mientras que el de mayor tamaño fue de 22,1 μm (Tabla 8, Figura 9). La mayor frecuencia de granos de polen (29%) se encontró en el rango de 16,4 -17,5 μm (Tabla 9, Figura 10).

Tabla 8. Medidas de Resumen del diámetro de los granos de polen de *Paspalum indecorum*.

Citotipo	n	Media	D. E.	Mínimo	Máximo	Mediana	Q1	Q3
Diploide	128	16	2,0	12,2	21,6	15,5	14,8	16,6
Triploide	110	16,9	1,5	12,8	22,1	16,7	15,9	17,8

Referencias, n: tamaño muestral; D.E., desvío estándar; Q1: primer cuartil; Q3: tercer cuartil.

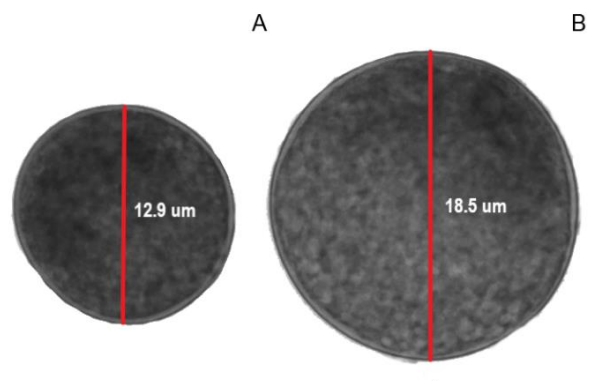


Figura 9. Diferencias de tamaño entre los granos de polen del citotipo triploide de *P. indecorum*. **A.** El diámetro del grano de polen es 12,9 μm . **B.** El diámetro del grano de polen es 18,5 μm . Escala: 10 μm .

Tabla 9. Variaciones del tamaño de los granos de polen del citotipo triploide, y su frecuencia absoluta, relativa y acumulada.

Variación del tamaño (μm)	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa (%)	Frecuencia Relativa Acumulada (%)
12,8 – 13,96	1	0,9	1
13,96 – 15,13	11	10	11
15,13 – 16,29	29	26,4	37
16,29 – 17,46	32	29,1	66
17,46 – 18,62	26	23,6	90
18,62 – 19,78	7	6,4	96
19,78 – 20,95	3	2,7	99
20,95 – 22,12	1	0,9	100

Tabla 10. Variaciones del tamaño de los granos de polen del citotipo diploide, y su frecuencia absoluta, relativa y acumulada.

Variación del tamaño (μm)	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa (%)	Frecuencia Relativa Acumulada (%)
12,23 - 13,40	6	4,7	4,7
13,40 - 14,57	22	17,2	21,9
14,57 - 15,74	46	35,9	57,8
15,74 - 16,91	24	18,8	76,6
16,91 - 18,08	10	7,8	84,4
18,08 - 19,25	3	2,3	86,7
19,25 - 20,42	12	9,4	96,1
20,42 - 21,57	4	3,1	99,2
21,58 - 22,75	1	0,8	100,0

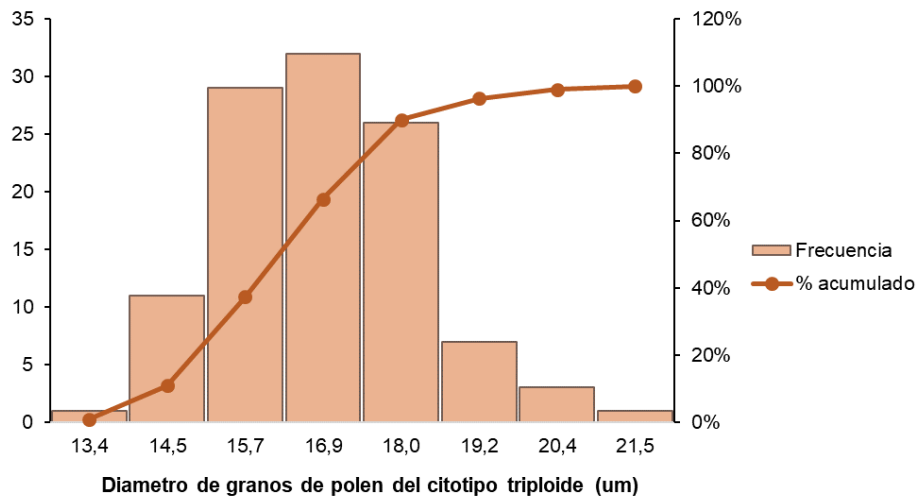


Figura 10. Distribución de frecuencias absolutas y porcentaje acumulado del tamaño de granos de polen del citotipo triploide.

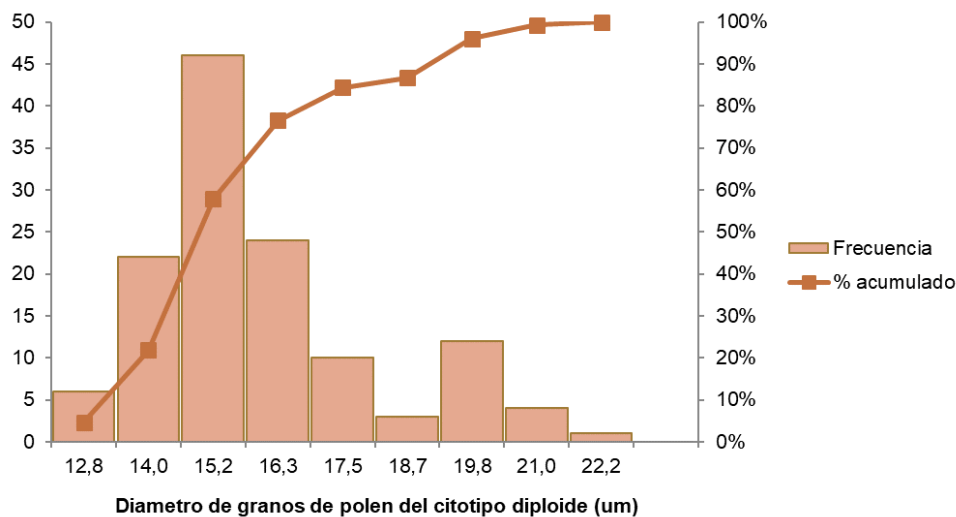


Figura 11. Distribución de frecuencias absolutas y porcentaje acumulado del tamaño de granos de polen del citotipo diploide.

No se observaron granos de polen pequeños ni jumbo en el citotipo diploide ni en el triploide. Los granos de polen no reducidos ($2n=2x$) en el citotipo diploide fueron aquellos con diámetros mayores a 20 μm , y representaron el 6,98% del total (Tabla 10 y Figura 11). Por su parte, los granos de polen no reducidos ($2n=3x$) del citotipo triploide, fueron aquellos con diámetros superiores a 21 μm , y mostraron una frecuencia del 0,9% (Tabla 9 y Figura 10).

Se compararon los tamaños de los granos de polen entre el citotipo triploide y diploide de *Paspalum indecorum* (Tabla 8). Las diferencias de tamaño fueron estadísticamente significativas ($T=-3,73$, g.l.= 235, $p\text{-valor}=0,0002$, Figura 12). La prueba de Shapiro-Wilks confirmó que la distribución estadística del tamaño de los granos de polen del citotipo triploide sigue una distribución normal ($W=0,99$, $p\text{-valor}= 0,8224$).

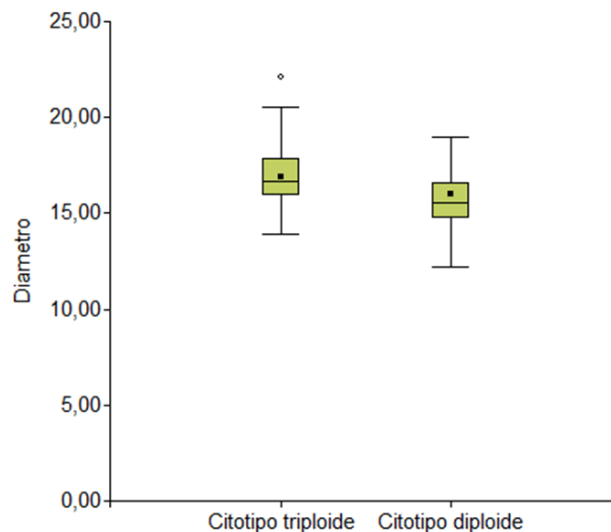


Figura 12. Gráfico de cajas indicando la distribución del tamaño de los granos de polen de los citotipos diploide y triploide de *P. indecorum*. Referencias: las cajas indican el primer (Q1), segundo (Q2) y tercer cuartil (Q3). El segundo cuartil (Q2) es la Mediana de la muestra. El cuadrado dentro de las cajas indica la media de la muestra. Los bigotes se corresponden a tres desvíos estándar. Los círculos fuera de los bigotes indican valores extremos (*outliers*).

Determinación de niveles de ploidía de la progenie

Conteos cromosómicos

Con las plantas supervivientes del ataque de arañuela, se realizaron los conteos cromosómicos clásicos. Todos los individuos sobrevivientes de las Familias A-E fueron diploides, con $2n=2x=20$ (Tabla 11). En la Familia F, se observó un individuo aneuploide con $2n=17$, mientras que el resto fueron diploides ($2n=2x=20$) (Tabla 11).

Tabla 11. Números cromosómicos observados en las progenies sobrevivientes dentro de cada Familia.

Familia	Supervivientes	Números Cromosómicos
A	F1 #2	$2n=2x=20$
	F1 #11	$2n=2x=20$
B	F1 #11	$2n=2x=20$
C	F1 #8	$2n=2x=20$
	F1 #10	-
	F1 #11	-
E	F1 #6	$2n=2x=20$
	F1 #7	$2n=2x=20$
F	F1 #28	$2n=2x=20$
	F1 #46	-
	F1 #49	$2n=17$
	F1 #57	$2n=2x=20$
	F1 #58	$2n=2x=20$
	F1 #59	$2n=2x=20$
	F1 #60	$2n=2x=20$

Referencias, #: indica el número de identificación del individuo.

Citometría de Flujo para estimación de contenido de ADN

Se analizaron un total de 113 plántulas (Tabla 12). En la familia A, el 72,7% de las progenies fueron diploides y 27,3% fueron tetraploides (Tabla 12). Las familias B y D solo dieron origen a progenie diploide (Tabla 12). En la familia C, el 70% de las progenies fueron diploides, 20% fueron triploides y 10% fueron hexaploides. En la Familia E, el 4,3% de las progenies fueron tetraploides (Figura 13C), y 4,3% pentaploides (Figura 13D y Tabla 12). El 91,4% restante de la progenie fueron diploides (Tabla 12). Por último, la progenie de la familia F fueron 90% diploides (Figura 13A), 4% triploides (Figura 13B), 4% tetraploides y 2% hexaploides (Figura 13E y Tabla 12)

Tabla 12. Estimación de los niveles de ploidía de las progenies por citometría de flujo.

Familia	N° de progenies analizadas	Ploidías				
		Diploide (2x)	Triploide (3x)	Tetraploide (4x)	Pentaploide (5x)	Hexaploide (6x)
A	11	8	-	3	-	-
B	9	9	-	-	-	-
C	10	7	2	-	-	1
D	9	9	-	-	-	-
E	23	21	-	1	1	-
F	51	46	2	2	-	1
Total	113	100	4	5	1	2

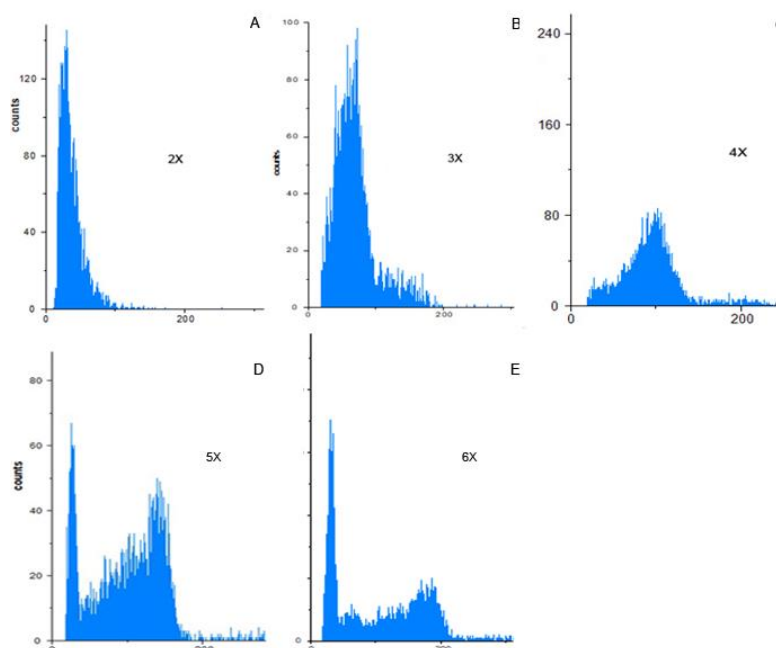


Figura 13. Histograma del contenido relativo de ADN obtenido por citometría de flujo para determinar los niveles de ploidía en progenies de *Paspalum indecorum*. **A.** Histograma correspondiente a progenie diploide ($2n= 2x$) de la Familia F. **B.** Histograma correspondiente a progenies triploides ($2n= 3x$) de la Familia F. **C.** Histograma correspondiente a progenie tetraploide ($2n= 4x$) de la Familia E. **D.** Histograma correspondiente a progenie pentaploide ($2n=5x$) de la Familia E. **E.** Histograma correspondiente a progenie hexaploide ($2n=6x$) de la Familia F.

Determinación del origen reproductivo de la progenie

Citometría de Flujo de semillas (FCSS)

Este análisis se realizó exclusivamente en las Familias B y F, porque en estas familias se obtuvieron un mayor número de cariósides ($n > 30$). En las otras familias, las pocas cariósides obtenidas se usaron para determinar los índices de germinación y supervivencia, y en la obtención de plántulas para el análisis con *ISSRs*. En la familia B, se analizaron nueve semillas, donde el 66,7% (6/9) presentaron embriones diploides ($2x, n+n$) con un endospermo triploide ($3x, [n+n]+n$), indicando un origen sexual (meiótico), ya que la relación de contenido relativo de ADN embrión: endospermo 2: 3 corresponde al mecanismo de doble fecundación de gametos reducidos ($n=x$). El 33,3% (3/9) restante presentó embriones triploides ($3x$) con un endospermo pentaploide ($5x$), lo que también indica un origen sexual mediante la fecundación de gametos reducidos ($n=2x$). En este caso, el embrión triploide ($3x$) resultaría de la unión de un gameto femenino reducido pero diploide ($n=2x$) con un gameto reducido haploide ($n=x$), y el endospermo pentaploide ($5x$) de la unión de los dos núcleos polares reducidos diploides [$n=2x+n=2x$] y un gameto reducido haploide ($n=x$). Por lo tanto, el 100% de las semillas analizadas fueron de origen sexual.

En la familia F, se analizaron un total de 30 semillas, donde el 96,7% (29/30) presentó embrión diploide ($2x, n+n$) y endospermo triploide ($3x, [n+n]+n$), lo que indica un origen sexual. El 3,3% (1/30) de las semillas tuvieron un embrión triploide ($3x$) con un endospermo pentaploide ($5x$), similar al observado en la familia B. Por lo tanto, las semillas analizadas para esta familia también fueron de origen sexual.

La presencia de semillas con un contenido de ADN relativo embrión: endosperma 3:5, tanto en la familia B como F, indicaría que aquellos gametos del individuo triploide que llevan 20 cromosomas ($n=2x$) son viables y pueden participar en la formación de nuevos individuos triploides.

Prueba progenie con *ISSRs*

Se analizó un total de 14 progenies con sus respectivos parentales maternos. Para este análisis se conformaron dos grupos teniendo en cuenta al parental materno utilizado en cada familia. La familia A (dos progenies sobrevivientes) junto a su progenitor materno (H1726 #8) conformaron el grupo **I1** ($N=3$). Las familias B, C, E y F junto a su progenitor materno (H1726 #9), conformaron el grupo **I2**. En el grupo I2, se analizaron 12 progenies ($N=13$, con el parental materno incluido).

Se amplificaron un total de 108 bandas *ISSRs* ($TF=108$), con un promedio de loci polimórficos (%LP) de 62%. En el grupo I1 se observó 45,4%LP y en el grupo I2 79%LP. Se identificaron un total de 18 bandas privadas (BP) en el grupo I1 y 45 BP en el grupo I2. El 100% de la progenie mostró un genotipo diferente al materno en ambos grupos (I1: $G=3$; I2: $G=13$).

En el Análisis de Coordenadas Principales (PcoA), la primera coordenada explicó el 36,5% de la variación genética, mientras que la segunda coordenada explicó un 25,1%, acumulando un 61,6% de la variación genética (Figura 14). Se observó que, a excepción de la progenie #46 de la Familia F, todos los individuos comparten el mismo rango de variación sobre la primera coordenada. Sobre la coordenada 2, se puede observar la separación entre la Familia A, obtenida usando al citotipo triploide como dador de polen (Grupo I1) y las familias donde actuó como parental materno (Grupo I2).

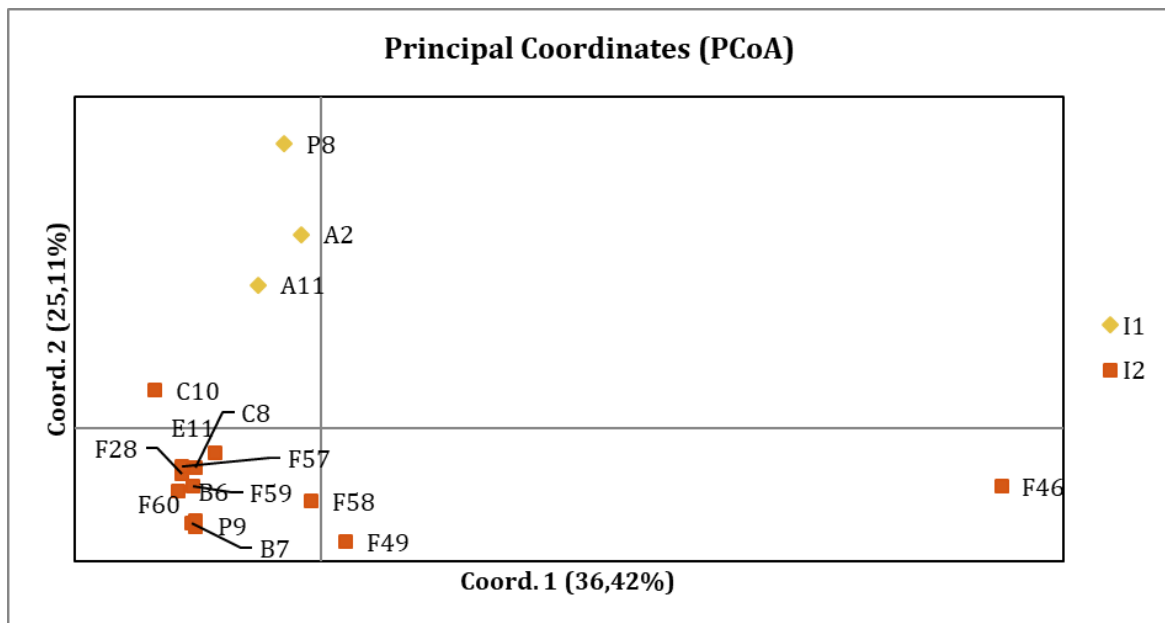


Figura 14. Análisis de Coordenadas Principales (PcoA) de las Familias obtenidas de los cruzamientos heteroploides de *P. indecorum*. Referencias: I1, familia A, donde el citotipo triploide actuó como dador de polen. I2, Familias B, C, E y F, donde el citotipo triploide actuó como planta madre. Las letras indican a que familia pertenecen las progenies. Las plantas P8 y P9 son los parentales maternos H1726 #8 (2x) y H1726 #9 (3x), respectivamente.

Discusión

En la historia evolutiva de los complejos poliploides, las etapas más críticas son su formación y establecimiento (Harlan & de Wet, 1975; Ramsey & Schemske, 1998). En la poliploidización unilateral, comúnmente mediada por un “puente triploide”, se genera un neopoliploide mediante un mecanismo de dos pasos de fusiones de gametos reducidos (n) y no reducidos ($2n$) (Ramsey & Schemske, 1998). Durante el primer paso, un gameto haploide reducido (n) se fusiona con un gameto diploide no reducido ($2n$) para formar un individuo triploide. Luego, el triploide primario sirve como un “puente” entre los diploides parentales y produce un tetraploide derivado que, a su vez, debe producir nuevos individuos poliploides de segunda generación a través de una variedad de vías para establecer un grupo de parejas de apareamiento homoploides (ver Ramsey & Schemske, 1998; De Storme & Geelen, 2013; Hojsgaard, 2018).

En la naturaleza, la fase de establecimiento demográfico de los triploides, es decir, la formación de los primeros poliploides a partir de ancestros diploides, es poco documentada y está sujeta a múltiples restricciones reproductivas y demográficas (Husband, 2004; Arrigo & Barker, 2012). Los principales factores que influyen en el establecimiento de neopoliploides incluyen la frecuencia de gametos no reducidos, los mecanismos que atenúan las desventajas de los citotipos minoritarios, el tamaño efectivo de la población y cambios ambientales que modulan estos procesos (Arrigo & Barker, 2012; Hojsgaard, 2018). En este contexto, la eficiencia del puente triploide depende fundamentalmente de la fertilidad de los triploides y de su capacidad para producir gametos cromosómicamente equilibrados (e.g. Ramsey & Schemske, 1998; Husband, 2004; Arrigo & Barker, 2012).

El puente triploide es probablemente el mecanismo más influyente en el establecimiento demográfico local de poliploides secundarios. La eficiencia del puente triploide depende de la fertilidad de los triploides, que está impulsada principalmente por la formación de gametos cromosómicamente equilibrados y por el aislamiento reproductivo interploide (Khush, 1973; Ramsey & Schemske, 1998). En general, para que cualquier mecanismo aumente la eficiencia del puente triploide, debe mejorar la tasa de formación de nuevos individuos eupoliploides en el corto plazo, ya sea a partir de retrocruzas con diploides parentales o de neopoliploides secundarios.

Actualmente, se sugiere que las frecuencias de gametos $2n$ pueden explicar la heterogeneidad de niveles de ploidía observada en la naturaleza (e.g. Husband, 2004; Oswald & Nuismer, 2011; Suda & Herben, 2013). Se han descrito numerosos mecanismos citológicos responsables de la formación de gametos no reducidos ($2n$) (e.g. restitución meiótica de la primera división –FDR- o segunda división meiótica –SDR-, apomeiosis, Kovalsky *et al.*, 2014; revisado en Hojsgaard, 2018). En el análisis de la formación de gametos (microsporogénesis y microgametogénesis) del citotipo triploide de *Paspalum indecorum* se observó una alta frecuencia de irregularidades meióticas en general (74,1%), y todas las fases analizadas presentaron altos porcentajes de CMPs anormales, a excepción de la profase I. Estas anomalías meióticas suelen estar asociadas a la segregación irregular de cromosomas, resultante de la alta frecuencia de univalentes, o irregularidades en la terminalización de los quiasmas en cromosomas pareados (e.g. II o III) (Pagliarini *et al.*, 2001; De Souza-Kaneshima *et al.*, 2010; Ziegler *et al.*, 2024). En *Paspalum*, se ha informado de una alta frecuencia de anomalías meióticas en autotriploides (Quarin *et al.*, 1984), como en alotriploides (Burson & Bennett, 1972; Burson, 1979; Ziegler *et al.*, 2024).

Si bien las anomalías observadas podrían afectar la viabilidad de los gametos, los resultados muestran que una alta proporción ($\approx 93\%$) de granos de polen del citotipo triploide son viables. Reportes previos en el género, han descrito tasas de viabilidad del polen menores en autotriploides (0,8-9,3%, [Quarin *et al.*, 1984](#)) y en alotriploides (0-10,5%, [Burson & Bennett, 1972](#); [Burson, 1979](#); [Ziegler *et al.*, 2024](#)). Respecto a la vía femenina y la formación de sacos embrionarios en este citotipo de *P. indecorum*, [Reutemann *et al.* \(2022a\)](#) describieron una alta tasa de sacos embrionarios meióticos (65%) y apospóricos (19%), y una tasa de 15% de sacos no desarrollados. Estos resultados son similares a los observados en autotriploides de *Paspalum cromyhorizon* Trin. Ex Döll ([Quarin *et al.*, 1984](#)), pero la mayoría de los autotriploides como alotriploides del género presentan altas tasas de sacos abortados o no desarrollados (65-91%, [Burson & Bennett, 1972](#); [Burson, 1979](#); [Quarin *et al.*, 1984](#); [Ziegler *et al.*, 2024](#)). Esto demostraría que, aunque el proceso meiótico del citotipo triploide es irregular, aún puede generar gametos viables en proporciones comparables a las de poliploides pares (ver como ejemplo, [Quarin *et al.*, 1982](#); [Norrman *et al.*, 1989](#); [Quarin & Burson, 1991](#)).

Las anomalías observadas durante la meiosis también generan una variación en el tamaño de las micrósporas, y por ende afectan el tamaño de los granos de polen. La variabilidad en el tamaño de los granos de polen observada en el citotipo triploide podría deberse a diferencias en el contenido cromosómico final en los gametos, debido a la segregación irregular observada durante las Anafases I y II, afectando el volumen celular de los gametos. Esta variación de tamaño podría estar indicando la formación de granos de polen reducidos (n) y no reducidos ($2n$). Los granos de polen no reducidos tienden a ser más grandes, manifestando el efecto gigas ([Ramsey & Schemske, 1998](#)). Estos granos de polen $2n$ pueden afectar la fertilidad al producir gametos con un número cromosómico elevado, influyendo en la producción de progenie viable y poliploide ([Ramsey & Schemske, 1998](#)). Diferentes estudios han demostrado que las tasas de producción de gametos $2n$ son variables, generalmente bajas ($<0,5\%$, pero véase [Ramsey & Schemske, 1998](#)), e influenciadas por factores ambientales ([Harlan & de Wet, 1975](#); [Ramsey & Schemske, 1998](#); [Mason *et al.*, 2011](#); [Kovalsky *et al.*, 2012](#); [De Storme & Geelen, 2013](#); [Kreiner *et al.*, 2017](#)). Teniendo en cuenta que los gametos reducidos de un triploide pueden ser $n=x$ o $n=2x$ y que los gametos no reducidos son $2n=3x$, se observó en el citotipo triploide que el 0,9% de granos de polen puede clasificarse como gametos $2n=3x$, y en el citotipo diploide un 6,98% de los granos de polen serían no reducidos $2n=2x$. En un estudio de poliploides pares de *Paspalum*, [Pagliarini *et al.* \(1999\)](#), encontraron frecuencias de 0-8,4% díadas (dos gametos no reducidos $2n$) y 0-15,8% tríadas (al menos un gameto no reducido $2n$) en 19 especies provenientes de Brasil. Sin embargo, no existen estudios de la variación del tamaño del grano de polen en triploides del género *Paspalum*, pero estudios similares en otros géneros han mostrado que esta variación en tamaño podría indicar diferencias en el nivel de ploidía (revisado en [Bretagnolle & Thompson, 1995](#); [Dewitte *et al.*, 2012](#); [Kovalsky *et al.*, 2018](#)). Por ejemplo, en los análisis de triploides de *Turnera sidoides* L., la frecuencia de granos de polen $2n$ y $4n$ fueron de 0,07 y 0,02% respectivamente ([Kovalsky *et al.*, 2018](#)); mientras que en híbridos interespecíficos de dos especies diploides silvestres de *Arachis* L. se observó la formación de 0,02-1,35% gametos $2n$ y de 0-0,25% gametos $4n$ ([García *et al.*, 2020](#)). En el análisis de diploides de *Ipomoea trifida* G. Don, se observó hasta un 20% de gametos $2n$ ([Orjeda *et al.*, 1990](#)), mientras que en diploides de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen y *P. tuberosa* (Spreng.) Hicken se observó entre 1,4-18,9% de gametos $2n$ ([Taschetto & Pagliarini, 2003](#)). Por otra parte, la evidencia indirecta de los cruces experimentales en *Achillea borealis*

Bong. mostró que la variación en la tasa de producción de polen no reducido no tuvo un impacto estadístico en el nivel de ploidía de la progenie (Ramsey, 2007), y la progenie triploide en *Dioscorea alata* L. solo se produjo en casos en los que el saco embrionario no estaba reducido (Nemorin *et al.*, 2013). Sin embargo, en *Turnera sidoides* se observó progenie triploide originada por gametas no reducidas de la vía materna como paterna (Kovalsky & Solis Neffa, 2016). Estos hallazgos son particularmente notables debido a la fuerte influencia que se cree que tienen los triploides en la formación de linajes autoploidos, ya que estos suelen tener una fertilidad reducida (Kohler *et al.*, 2010), pero con frecuencia producen altas proporciones de gametos no reducidos que pueden aumentar la probabilidad de formar nuevos tetraploides (Ramsey & Schemske, 1998). Si bien la frecuencia observada de gametos no reducidos en el citotipo diploide y triploide de *P. indecorum* fue baja, la existencia de estos gametos $2n$ podría indicar que estarían involucrados en la formación de nuevos individuos poliploides en el género.

Una vez que el triploide primario ha superado las restricciones reproductivas causadas por su condición genética/cromosómica, debe superar las restricciones demográficas. Dado que un neotriploide primario necesariamente estará inserto en una población parental diploide que carece de otros poliploides, sufrirá una fuerte selección negativa dependiente de la frecuencia a través de apareamientos ineficaces con diploides (Levin, 1975). Mientras que los diploides circundantes producen abundantes gametos haploides ($n=x$), los triploides producen un menor número de gametos, en su mayoría aneuploides, que exhiben una variedad de combinaciones cromosómicas (e.g. de $n=1x-2x$ a $2n=3x$) (Ramsey & Schemske, 1998; Henry *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2007; Duszynska *et al.*, 2013). Además, una proporción de dos genomas maternos por un genoma paterno ($2m:1p$) es un impedimento para el desarrollo normal del endospermo, lo que asigna una fuerte selección contra los gametos aneuploides a favor de los gametos euploides (Ramsey & Schemske, 1998; 2002; Henry *et al.*, 2005; Lafon-Placette & Köhler, 2016). Por lo tanto, la formación exitosa de semillas generalmente ocurre cuando ambos gametos coinciden con sus números de cromosomas. En el análisis del origen reproductivo por citometría de flujo de semillas se observó que los gametos euploides reducidos $n=x$ como los $n=2x$ del triploide son funcionales, dando origen a nuevos individuos triploides ($n=2x + n=x$; 3,3-33,3%) y diploides ($n=x + n=x$; 66,7-96,7%), respectivamente.

En la naturaleza, la selección de descendencia euploide ocurre durante las primeras generaciones después de la formación de triploides y, por lo tanto, debe ser concurrente con el estado de shock genómico observado después de eventos de poliploidización y/o hibridación (Hojsgaard, 2018). Dicho estado se refiere a inestabilidades genómicas causadas por reordenamientos cromosómicos, pérdida de genes y alteraciones epigenéticas que conllevan a inestabilidades fenotípicas (e.g. Comai *et al.*, 2000; Adams & Wendel, 2005; Stupar *et al.*, 2007; Madlung & Wendel, 2013). Durante este período, el éxito del nuevo poliploide se ve obstaculizado por la letalidad de la planta o la esterilidad reproductiva (Mayrose *et al.*, 2011; De Storme & Mason, 2014). En este trabajo se pudo observar que los cruzamientos entre citotipos diploides y triploides de *P. indecorum* mostraron diferencias en la fertilidad, dependiendo del rol que cumple el citotipo triploide (parental femenino vs parental masculino). Cuando el citotipo triploide actúa como dador de polen, el índice de hibridación (H), germinación (G) y supervivencia (L) fueron más altos al valor promedio de H, G y L cuando actúa como planta madre en los cruzamientos controlados. Diferentes estudios experimentales muestran altos niveles de apareamientos ineficaces en cruzamientos $2x \times 3x$ que disminuyen la aptitud y fertilidad triploide (e.g. Henry *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2007; Rounsaville *et al.*,

2011). Los resultados obtenidos en cuanto al número de híbridos heteroploides obtenidos podría indicar que los gametos masculinos y femeninos son exitosos a la hora de formar cigotos viables.

Por otro lado, Reutemann *et al.* (2022a) observó la presencia de gametos femeninos apomícticos (*i.e.* presencia de sacos embrionarios apospóricos) en el citotipo triploide estudiado en este trabajo. La presencia de estos sacos embrionarios apospóricos confiere una mayor estabilidad cromosómica ya que eluden la meiosis. Se ha observado que en ciertas condiciones los sacos embrionarios apomícticos en *Paspalum* pueden ser fecundados (no hay desarrollo partenogenético) dando origen a progenie del tipo BIII, lo que conlleva un aumento del nivel de ploidía en la progenie, y en ciertos casos una estabilización cromosómica al restituir la poliploidía par (Martínez *et al.*, 1994; Espinoza *et al.*, 2000; 2002). Esto se pudo observar en el análisis por citometría de los niveles de ploidía de la progenie donde el citotipo triploide actuó como madre, donde se identificaron individuos tetraploides, pentaploides y hexaploides en baja frecuencia. Sin embargo, se observó que la mayor parte de la progenie obtenida (independientemente de si el citotipo triploide actuó como madre o padre) es de origen sexual, lo que refuerza la idea de que los gametos femeninos y masculinos euploides reducidos ($n=x$ o $n=2x$) del triploide son funcionales y participan en la reproducción sexual. En la naturaleza, solo se conocen tres casos de especies triploides sexuales y semifértiles. En esos triploides, existen mecanismos meióticos inusuales que permiten mantener una poliploidía impar permanente a través de segregaciones cromosómicas y genómicas asimétricas en gametos femeninos y masculinos [*Leucopogon juniperinus* R. Br. (Smith-White, 1948); *Cardamine x insueta* Urbanska-Worytkiewicz (Urbanska-Worytkiewicz, 1977; Grant, 1981); y *Andropogon ternatus* (Spreng.) Nees (Norrman & Quarin, 1987)]. Todos los demás triploides conocidos mantienen su fertilidad saltándose la meiosis y reproduciéndose a través de la apomixis, un mecanismo que produce gametos femeninos no reducidos ($2n$) y embriones sin requerir una contribución masculina [*e.g.* *Erigeron annuus* Pers. (Noyes, 2000); *Eupatorium sessilifolium* L. (Sullivan, 1976; Grubbs *et al.*, 2009); *Hieracium alpinum* L. (Mráz *et al.*, 2009); *Paspalum quadrifarium* Lam. (Quarin & Lombardo, 1986); y *Taraxacum officinale* F. H. Wigg. (van Dijk, 2003)]. La principal ventaja adaptativa de la apomixis es la restauración de la fertilidad en individuos sexualmente estériles (Hojsgaard, 2018). La aparición de mecanismos que evitan las anomalías meióticas e imponen barreras interploides a las parejas diploides masculinas circundantes mantiene la fertilidad y tiene fuertes consecuencias en el rendimiento funcional de las plantas triploides. En el caso del citotipo triploide de *P. indecorum*, parecería que la vía sexual es más efectiva que la apomíctica a la hora de originar descendencia.

Por último, la supervivencia de las plántulas mostró una disminución significativa después de la infestación por arañuelas (*Tetranychus* spp.). Esto podría indicar el rol del factor ambiental en la determinación del éxito evolutivo de la progenie de poliploides impares, ya que, aunque la viabilidad inicial es alta, las plántulas podrían enfrentar dificultades en ambientes con alta presión, limitando su establecimiento en poblaciones naturales (Hojsgaard, 2018). Sin embargo, deberían realizarse experimentos controlados para determinar fehacientemente el rol del ambiente en el establecimiento de los triploides y ploidías mayores en *P. indecorum*.

Conclusiones

Esta tesis tuvo como objetivo caracterizar citogenéticamente y reproductivamente a los citotipos triploides naturales del género *Paspalum*, y como especie modelo, se usó a *Paspalum indecorum*.

Se observó que el citotipo triploide de *P. indecorum* es autopoliploide, con una alta frecuencia de formación de trivalentes (3-10III por PMC). Además, este citotipo presentó anomalías en la microsporogénesis produciendo micrósporas de diferentes tamaños, sin embargo, la viabilidad del polen fue alta (92,7%). Esto podría indicar, que a pesar de las irregularidades meióticas observadas en el citotipo triploide, la viabilidad de los gametos masculinos no se ve comprometida.

En cuanto a la fertilidad, germinación y supervivencia, los resultados mostraron que el citotipo triploide actuó con mayor éxito reproductivo cuando fue utilizado como parental paterno que cuando actuó como parental materno (en promedio). Sin embargo, en algunas familias donde actuó como parental materno el índice de supervivencia fue comparativamente más alto que el observado en la familia donde actuó de dador de polen.

Por último, el análisis por citometría de flujo de las semillas y la prueba de progenie con ISSRs reveló que la reproducción sexual fue predominante en el citotipo triploide, a pesar de haber reportes previos de presentar sacos embrionarios apospóricos. No obstante, en el análisis de la ploidía de la progenie se identificaron algunos individuos con niveles de ploidía mayores al triploide (tetraploides a hexaploides), lo que indicaría que los gametos no reducidos ($2n=3x$) o reducidos ($n=2x$) del citotipo triploide podrían actuar en la vía de formación de neopoliploides mayores en el género.

Estos resultados amplían el conocimiento sobre la biología reproductiva de los citotipos triploides en *Paspalum* y destacan su importancia en la evolución adaptativa de los complejos poliploides agámicos del género, destacando la importancia de los citotipos triploides en el proceso de poliploidización unilateral.

Bibliografía

- Adams KL, Wendel JF (2005). Allele-specific, bidirectional silencing of an alcohol dehydrogenase gene in different organs of interspecific diploid cotton hybrids. *Genetics* 171: 2139–2142.
- Arrigo N, Barker MS (2012). Rarely successful polyploids and their legacy in plant genomes. *Current Opinion in Plant Biology* 15: 140–146.
- Asker SE, Jerling L (1992). *Apomixis in plants*. CRC Press, Boca Raton, pp. 1-298.
- Bretagnolle FA, Thompson JD (1995). Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytologist* 129(1): 1-22.
- Burson BL (1979). Cytogenetics of *Paspalum urvillei* x *P. intermedium* and *P. dilatatum* x *P. paniculatum* hybrids. *Crop Science* 19:534–538.
- Burson BL, Bennett HW (1972). Cytogenetics of *Paspalum urvillei* x *P. juergensii* and *P. urvillei* x *P. vaginatum* hybrids. *Crop Science* 12:105–108.
- Chase A (1929). The North American species of *Paspalum*, 28(1). US Government Printing Office.
- Comai L, Tyagi AP, Winter K, Holmes-Davis R, Reynolds SH, Stevens Y, Byers B (2000). Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed *Arabidopsis* allotetraploids. *Plant Cell* 12: 1551–1567.
- Darlington CD (1937). *Recent advances in cytology* (2nd ed.). London: J. and A. Churchill.
- De Souza-Kaneshima AM, Simioni C, Felismino MF, Mendes Bonato AB, Risso-Pascotto C, Pessim C, Pagliarini MS, Do Valle CB (2010). Meiotic behaviour in the first interspecific hybrids between *Brachiaria brizantha* and *Brachiaria decumbens*. *Plant Breeding* 129:186–191.
- De Storme N, Geelen D (2013). Sexual polyploidization in plants –cytological mechanisms and molecular regulation. *New Phytologist* 198, 670–684.
- De Storme N, Mason A (2014). Plant speciation through chromosome instability and ploidy change: cellular mechanisms, molecular factors and evolutionary relevance. *Current Plant Biology* 1: 10–33.
- Dewitte A, Van Laere K, Van Huylbroeck J (2012). Use of $2n$ gametes in plant breeding. In I. Y. Abdurakhmonov (Ed.), *Plant breeding* (pp. 59–86). Rijeka, Croatia: In Tech Open Access Publisher.
- Duszynska D, McKeown PC, Juenger TE, Pietraszewska-Bogiel A, Geelen D, Spillane C (2013). Gamete fertility and ovule number variation in selfed reciprocal F_1 hybrid triploid plants are heritable and display epigenetic parent-of-origin effects. *New Phytologist* 198: 71–81.
- Espinoza F, Quarin CL (2000). $2n+ n$ hybridization of apomictic *Paspalum dilatatum* with diploid *Paspalum* species. *International Journal of Plant Sciences* 161(2): 221-225.
- Espinoza F, Pessino SC, Quarin CL, Valle EM (2002). Effect of pollination timing on the rate of apomictic reproduction revealed by RAPD markers in *Paspalum notatum*. *Annals of Botany* 89(2): 165-170.
- Feulgen R, Rossenbeck H (1924). Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nukleinsäure vom Typus der Thymonukleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 135:203–249
- Galdeano F, Urbani MH, Sartor ME, Honfi AI, Espinoza F, Quarin CL (2016). Relative DNA content in diploid, polyploid, and multiploid species of *Paspalum* (Poaceae) with relation to reproductive mode and taxonomy. *Journal of Plant Research* 129: 697-710.
- García AV, Ortiz AM, Silvestri MC, Custodio AR, Moretzsohn MC, Lavia GI (2020). Occurrence of $2n$ microspore production in diploid interspecific hybrids between the wild parental species of peanut

- (*Arachis hypogaea* L., Leguminosae) and its relevance in the genetic origin of the cultigen. *Crop Science* 60(5): 2420-2436.
- Grant V (1981). *Plant Speciation*, 2nd Edn. New York, NY: Columbia University Press
- Grubbs KC, Small RL, Schilling EE (2009). Evidence for multiple, autopoloid origins of agamosperous populations in *Eupatorium sessilifolium* (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution* 279: 151–161.
- Harlan JR, de Wet MJM (1975). On Ö. Winge and a prayer: the origins of polyploidy. *The Botanical Review* 41: 361–390.
- Henry IM, Dilkes BP, Young K, Watson B, Wu H, Comai L (2005). Aneuploidy and genetic variation in the *Arabidopsis thaliana* triploid response. *Genetics* 170: 1979–1988.
- Henry IM, Dilkes BP, Comai L (2007). Genetic basis for dosage sensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics* 3:e70.
- Hojsgaard D (2018). Transient Activation of Apomixis in Sexual Neotriploids May Retain Genomically Altered States and Enhance Polyploid Establishment. *Frontiers in Plant Sciences* 9:230.
- Hojsgaard D, Hörandl E (2019). The Rise of Apomixis in Natural Plant Populations. *Frontiers in Plant Sciences* 10:358.
- Hojsgaard D, Pullaiah T (2023). Apomixis in angiosperms: mechanisms, occurrences, and biotechnology. CRC Press
- Husband BC (2004). The role of triploid hybrids in the evolutionary dynamics of mixed-ploidy populations. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 537–546.
- Jiao Y, Wickett NJ, Ayyampalayam S, Chanderbali AS, Landherr L, Ralph PE, Tomsho LP, Hu Y, Liang H, Soltis PS, Soltis DE, Clifton SW, Schlarbaum SE, Schuster SC, Ma H, Leebens-Mack J, de Pamphilis CW (2011). Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature* 473:97-100.
- Judziewicz EJ (1990). *Paspalum*. En (ed.) Görts-Van Rijn ARA, *Flora of the Guianas* 8: 453-515
- Khush G (1973). Cytogenetics of Aneuploids. New York, NY: Academic Press.
- Köhler C, Mittelsten Scheid O, Erilova A (2010). The impact of the triploid block on the origin and evolution of polyploid plants. *Trends in Genetics* 26: 142–148.
- Kovalsky IE, Solís Neffa VG (2012). Evidence of $2n$ microspore production in a natural diploid population of *Turnera sidoides* subsp. *carnea* and its relevance in the evolution of the *T. sidoides* (Turneraceae) autopolyploid complex. *Journal of Plant Research* 125: 725–734.
- Kovalsky IE, Fernández A, Solís Neffa VG (2014). Mecanismos citológicos involucrados en la producción de gametos masculinos no reducidos en individuos diploides de *Turnera sidoides* subsp. *carnea* (Passifloraceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 49(2): 227-234.
- Kovalsky IE, Neffa VG (2016). Evidence of the production of $2n$ eggs in diploid plants of the autopolyploid complex *Turnera sidoides* L. (Passifloraceae). *Plant Systematics and Evolution* 302:357–366.
- Kovalsky IE, Roggero Luque JM, Elías G, Fernández SA, Solís Neffa VG (2018). The role of triploids in the origin and evolution of polyploids of *Turnera sidoides* complex (Passifloraceae, Turneroideae). *Journal of plant research* 131: 77-89.
- Kreiner JM, Kron P, Husband BC (2017). Frequency and maintenance of unreduced gametes in natural plant populations: associations with reproductive mode, life history and genome size. *New Phytologist* 214: 879–889.
- Lafon-Placette C, Köhler C (2016). Endosperm-based postzygotic hybridization barriers: developmental mechanisms and evolutionary drivers. *Molecular Ecology* 25: 2620–2629.

- Levin DA (1975). Minority cytotype exclusion in local plant populations. *Taxon* 24: 35–43.
- Madlung A, Wendel JF (2013). Genetic and epigenetic aspects of polyploid evolution in plants. *Cytogenetic and Genome Research* 140: 270–285.
- Martínez EJ, Espinoza F, Quarín CL (1994). BIII Progeny ($2n + n$) from apomictic *Paspalum notatum* obtained through early pollination. *Journal of Heredity* 85: 295–297.
- Martínez EJ, Acuña CA, Hojsgaard DH, Tcach MA, Quarín CL (2007). Segregation for asexual seed production in *Paspalum* achieved by male gametes of apomictic triploid plants. *Annals of Botany* 100: 1239–1247.
- Mason A, Nelson MN, Yan G, Cowling WA (2011). Production of viable male unreduced gametes in *Brassica* interspecific hybrids is genotype specific and stimulated by cold temperatures. *Plant Biology* 11:103.
- Matzk F, Meister A, Schubert I (2000). An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. *Plant Journal* 21:97–108.
- Mayrose I, Zhan SH, Rothfels CJ, Magnuson-Ford K, Barker MS, Rieseberg LH, Otto SP (2011). Recently formed polyploid plants diversify at lower rates. *Science* 333:1257.
- Meier U, Bleiholder H, Buhr L, Feller C, Hack H, Hess M, Lancashire PD, Schnock U, Stauss R, van den Boom T, Weber E, Zwerger P (2009). The BBCH system to coding the phenological growth stages of plants – history and publications. *Journal für Kulturpflanz* 61:41–52
- Meirmans PG, Van Tienderen PH (2004). GENOTYPE and GENODIVE: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Molecular Ecology Notes* 4(4):792–794.
- Mráz P, Chrtek J, Šingliarova B (2009). Geographical parthenogenesis, genome size variation and pollen production in the arctic-alpine species *Hieracium alpinum*. *Botanica Helvetica* 119: 41–51.
- Nemorin A, David J, Maledon E, Nudol E, Dalon J, Arnau G (2013). Microsatellite and flow cytometry analysis to help understand the origin of *Dioscorea alata* polyploids. *Annals of Botany* 112(5): 811–819
- Nicora E, Rúgolo de Agrasar Z (1987). *Los géneros de las gramíneas de América Austral (Argentina, Chile, Uruguay y áreas limítrofes de Bolivia, Paraguay y Brasil)*. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- Nogler GA (1984). Gametophytic apomixis en *Embryology of Angiosperms* Eds. Johri BM. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 475-518.
- Norrman GA, Quarín CL (1987). Permanent odd polyploidy in a grass (*Andropogon ternatus*). *Genome* 29: 340–344.
- Norrman GA, Quarín CL, Burson BL (1989). Cytogenetics and reproductive behavior of different chromosome races in six *Paspalum* species. *Journal of Heredity* 80(1): 24-28.
- Noyes RD (2000). Diplospory and parthenogenesis in sexual and agamospermous (apomictic) *Erigeron* (Asteraceae) hybrids. *International Journal of Plant Sciences* 161: 1–12.
- Orjeda G, Freyre R, Iwanaga M (1990). Production of $2n$ Pollen in Diploid *Ipomoea trifida*, a Putative Wild Ancestor of Sweet Potato, *Journal of Heredity* 81(6): 462–467
- Ortiz JPA, Quarín CL, Pessino SC, Acuña CA, Martínez EJ, Espinoza F, Hojsgaard DH, Sartor ME, Cáceres ME, Pupilli F (2013). Harnessing apomictic reproduction in grasses: what we have learned from *Paspalum*. *Annals of Botany* 112(5): 767-787.
- Oswald BP, Nuismer SL (2011). A unified model of autopolyploid establishment and evolution. *American Naturalist* 178: 687–700.

- Pagliarini MS, Takayama SY, De Freitas PM, Carraro LR, Adamowski EV, Silva N, Batista LAR (1999). Failure of cytokinesis and 2n gamete formation in Brazilian accessions of *Paspalum. Euphytica* 108: 129-135.
- Pagliarini MS, Carraro LR, Freitas PM, Adamowski EV, Batista LAR, Valls JFM (2001). Cytogenetic characterization of Brazilian *Paspalum* accesions. *Hereditas* 135:27–34.
- Peakall R, Smouse PE (2006). GENALEX 6: genetic analysis in excel. *Molecular Ecology Notes* 6:288–295.
- Quarin CL, Hanna WW, Fernández A (1982). Genetic studies in diploid and tetraploid *Paspalum* species. *Journal of Heredity* 73(4): 254-256.
- Quarin CL, Burson BL, Burton GW (1984). Cytology of Intra- and Interspecific Hybrids between two Cytotypes of *Paspalum notatum* and *P. cromyorrhizon*. Source: *Botanical Gazette* 145(3): 420-426.
- Quarin CL, Lombardo EP (1986). Niveles de ploidía y distribución geográfica de *Paspalum quadrifarium* (Gramineae). *Mendeliana* 7: 101–107
- Quarin CL, Burson BL (1991). Cytology of sexual and apomictic *Paspalum* species. *Cytologia* 56(2): 223-228.
- Quarin CL (1992). The nature of apomixis and its origin in panicoid grasses. *Apomixis Newsletter* 5: 8-15.
- Ramsey J (2007). Unreduced gametes and neopolyploids in natural populations of *Achillea borealis* (Asteraceae). *Heredity* 98(3): 143-150.
- Ramsey J, Schemske DW (1998). Pathways, Mechanisms, and Rates of Polyploid Formation in Flowering Plants. *Annual Review in Ecology and Systematics* 29:467-501.
- Ramsey J, Schemske DW (2002). Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Review in Ecology and Systematics* 33: 589-639.
- Rasband WS (1997-2018). ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.net/ij/>.
- Ren R, Wang H, Guo C, Zhang N, Zeng L, Chen Y, Ma H, Qi J (2018). Widespread whole genome duplications contribute to genome complexity and species diversity in angiosperms. *Molecular plant* 11(3): 414-428.
- Reutemann AV, Martínez EJ, Schedler M, Daviña JR, Hojsgaard DH, Honfi AI (2022 a). Uniparentality: Advantages for range expansion in diploid and diploid-autopolyploid species. *Botanical Journal of the Linnean Society* 200(4): 563-585.
- Reutemann AV, Honfi AI, Karunarathne P, Eckers F, Hojsgaard DH, Martínez EJ (2022 b). Variation of residual sexuality rates along reproductive development in apomictic tetraploids of *Paspalum*. *Plants* 11(1639): 1-17.
- Reutemann AV, Honfi AI, Karunarathne P, Eckers F, Hojsgaard DH, Martínez EJ (2024). Comparative analysis of molecular and morphological diversity in two diploid *Paspalum* species (Poaceae) with contrasting mating systems. *Plant Reproduction* 37: 15–32.
- Rounsaville TJ, Touchell DH, Ranney TG (2011). Fertility and reproductive pathways in diploid and triploid *Miscanthus sinensis*. *HortScience* 46: 1353–1357.
- Siopa C, Dias MC, Castro M, Loureiro J, Castro S. (2020). Is selfing a reproductive assurance promoting polyploid establishment? Reduced fitness, leaky self-incompatibility and lower inbreeding depression in neotetraploids. *American Journal of Botany* 107(3): 1–13.
- Smith-White S (1948). The life history and genetic system of *Leucopogon juniperinus*. *Heredity* 9, 79–91.

- Soltis DE, Soltis PS, Tate JA (2004). Advances in the study of polyploidy since plant speciation. *New phytologist* 161(1): 173-191.
- Soltis DE, Soltis PS, Schemske DW, Hancock JF, Thompson JN, Husband BC, Judd WS (2007). Autopolyploidy in angiosperms: have we grossly underestimated the number of species? *Taxon* 56(1):13-30.
- Soltis PS, Soltis DE (2016). Ancient WGD events as drivers of key innovations in angiosperms. *Current opinion in plant biology* 30: 159-165.
- Stebbins GL (1950). Variation and evolution in plants. Geoffrey Cumberlege; London, pp. 1-643.
- Stupar RM, Bhaskar PB, Yandell BS, Rensink WA, Hart AL, Ouyang S, Veilleux RE, Busse JS, Erhardt RJ, Buell CR, Jiang J (2007). Phenotypic and transcriptomic changes associated with potato autopolyploidization. *Genetics* 176: 2055–2067.
- Suda J, Herben T (2013). Ploidy frequencies in plants with ploidy heterogeneity: fitting a general gametic model to empirical population data. *Proceedings of the Royal Society B* 280:20122387.
- Sullivan V (1976). Diploidy, polyploidy, and agamospermy among species of *Eupatorium* (Compositae). *Canadian Journal of Botany* 54: 2907–2917
- Taschetto OM, Pagliarini MS (2003). Occurrence of $2n$ and jumbo pollen in the Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata* and *P. tuberosa*). *Euphytica* 133(1):139-145.
- Urbanska-Worytkiewicz K (1977). Reproduction in natural triploid hybrids ($2n = 24$) between *Cardamine rivularis* Schur and *C. amara* L. *Berichten des Geobotanisches Institutes der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Stiftung Rübel* 44: 42–85.
- van Dijk PJ (2003). Ecological and evolutionary opportunities of apomixis: insights from *Taraxacum* and *Chondrilla*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences* 358: 1113–1121.
- Ziegler C, Martínez EJ, Honfi AI, Reutemann AV (2024). Discovery of natural *Paspalum* L. (Poaceae) triploid hybrids near sympatric populations of *Paspalum urvillei* Steud. and species of Paniculata group in northeastern Argentina. *Euphytica* 220: 78.
- Zuloaga FO, Morrone O (2005). Revisión de las especies de *Paspalum* para América del sur Austral. *Monographs in Systematics Botany*, Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, MO 102: 1-297.