

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**“RESPUESTA A LA APLICACIÓN DE POLIPLOIDIZADORES EN
SEMILLAS DE CAÑIHUA (*Chenopodium pallidicaule* Aellen)”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERA AGRÓNOMA**

DAYANA KEILA BUSTAMANTE ALCALDE

LIMA – PERÚ

2024

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

RESPUESTA A LA APLICACIÓN DE POLIPLOIDIZADORES EN SEMILLAS DE CAÑIHUA (*Chenopodium pallidicaule* Aellen)

INFORME DE ORIGINALIDAD

7 %	7 %	2 %	2 %
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.unsa.edu.pe Fuente de Internet	2 %
2	tesis.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
3	dokumen.pub Fuente de Internet	<1 %
4	repositorio.uan.edu.co Fuente de Internet	<1 %
5	repositorio.cinvestav.mx Fuente de Internet	<1 %
6	ri.uaemex.mx Fuente de Internet	<1 %
7	Susanne Steudler, Ulrike Böhmer, Jost Weber, Thomas Bley. "Biomass measurement by flow cytometry during solid-state fermentation of basidiomycetes", Cytometry Part A, 2014 Publicación	<1 %

repositorio.una.edu.ni

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE AGRONOMÍA

**“RESPUESTA A LA APLICACIÓN DE POLIPLOIDIZADORES EN
SEMILLAS DE CAÑIHUA (*Chenopodium pallidicaule* Aellen)”**

DAYANA KEILA BUSTAMANTE ALCALDE

Tesis para optar el título de:

INGENIERA AGRÓNOMA

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

**Dra. Luz Gómez Pando
PRESIDENTE**

**PhD. Jorge Jiménez Dávalos
ASESOR**

**Dr. Erick Espinoza Núñez
MIEMBRO**

**Dr. Raúl Blas Sevillano
MIEMBRO**

**LIMA – PERÚ
2024**

DEDICATORIA

A mi madre, por su constante apoyo y recordarme que no debo darme por vencida.

A mi padre, por su amor incondicional y por contribuir a convertirme en la persona que soy ahora.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Elena y Mauro, les agradezco por su amor incondicional, su apoyo constante y las valiosas lecciones que me han brindado a lo largo de la vida.

A la Universidad Agraria La Molina, mi segunda casa, agradezco por ir más allá de la enseñanza académica, por regalarme amistades para toda la vida y por brindarme una etapa maravillosa de mi vida.

Al PhD. Jorge Jiménez, mi asesor de tesis, quien ha sido más que un guía académico. Nuestro vínculo comenzó en 2017 durante el curso de Biotecnología y Micropropagación, y desde entonces su apoyo ha sido invaluable.

Al programa de cereales, agradezco a la Sra. Ruthy, quien ha sido como una segunda madre, siempre engriéndonos y regañándonos cuando era necesario.

A mis compañeros de laboratorio, quienes han convertido los días en experiencias llevaderas. Gracias por esas charlas interminables durante los almuerzos y por brindarme otra perspectiva de la ciencia y la investigación.

Al Ing. Geancarlo, quien ha sido como un coasesor desde el inicio de este largo proyecto.

A mis amigas y amigos más cercanos, quienes estuvieron a mi lado en largas jornadas y me ayudaron en la parte experimental. Su apoyo ha sido inestimable.

Por último, quiero agradecerme a mí. A pesar de los desafíos, nunca me rendí. Cada obstáculo superado valió la pena, y estoy agradecida por no haberme detenido. Al final, cada peldaño ascendido ha sido un logro que ha valido el esfuerzo.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	OBJETIVO GENERAL	2
1.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
II.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1.	ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN	3
2.2.	BOTÁNICA Y TAXONOMÍA	4
2.2.1.	Morfología.....	4
2.2.2.	Taxonomía.....	5
2.3.	VALOR NUTRICIONAL	6
2.4.	PRODUCCIÓN Y MERCADO DE CAÑIHUA.....	7
2.5.	MEJORAMIENTO GENÉTICO.....	8
2.5.1.	Estudios citológicos y genéticos aplicados al mejoramiento genético.....	9
2.6.	POLIPLOIDÍA	10
2.6.1.	Ventajas de los poliploides.....	11
2.6.2.	Desventajas de los poliploides	12
2.6.3.	Inducción artificial	12
2.6.4.	Concentración y tiempo de exposición de los agentes antimitóticos.....	15
2.7.	MÉTODOS DIRECTOS PARA LA ESTIMACIÓN DEL NIVEL DE PLOIDÍA	15
2.7.1.	Estimación del nivel de ploidía	15
2.7.2.	Tamaño de genoma en plantas	19
2.7.3.	Parámetros asociados al nivel de ploidía	23
2.8.	USO DE POLIPLOIDES EN LA INDUSTRIA	25
III.	METODOLOGÍA	28
3.1.	UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO	28
3.2.	MATERIALES	28
3.2.1.	Material vegetal.....	28
3.2.2.	Materiales	28
3.3.	METODOLOGÍA.....	29
3.3.1.	Prueba de germinación	29
3.3.2.	Desinfección de semillas de cañihua.....	29
3.3.3.	Tratamiento en colchicina	29

3.3.4. Tratamiento en orizalina	30
3.4. EVALUACIONES	31
3.4.1. En macetas	31
3.4.2. En hojas	32
3.4.3. En grano de polen.....	33
3.4.4. Determinación del nivel de ploidía	34
3.4.5. Determinación del tamaño de genoma	35
3.4.6. Análisis estadístico.....	35
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
4.1. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE AGENTES ANTIMITÓTICOS EN LA GERMINACIÓN DE LA SEMILLA DE CAÑIHUA.....	37
4.2. EFECTO DE LOS AGENTES ANTIMITÓTICOS EN LA SUPERVIVENCIA EN PLANTAS DE CAÑIHUA.	39
4.3. IDENTIFICACIÓN DE PARÁMETROS MORFOLÓGICOS DE POLIPLOIDES EN EL CULTIVO DE CAÑIHUA.	40
4.3.1. Engrosamiento del hipocótilo en las plántulas.....	40
4.3.2. Altura de planta de cañihua.....	41
4.3.3. Engrosamiento de hoja en plantas poliploides de cañihua.....	42
4.3.4. Retraso fenológico en plantas poliploides de cañihua	43
4.4. DIFERENCIAS ESTOMÁTICAS EN POLIPLOIDES.....	43
4.4.1. Largo de estoma	43
4.4.2. Ancho de estoma	45
4.4.3. Densidad estomática.....	46
4.5. DIÁMETRO DE POLEN	47
4.6. RELACIÓN ENTRE PARÁMETROS MORFOLÓGICOS Y CITOLÓGICOS Y NIVEL DE PLOIDÍA.	48
4.7. COMPARACIÓN DE CONCENTRACIONES ÓPTIMAS PARA LA INDUCCIÓN DE POLIPLOIDÍA EN SEMILLAS DE CAÑIHUA: ESTUDIO CON COLCHICINA Y ORIZALINA	51
4.8. ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE GENOMA DE CAÑIHUA (<i>chenopodium pallidicaule a.</i>) VAR. ILLPA INIA.....	52
V. CONCLUSIONES.....	54
VI. RECOMENDACIONES.....	55
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición nutricional de la cañihua y otros granos. Traducido de Rodriguez et al. (2020).	6
Tabla 2: Variedades y cultivares de Bolivia y Perú (Tapia et al., 2019).....	9
Tabla 3: Descripción de poliploides.	10
Tabla 4: Agentes antimitóticos químicos más utilizados para la inducción de poliploides.	13
Tabla 5: Agentes inhibidores de huso acromático más utilizados durante el pretratamiento (Maluszynska, 2003).	15
Tabla 6: Soluciones tampón para aislamiento de núcleos más utilizados en citometría de flujo (Cires et al., 2011; Doležel et al., 2007; Loureiro et al., 2006).....	18
Tabla 7 : Características de algunos fluorocromos utilizados para citometría de flujo.....	18
Tabla 8: Estándares de referencia recomendados para la estimación de contenido de ADN (Dolezel et al., 2007).....	22
Tabla 9: Estudios relacionados entre la ploidía y el tamaño de polen reportados por familia, genero, variación de ploidía y como la duplicación de ADN puede cambiar el volumen del polen.	25
Tabla 10: Insumos, materiales y equipos empleados en la investigación.	28
Tabla 11: Descripción de los tratamientos con colchicina	36
Tabla 12: Descripción de los tratamientos con orizalina.	36
Tabla 13: Germinación de colchicina y orizalina a los 4 DDS considerando el efecto de los solventes de los agentes antimitóticos (Colchicina T1: DMSO AL 2% y Orizalina T1: Alcohol al 40%).	39
Tabla 14: Resumen datos morfológicos para colchicina.....	49
Tabla 15: Resumen de características morfológicas para orizalina.....	50
Tabla 16: Eficiencia e inducción de poliploidización en cañihua con colchicina y orizalina.	51
Tabla 17: Estimación del contenido de ADN de la cañihua.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribución de la cañihua en Perú y Bolivia (Repo-Carrasco, 1988).....	3
Figura 2: Raíces de Cañihua (Apaza, 2010).....	4
Figura 3: Inflorescencia de cañihua.	5
Figura 4: Hábitos de crecimiento de la cañihua (IPGRI, 2019).....	5
Figura 5: Producción de cañihua durante campaña 2015-2016 (MIDAGRI, 2016)	7
Figura 6: Tendencia de crecimiento de la cañihua. Tomado de Mayta (2019).	8
Figura 7: Flujograma del funcionamiento citómetro de flujo	17
Figura 8: Mecanismo de acción del yoduro de propidio. Tomado de R&D System.	19
Figura 9: Histograma de tamaño de genoma de diferentes angiospermas (Temsch et al., 2021).....	20
Figura 10: Histogramas de citometría correspondientes: A) Estandarización externa B) Estandarización interna. Modificado de Doležel et al. (2007).	21
Figura 11: A) Histograma monoparamétrico, se observa la intensidad de fluorescencia (eje X) vs. el número de eventos (eje Y). B) Histograma biparamétrico Intensidad de Fluorescencia en el detector FL1 vs. el detector FL2, los puntos blancos son las células detectadas definidas como negativas (Laguado, 2007).	22
Figura 12: Flujograma conteo de cromosomas	23
Figura 13: Semillas de Illpa-INIA usadas para la investigación.....	28
Figura 14: Prueba de germinación con semillas de cañihua Illpa-INIA.	29
Figura 15: Tubos eppendorf de 2 ml con semillas de cañihua remojadas en los agentes antimetabólicos.	30
Figura 16: Cámara de germinación.	30
Figura 17: Dilución de orizalina con alcohol.	31
Figura 18: Evaluación a los 7 días después de siembra en casa malla.....	31
Figura 19: Evaluación de supervivencia a los 30 días después de siembra.	32
Figura 20: Medición de altura de planta a los 30 días después de siembra.	32
Figura 21: Hojas de cañihua para medición de estoma con la técnica del esmaltado.....	33
Figura 22: Procesamiento de muestra para análisis de citometría de flujo.	34
Figura 23: (A) Evaluación del porcentaje de germinación de la colchicina a los 4 DDS. (B) Evaluación del porcentaje de germinación de orizalina a los 4 DDS. Las líneas sobre las barras representan SD (Desviación estándar).....	38

Figura 24: Supervivencia de plantulas de cañihua durante 30 días luego de ser tratadas con colchicina y orizalina respectivamente.....	40
Figura 25: Plántula anormal y plántula normal.....	41
Figura 26: Evaluación de la altura de plantas de cañihua tratadas con: (A) Colchicina y (B) Orizalina.	41
Figura 27: Diferencia entre la altura de plantas del grupo mixoploide con un diploide. ...	42
Figura 28: (A) Hojas engrosadas planta mixoploide. (B) Hojas normales de planta diploide.	42
Figura 29: Etapas fenológicas de cañihua.....	43
Figura 30: (A) Mediciones de largo de estoma de cañihua con colchicina. (B) Mediciones del largo estomático de cañihua con orizalina.....	44
Figura 31: Diferencia en largo y ancho de estoma plantas tratadas con orizalina.	44
Figura 32: Evaluación del ancho de los estoma de las plantas tratadas con agentes poliploidizadores luego de ser agrupadas por citometría de flujo.(A) Colchicina (B) Orizalina.	45
Figura 33: Evaluación de densidad estomática a plantas tratadas con agentes: (A) Colchicina y (B) Orizalina.....	46
Figura 34: Tamaño y densidad estomática. (A) Diploide-Control (B) Mixoploide tratado con Colchicina. (C) Mixoploide tratado con Orizalina.	47
Figura 35: Evaluación del diámetro de polen en plantas de cañihua tratadas con: (A) Colchicina y (B) Orizalina.....	48
Figura 36: Diferencias entre granos de polen de cañihua con orizalina. (A) Diploide. (B) Diploide tratado. (C) Mixoploide	48
Figura 37: Correlación de Pearson entre el nivel de ploidía y los parámetros evaluados para las plantas de cañihua tratadas con colchicina.....	49
Figura 38: Correlación de Pearson entre el nivel de ploidía y los parámetros evaluados para las plantas de cañihua tratadas con orizalina.	50
Figura 39: A. Histogramas monoparamétrico de un diploide de cañihua: Histograma de un mixoploide de cañihua.....	52
Figura 40: Citometría de flujo con estándar interno <i>Pisum sativum</i> para determinación del tamaño de genoma.	53

RESUMEN

Esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de la colchicina y la orizalina en la poliploidización de las semillas de cañihua (*Chenopodium pallidicaule*), un cultivo andino de gran importancia nutricional, y su relación con las características morfológicas de las plantas resultantes. Se implementó un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos y tres repeticiones para cada agente poliploidizador. Los resultados indican que la aplicación de colchicina y orizalina aumentó significativamente el porcentaje de poliploidía. Entre los agentes poliploidizadores, la colchicina al 0.75% demostró ser la más efectiva, logrando una tasa de poliploidización del 25.85%. Además, se observaron diferencias significativas en los parámetros evaluados entre los grupos de plantas con distintos niveles de ploidía. Específicamente, el grupo mixoploide exhibió valores superiores en longitud, ancho de estoma y diámetro de polen en comparación con el grupo diploide. En la población de mixoploides, con ambos agentes (colchicina y orizalina), se observó una relación negativa con los parámetros de densidad estomática y altura de planta. En conclusión, la poliploidización de las semillas de cañihua mediante la aplicación de colchicina y orizalina podría ser una alternativa viable para la producción de plantas poliploides con características mejoradas. La citometría de flujo se revela como una herramienta útil para la determinación precisa del nivel de ploidía en las plantas.

Palabras clave: Colchicina, orizalina, poliploidía, citometría, *Chenopodium pallidicaule*.

ABSTRACT

This research aimed to evaluate the effect of colchicine and oryzalin on the polyploidization of quinoa seeds (*Chenopodium pallidicaule*), an Andean crop of great nutritional importance, and its relationship with the morphological characteristics of the resulting plants. A completely randomized design was implemented with four treatments and three replications for each polyploidizing agent. The results indicate that the application of colchicine and oryzalin significantly increased the percentage of polyploidy and mixoploidy. Among the polyploidizing agents, colchicine at 0.75% proved to be the most effective, achieving a polyploidization rate of 25.85%. Additionally, significant differences were observed in the evaluated parameters among groups of plants with different ploidy levels. Specifically, the mixoploid group exhibited higher values in length, stomatal width, and pollen diameter compared to the diploid group. In the mixoploid population, a negative relationship was observed with both agents (colchicine and oryzalin) regarding stomatal density and plant height. In conclusion, the polyploidization of quinoa seeds through the application of colchicine and oryzalin could be a viable alternative for producing polyploid plants with improved characteristics. Flow cytometry emerges as a useful tool for accurately determining the ploidy level in plants.

Key words: Colchicine, oryzalin, poliploidy, citometry, *Chenopodium pallidicaule*.

I. INTRODUCCIÓN

Los granos nativos tienen gran importancia económica y social a nivel nacional e internacional, debido a sus propiedades nutricionales y su capacidad para ser cultivados en condiciones desfavorables (sequía, salinidad, grandes altitudes y temperaturas extremas). Entre ellos destaca la quinua, kiwicha, tarwi y cañihua (Rodríguez et al., 2020).

Este estudio se enfoca en la cañihua (*Chenopodium pallidicaule* A.), una especie con un contenido proteico significativo (12,76% a 19,00%) y calidad destacada debido a sus aminoácidos esenciales como triptófano, arginina y lisina, raramente presentes en alimentos vegetales (Repo-Carrasco et al., 2003; Tapia et al., 2019); sin embargo, el cultivo enfrenta desafíos como la dehiscencia de grano, tamaño de semilla y la limitada aplicación de tecnología agrícola, resultando en bajo rendimiento y obstaculizando la expansión a mayor escala productiva (Apaza, 2010). Además, las dificultades en los procesos de mejoramiento genético generan escasez de genotipos mejorados y semillas de alta calidad (Rojas et al., 2010). Por lo mencionado, es necesario consolidar técnicas de mejoramiento y de rápido resultado. Es así como la inducción de poliploides se presenta como método eficaz, rápido y sencillo para la obtención de nuevas variedades (Thao et al., 2003). Esta ha tenido éxito en múltiples programas de mejoramiento genético en papa, alfalfa, trébol rojo, ñame, rosa, lirios y otras especies de interés económico (Rodríguez et al., 2020), donde las nuevas variedades presentan mayor tamaño de órganos (hojas, flores y semillas), vigor, rendimiento, tolerancia a estrés biótico y abiótico (Chen et al., 2020).

Los poliploides artificiales pueden obtenerse a través del tratamiento de semillas, meristemas apicales y cultivo de tejidos con agentes antimitóticos como colchicina, orizalina, trifuralina, etc. (Lam et al., 2014). Esta técnica tiene que ser adaptada para cada cultivo y requiere realizar varias pruebas para obtener la combinación ideal del agente antimitótico, tiempo de exposición y órgano de inducción (Chen et al., 2020). Por tal motivo, la presente investigación tiene como objetivo principal modificar el nivel de ploidía de la cañihua, a través del tratamiento de semillas con orizalina y colchicina.

1.1. OBJETIVO GENERAL

- Modificar el nivel de ploidía de la cañihua (*Chenopodium pallidicaule* A.) a través del tratamiento de semillas con orizalina y colchicina.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto de los agentes antimitóticos (colchicina y orizalina) en la germinación y supervivencia en las plantas de cañihua.
- Evaluar parámetros morfológicos para la identificación de poliploides en el cultivo de cañihua.
- Estudiar la relación entre el tamaño de estoma (ancho y largo) con el nivel de ploidía.
- Estudiar la relación entre la densidad estomática y el nivel de ploidía en las plantas de cañihua.
- Definir la relación entre el diámetro de polen y el nivel de ploidía en las plantas de cañihua.
- Determinar la concentración y tiempo óptimo de remojo de las semillas de cañihua en soluciones de colchicina y orizalina mediante la evaluación del porcentaje de poliploidización.
- Estimar el tamaño de genoma de la cañihua (*Chenopodium pallidicaule* A.) var. Illpa INIA.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

El primer registro documentado lo realizó Ludovico Bertonio en el año 1612 reportando la cañihua (*Chenopodium pallidicaule* A.) en su libro “Vocabulario de la lengua aymara”. Posteriormente, la denominación botánica *Chenopodium pallidicaule* se dio por el botánico suizo Paul Aellen en 1929.

Históricamente, esta planta se remonta a más de 5000 años A.C, durante las sociedad inca y preinca (Mangelson et al., 2019). En la época colonial se desestimó entre la clase media y alta, pues se asociaba sólo a culturas indígenas. A pesar de ello, se seguía cultivando en los andes por su tolerancia a factores abióticos (heladas, sequías y salinidad), su facilidad para convertirlo en harina y su alto valor nutricional (Tapia, 2000).

Su distribución es exclusiva en zonas altoandinas de Bolivia y Perú (Figura 1), desarrollándose sobre los 3700 m.s.n.m, alrededor del lago Titicaca. En Bolivia se puede encontrar en los departamentos de La Paz, Oruro y Cochabamba. Mientras que, en Perú, se extiende a regiones como Cusco, Apurímac y Huancavelica (Tapia et al., 2019).

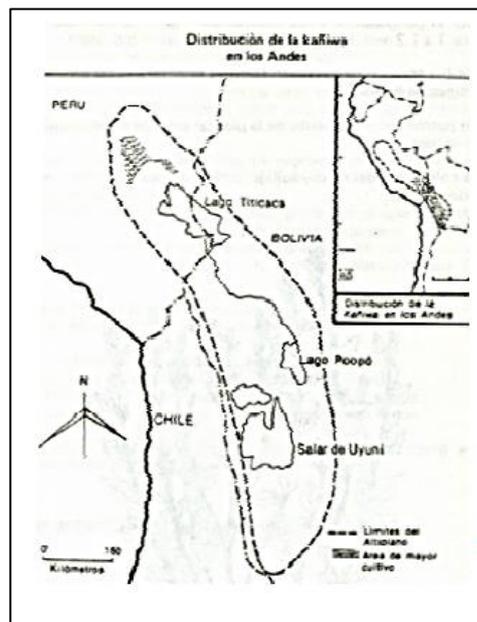


Figura 1: Distribución de la cañihua en Perú y Bolivia (Repo-Carrasco, 1988).

2.2. BOTÁNICA Y TAXONOMÍA

2.2.1. Morfología

La cañihua es una planta herbácea cuya raíz no sobrepasa los 20 cm, con escasas raicillas secundarias (Figura 2). Su ramificación comienza desde la base, su tallo principal presenta estrías y es hueco a la madurez, pudiendo alcanzar una altura de 50 a 60 cm. Las hojas son alternas con peciolo cortos con bordes dentados, que presentan 03 nervaduras marcadas en el envés. Estas hojas contienen vesículas con cristales de oxalato de calcio que controlan la transpiración excesiva y funciona como mecanismo de retención de humedad, en caso de sequías (Apaza, 2010).



Figura 2: Raíces de Cañihua (Apaza, 2010).

En cuanto a los órganos reproductivos, las inflorescencias (Figura 3) son glomérulos cimosos terminales o axilares, estando cubiertas por las hojas que protegen de temperaturas muy bajas, lo cual es una característica común en las Amaranthaceae (Spehar & de Barros Santos, 2002). Cuando se fecunda la inflorescencia comienza la formación del grano, cuyo diámetro alcanza 1,0 a 1,2 mm con un epispermo muy fino y puntiagudo de color negro, cubierto por el perigonio de color gris, translúcido y fino. En algunos casos si la planta contiene suficiente humedad la semilla puede germinar en la misma planta, por lo que estas no presentan dormancia (Apaza Mamani, 2010).



Figura 3: Inflorescencia de cañihua.

Existen 03 hábitos de crecimiento: saihua, lasta y pampalasta (Figura 4). El primero, presenta poca ramificación, con un porte erecto, estrello y menor diámetro. El segundo, posee mayor número de ramificaciones que inician en el cuello de la planta, porte más frondoso y mayor diámetro. Por último, se denomina pampalasta cuando crece totalmente tendido al suelo y sólo los extremos son erguidos (IPGRI et al., 2005).

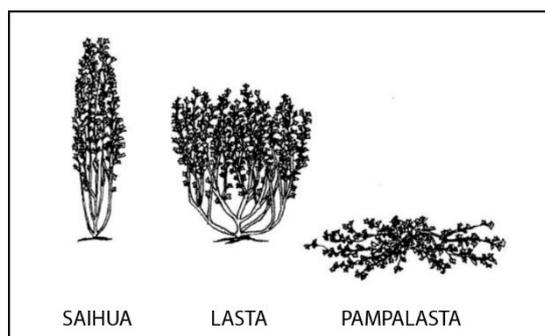


Figura 4: Hábitos de crecimiento de la cañihua (IPGRI, 2019).

2.2.2. Taxonomía

La cañihua es pariente cercano de la quinoa (*Chenopodium quinoa*), el paico (*Chenopodium ambrosoides*) y también a la espinaca (*Spinacea oleracea*). A continuación, se presenta su clasificación taxonómica:

Reino: Plantae
 División: Magnoliophyta
 Clase: Magnoliopsida
 Orden: Caryophyllales
 Familia: Amaranthaceae
 Género: *Chenopodium*
 Especie: *Chenopodium pallidicaule* Aellen

(ITIS Standard Report Page: *Chenopodium pallidicaule*, n.d.)

2.3. VALOR NUTRICIONAL

Este grano posee un alto valor nutricional y contenido de fibra, incluso mayor que la quinua y otros granos (Tabla 1). Actualmente, considerado como grano andino nutracéutico y funcional, es decir que posee propiedades fisiológicas beneficiosas para la salud que reducen el riesgo de padecer enfermedades crónicas (Rodríguez & Sorensen, 2021). Presenta aminoácidos esenciales (lisina, metionina, triptófano), aceites vegetales, dos tipos de omega-6 (ácido linoleico y linolénico), vitaminas (vitamina E y complejo B) y nutrientes como calcio, magnesio, sodio, fósforo, hierro, zinc (Repo-Carrasco et al., 2003). Además, contiene flavonoides como la quercetina y componentes fenólicos con alta actividad antioxidante, lo cual lo hace ideal para personas con problemas de colesterol (Aro & Calsin Cutimbo, 2019).

Tabla 1: Composición nutricional de la cañihua y otros granos. Traducido de Rodríguez et al. (2020).

Especie	Composición aproximada (mg / 100g MS)			Minerales (mg / 100 g MS*)				Aminoácidos esenciales (g/100 g de proteína)					Ác. Grasos (%)		Componentes fenólicos (µg/g)
	% Proteína	Carb**	Fibra cruda	Ca	Mg	Fe	Zn	Lis	Iso	Leu	Met	Cis	Ác. Linoleico	Ác. Linolénico	Derivados de quercetina
Cañihua	18,8	63,4	6,1	66,45	3,36	2,47	2,83	5,6	2,7	6,1	3,0	1,6	39,2	1,2	943,0
Quinua	14,4	72,6	4,0	67,55	3,92	2,61	2,7	5,6	2,7	6,1	3,1	1,7	38,9	24,3	1131,0
Amaranto	14,5	71,5	5,0	180,0	269	9,2	4,2	5,6	2,4	5,4	3,8	2,3	42,8	0,8	n.d.
Trigo	10,5	74,1	2,5	43,11	4,9	2,64	3,3	3,2	2,2	7,5	3,6	2,5	54,2	3,5	n.d.
Maíz amarillo	11,1	80,2	2,1	11,46	n.d.	2,72	n.d.	-	12,3	2,1	1,8	-	56,6	1,93	n.d.
Arroz	9,1	71,2	10,2	11,4	n.d.	1,01	n.d.	2,8	2,0	6,7	1,3	2,2	0,114	0,024	n.d.
Requerimientos adulto								4,5	1,5	5,9	1,6	0,6			

*MS: Materia seca

**Carbohidratos

2.4. PRODUCCIÓN Y MERCADO DE CAÑIHUA

Actualmente, se considera a Bolivia y Perú como principales productores de cañihua. El primero, con un rendimiento promedio de 627,0 kg/ha (Quiroga, 2015), mientras que en Perú 800,0 kg/ha (Figura 5), donde la producción de cañihua está centrada principalmente en los departamentos de Puno, Cusco, y Arequipa. Durante la campaña 2016 y 2017 el 95% de cañihua provenía de Puno, luego Cusco con una producción de 4,88% y por último Arequipa con un 0,12%. Siendo los rendimientos promedios en esos mismos años 839,0; 458,0 y 1150,0 kg/ha respectivamente Contreras, 2018).

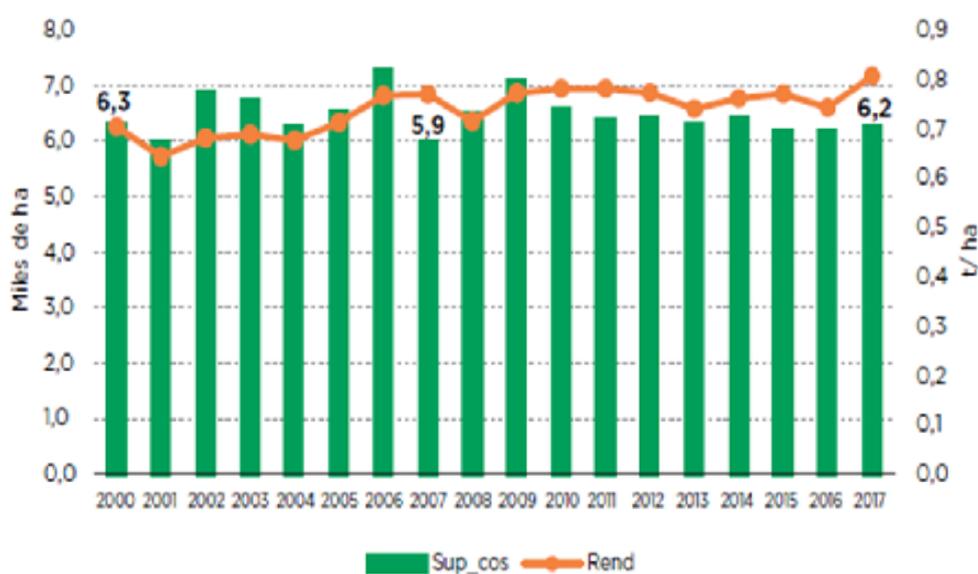


Figura 5: Producción de cañihua durante campaña 2015-2016 (MIDAGRI, 2016)

Con respecto a la cadena de valor agrícola de la cañihua, tiene un gran potencial y viene siendo trabajado por pequeños productores rurales, sin embargo; el uso de tecnologías y técnicas es pieza clave para su continuo desarrollo. Respecto a las exportaciones, se reportan valores bajos y con precios en el mercado que varía entre \$2,8-\$3,1 por kilogramo (Giuliani et al., 2012); sin embargo, se observa en los últimos años tendencia en el crecimiento de superficie, producción y precio del cultivo (Figura 6). En la actualidad, se presenta como oportunidad la necesidad creciente por alimentos saludables y nutritivos tanto a nivel nacional como extranjero, que influye en la mejora tecnológica para la producción de este cultivo (Mayta, 2019).

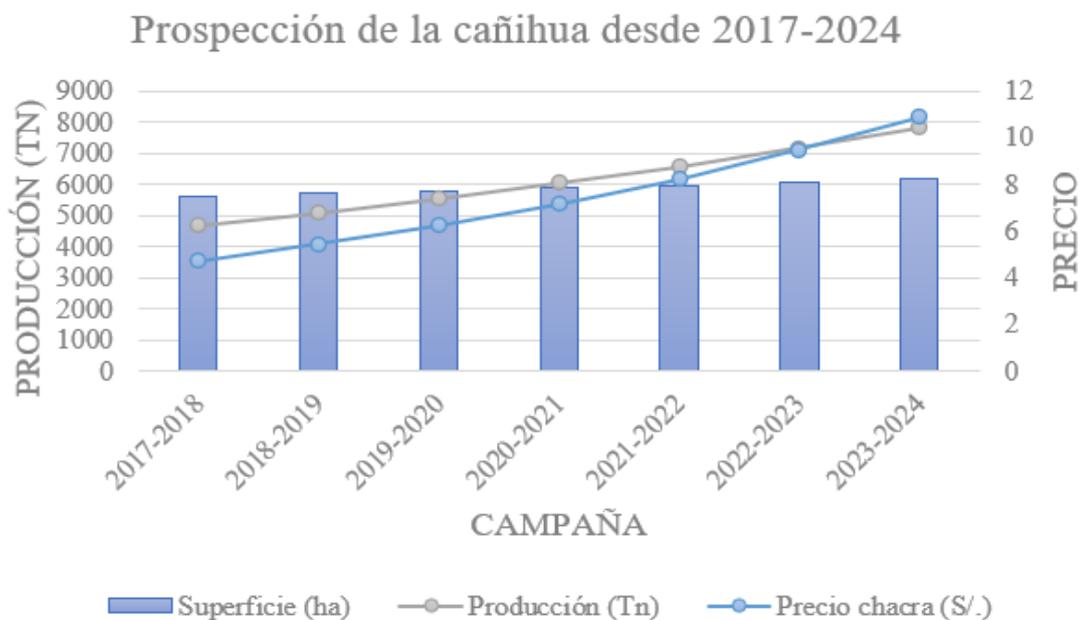


Figura 6: Tendencia de crecimiento de la cañihua. Tomado de Mayta (2019).

2.5. MEJORAMIENTO GENÉTICO

Mediante el mejoramiento genético se busca que el rendimiento por unidad de superficie se incremente, mejore la calidad del cultivo, acortar ciclos vegetativos, resistencia a estrés biótico o abiótico (Fleury et al., 2010). En el cultivo de cañihua, el mejoramiento está orientado a la obtención de variedades con mayor rendimiento por unidad de área y maduración uniforme del grano en la planta (Apaza, 2010). Por otro lado, se busca como característica de interés para la selección y mejoramiento es la alta precocidad y esta se ha encontrado en parientes silvestres de la cañihua, reportándose madurez entre los 75 y 100 días. Pero la dificultad de realizar la hibridación artificial evita la combinación de caracteres para la precocidad. Por ello, la mutación inducida es el método apropiado para generar variación y posteriormente implementar la selección en los individuos segregados (Bonifacio, 2019).

Los métodos empleados en el mejoramiento de este cultivo son la selección individual y/o masal, compuestos o variedades multilíneas y por hibridación; sin embargo, se mantienen las limitantes por el tamaño de las flores, haciendo más difícil la hibridación (Vargas et al., 2011). Por ello, en la actualidad sólo las instituciones públicas de países como Perú y Bolivia vienen trabajando en el desarrollo de variedades (Tabla 2), dichas investigaciones se vienen

haciendo a través de Fundación PROINPA, la Universidad Mayor de San Andrés, SAMIRI, INIA, entre otras.

Tabla 2: Variedades y cultivares de Bolivia y Perú (Tapia et al., 2019).

Cultivar /variedad	Hábito de crecimiento	Rendimiento (kg/ha)	Ciclo de vida (DDS)	País de origen
Warikunca	Lasta	1320	140	Bolivia
Ak'apuya	Saihua	1600	130	Bolivia
Saihua roja	Saihua	1430	150	Bolivia
Condomaira	Saihua	1300	140	Bolivia
Illimani	Lasta	800	160	Bolivia
Kullaka	Lasta	700	150	Bolivia
Lasta rosada	Lasta	1430	145	Bolivia
Lasta naranja	Lasta	1100	153	Bolivia
Illpa INIA	Saihua	3000	140	Perú
Ramis	Saihua	1720	nd	Perú
Cupi	Saihua	2150	nd	Perú
Guinda canawa	Lasta	900	160	Perú
Huanacco	Lasta	750	160	Perú
Ayrampito	Lasta	nd	160	Perú
Jacha Kahua	Lasta	nd	160	Perú
Chuqui Chillihua	Lasta	nd	140	Perú
Waripunchu	Lasta	nd	150	Perú

2.5.1. Estudios citológicos y genéticos aplicados al mejoramiento genético

Los primeros estudios a través de técnicas clásicas de tinción a partir de conteo de cromosomas en radículas de cañihua reportaron como número de cromosomas $2n=2x=18$, confirmando ser una especie diploide (Gandarillas, 1968; Ponce, 1977). Posteriormente, se han realizado estudios con técnicas de fluorescencia con tinción DAPI, donde se ha corroborado el número de cromosomas reportado para cañihua (Kolano et al., 2011).

Vargas *et al.* (2011), reportaron marcadores genéticos que cuantifican la diversidad en este cultivo, donde se evaluaron el polimorfismo de 43 genotipos entre silvestres y variedades comerciales. Ellos utilizaron 192 marcadores, y demostraron la posibilidad de transferencia de loci, originalmente identificados en quinua a su pariente la cañihua. Por otro lado, Mamani (2013), evaluó la variabilidad genética de 26 accesiones de cañihua por caracterización molecular con la combinación de 03 primers AFLP.

2.6. POLIPLOIDÍA

La poliploidía se define como la condición hereditaria de poseer más de dos juegos completos de cromosomas en el núcleo celular (Woodhouse et al., 2009). Esta situación se produce aproximadamente en un 2-4% de los eventos de especiación en angiospermas de manera natural durante el proceso de evolución y diversificación de las plantas (Sattler et al., 2016). Hay dos tipos de poliploides: el autopoliploide, que se forma cuando un individuo adquiere múltiples juegos de cromosomas de la misma especie, y el alopoliploide, que se genera a través de la hibridación de especies diferentes (Miller et al., 2005).

En cuanto a la distribución de los poliploides, se ve influenciada por factores como la altitud, es así como se encuentra una mayor frecuencia de poliploides mientras nos alejamos de la línea ecuatorial y condiciones climáticas, en especial las temperaturas extremas (Rice et al., 2019). Por ejemplo, existe una mayor frecuencia de individuos con gametos no reducidos en zonas cuyas semillas se encuentran en ambientes de temperaturas extremadamente bajas, típico de latitudes polares (Van de Peer et al., 2017). Esta idea es reforzada por Novikova et al. (2018) donde se estimó que los eventos de autopoliploidización y alopoliploidización coincidían con los máximos glaciares, proporcionando que nuevos individuos tengan espacios de colonización. Como conclusión se toma que las plantas con mayor número de ploidía demuestran una mejor adaptación a condiciones adversas (Baduel et al., 2018). A continuación, en la Tabla 3, se muestran algunos ejemplos de poliploides.

Tabla 3: Descripción de poliploides.

Ploidía	Número de juegos de cromosomas	Ejemplo	Autor
<i>Diploide</i>	$2x=22$	<i>Eucalyptus</i>	(Mora et al., 2005)
<i>Triploide</i>	$3x=33$	<i>Musa acuminata</i>	(Heslop-Harrison & Schwarzacher, 2007)
<i>Tetraploide</i>	$4x=36$	<i>Chenopodium quinoa</i>	(Heitkam et al., 2019)
<i>Pentaploide</i>	$5x=120$	<i>Sprekelia formosissima</i>	(Manuel Rodríguez-Domínguez et al., 2020)
<i>Hexaploide</i>	$6x=42$	<i>Triticum aestivum</i>	(Guillen-Andrade et al., 2001)
<i>Heptaploide</i>	$7x=77$	<i>Psidium cattleianum</i> var. <i>Cattleianum</i>	(Vazques Medina, 2014)
<i>Octaploide</i>	$8x=88$	<i>Opuntia ficus-indica</i>	(Mercado, 2014)

2.6.1. Ventajas de los poliploides

El éxito de las plantas poliploides se debe a su capacidad para adaptarse a una amplia diversidad de hábitats y climas inestables en comparación de sus progenitores diploides (2x), esto debido a su alta heterocigosidad y presencia de alelos adicionales (Alam et al., 2015). Adicionalmente, existen diferencias morfológicas positivas en el ámbito de los programas de mejoramiento como mayor tamaño de órganos (denominado efecto “gigas”), mayor vigor, amortiguación de mutaciones deletéreas y aumento de heterosis (llamado también vigor híbrido), según Sattler et al. (2016), incrementar el contenido de metabolitos y componentes propios de las plantas como flavonoides, alcaloides, aceites esenciales y terpenoides (Lavania, 2005). Otro beneficio es que suele tener resultados en la reducción de la fertilidad durante la meiosis lo que permite la producción de variedades sin semilla (Sattler et al., 2016).

Por otro lado, la redundancia genética se considera otra de sus ventajas, donde los genes recesivos son enmascarados por alelos dominantes de tipo silvestre; donde la poliploidía puede reducir la incidencia de homocigotos recesivos, lo cual confiere cierto efecto de protección contra mutaciones recesivas deletéreas y genotoxicidad (Comai, 2005).

A largo plazo, los poliploides se encuentran distribuidos en áreas no nativas, generando potencial para la colonización de nuevos hábitats, esto asociado a la capacidad de mayor tolerancia a condiciones ambientales adversas, mayor resiliencia al estrés, y plasticidad fenotípica (Baduel et al., 2018).

Los poliploides, al tener mayor número de genoma que un diploide da como resultado la disminución de la tasa de crecimiento y división celular (Otto, 2007). A nivel celular, el incremento del contenido nuclear conduce al aumento del volumen celular y la tasa de crecimiento es más lenta y por otro lado, a nivel de organismo, también a menudo florecen más tarde y son frecuentemente perennes, esta idea se ve reforzada con el estudio realizado por Corneillie et al., 2019, donde compararon plantas de *Arabidopsis thaliana* con diferentes niveles de ploidía, el análisis cinemático mostró que los poliploides se desarrollaron más lentamente en comparación con los diploides, causando el retraso en la floración para las plantas con mayor nivel de ploidía.

Las ventajas mencionadas anteriormente, conducen a la inducción artificial de individuos poliploides como técnica de mejoramiento en plantas con alto interés comercial (Molero Paredes et al., 2018). Mediante esta técnica se logra duplicar juegos de cromosomas,

apareciendo caracteres particulares; sin embargo, los efectos del tratamiento son impredecibles, tanto favorables como desfavorables en cada especie (Cubero, 2013).

2.6.2. Desventajas de los poliploides

Comai (2005) describe 3 principales desventajas al obtener poliploides: en primera instancia, el agrandamiento nuclear y celular. Segundo, la propensión a producir aneuploides y, por último, la inestabilidad epigenética.

Los efectos disruptivos en el agrandamiento celular son explicados pues mediante el aumento del contenido de ADN suele aumentar el volumen celular; sin embargo, si el genoma es duplicado se espera que la célula duplique su volumen, pero el aumento suele ser de 1,6 veces la superficie de la envoltura nuclear, lo que causa cambios estequiométricos en la interacción de los componentes de la cromatina (Melaragno et al., 1993).

Los problemas que surgen durante la mitosis y la meiosis pueden causar la aparición de organismos aneuploides, por los agentes químicos que inducen poliploidía actúan a nivel del huso acromático causando pérdidas de cromosomas. Es posible que las células aneuploides crezcan más lentamente y sean superadas por la proliferación preferencial de las células euploides circundantes (Sheltzer et al., 2012).

La inestabilidad epigenética se da al aumentar el número del juego cromosómico donde todos los genes se ven afectados y por ende también se da el aumento en la expresión génica, al existir cambios en la relación estructural entre ciertos componentes, también esta expresión génica puede ser modificada; sin embargo, pocos estudios han determinado los efectos de la ploidía en la regulación génica. Uno de los primeros, fue medir los niveles de ARN_m por genoma para 18 genes en maíz (1X, 2X, 3X y 4X). La expresión de la mayoría aumentó con la ploidía, pero algunos genes mostraron relación inversa con su nivel de ploidía, sobre todo en tejidos haploides y triploides (Guo et al., 1996).

2.6.3. Inducción artificial

La inducción artificial comenzó en la década de los 40, obteniéndose poliploides de diferentes especies incluyendo monocotiledóneas y dicotiledóneas. En los trabajos realizados por Jin-xian (2010), en *Saintpaulia ionantha*, se mejoraron las características ornamentales con la obtención de un tetraploide. Otros ejemplos en ornamentales fueron reportados por Gantait et al., en el 2010 en Gerbera (*Jamesonii Bolus cv. Sciella*), *Alocassia*

“Green Velvet” (Thao et al., 2003), *Helianthus annuus* (Narro, 2010) y especies del género *Rhododendro* (Hebert et al., 2010).

Existen diferentes métodos artificiales para la inducción de poliploides. Algunos de ellos mediante agentes físicos (golpes de calor o frío y radiaciones) o agentes químicos (Tabla 4) como el óxido nitroso, etilmercurio, sulfanilamida, orizalina, trifuralina y amiprofos-metil (AMP). Las plantas con un número básico de cromosomas más bajo tienen una mayor probabilidad de experimentar duplicación, especialmente en el caso de plantas alógamas en comparación con las autógamias, donde se observa una mayor tendencia a la recombinación del material genético (Bowers & Paterson, 2021). Es fundamental seleccionar el método de aplicación adecuado. Se pueden tratar tejidos meristemáticos pequeños y en crecimiento activo, como semillas, plántulas o brotes apicales. Sin embargo, el método más exitoso para inducir la poliploidía es el tratamiento de semillas pregerminadas, es decir, con raíz emergente (Pirkoohi et al., 2011).

Tabla 4: Agentes antimitóticos químicos más utilizados para la inducción de poliploides.

Agente	Especie	Concentración	Referencia
Colchicina	<i>Thymus persicus</i>	0,75 - 1,25 mM	(Tavan et al., 2015)
	<i>Bletilla striata</i>	1,25 - 5 mM	(Pan-pan et al., 2018)
	<i>Populus hopeiensis</i>	100 µM	(Wu et al., 2020)
Orizalina	<i>Hebe "Oratia beauty"</i>	11,5 - 289 µM	(Gallone et al., 2014)
	<i>Ophiopogon planiscapus</i>	7.5 µM	(Gillooly et al., 2015)
	<i>Cannabis sativa</i>	20 - 60 µM	(Parsons et al., 2019)
Trifuralina	<i>Spathiphyllum wallisii</i>	10 µM	(Eeckhaut et al., 2004)
	<i>Helleborus niger</i>	3-10 µM	(Dhooghe et al., 2009)
	<i>Cucumis sativus</i>	15 - 450 µM	(Ebrahimzadeh et al., 2018)
Amiprofos- metil	<i>Dianthus caryophyllus</i>	32.9 µM	(Nimura et al., 2006)
	<i>Rosa persica</i>	6 - 24 µM	(Khosravi et al., 2008)
	<i>Raphanus sativus x Brassica oleracea</i>	10 - 30 µM	(Niimi et al., 2015)
Pendimentalina	<i>Plumbago auriculata</i>	800 µM	(Jiang et al., 2020)

a. Colchicina

Pelletier & Caventou descubrieron la colchicina en 1819 extrayéndolo de las semillas (0,2-0,8%) y bulbos (0,1-0,5%) del cólquico (*Colchicum autumnnale*), perteneciente a la familia de las liliáceas. Al ser extraído, es un polvo blanquecino, cristalino, inodoro que al tener contacto con la luz suele oscurecerse, por lo cual la industria química comercialmente lo maneja en frascos ámbar (Leung et al., 2015); también es muy tóxica y cancerígena, se conoce que 5 mg/kg es letal para los humanos. Es soluble en agua y alcohol con punto de fusión de 155-157°C (Manzoor et al., 2019). Levan (1938) demostró que la colchicina es un agente químico específico y eficiente para la duplicación de cromosomas en plantas.

Cuando la colchicina es aplicada ocurren irregularidades en la división celular. Este químico inhibe la polimerización del huso mitótico en la metafase durante la división celular, evitando así la migración de los cromosomas hacia los polos, resultando en la duplicación de cromosomas luego de la división celular (Manzoor et al., 2019). La colchicina también actúa directamente sobre las células incrementando su tamaño. Por su alta toxicidad, se recomienda utilizarlo en bajas dosis con exposición prolongada; sin embargo, Castro et al., en el 2018 y Eng & Ho, en el 2019 afirmaron que la colchicina tiene baja afinidad por las tubulinas de células vegetales, por lo que normalmente suelen utilizarse concentraciones que oscilan desde 0,1ppm (*Lychnis seno*) hasta 150 ppm en membrillo (*Chaenomeles japónica*).

b. Orizalina

La orizalina, conocida por su fórmula química como 3,5-dinitro-N4, N4-dipropylsufanilamida, herbicida perteneciente a la clase de los dinitroanilinos que se caracterizan por causar fuertes anomalías en las plantas y con mayor efecto en zonas de alta actividad meristemática, como los ápices radiculares (Lam et al., 2014). Logra inhibir la mitosis en la formación de microtúbulos, interrumpiendo el ensamblaje de la tubulina en las células vegetales. Algunos estudios ultraestructurales mostraron que las concentraciones nanomolares de dinitroanilinos, causan parcial o completa desaparición de los microtúbulos en todos los sistemas subcelulares (Chen et al., 2021).

Dependiendo del cultivo, la eficiencia de poliploidización puede variar según el agente antimitótico que se emplee (Tabla 5). Talebi et al. (2017) observaron que el tratamiento con orizalina fue la técnica más efectiva para inducir poliploides en *Agastache foeniculum*. La eficiencia del agente antimitótico dependerá de distintos factores, siendo los más importantes: el tejido a escoger, el genotipo de la planta, método de aplicación del reactivo y las condiciones de crecimiento que se le den a la misma (Trojak-Goluch et al., 2021).

Tabla 5: Agentes inhibidores de huso acromático más utilizados durante el pretratamiento (Maluszynska, 2003).

Agente	Concentración	Tiempo (h)	Condiciones
Colchicina	0.5 - 1.0 %	2-3	Temperatura ambiente a oscuras.
8-Hidroxiquinolina	0.002 M	4	2 primeras horas a temperatura ambiente y luego 2 horas a 4°C
α -Bromonaftaleno	saturado	2-4	Temperatura ambiente a oscuras.
Agua helada	-	12-24	0°C

2.6.4. Concentración y tiempo de exposición de los agentes antimitóticos

Talebi et al. (2017) reportan la adición de surfactantes (tween 20 o lanolina) al agente antimitótico para incrementar la eficiencia de poliploidización. En tejidos multicelulares suelen emplearse sulfóxidos como el Dimetil sulfóxido (DMSO), que también es un excelente solvente e incrementa la permeabilidad de la membrana.

Por otro lado, es importante utilizar dosis que permitan la supervivencia de las células tratadas; cuando estas concentraciones son altas, existe toxicidad para las células vegetales, provocando crecimiento anormal y baja viabilidad, mientras que dosis muy bajas pueden ser ineficaces o inducir exceso de mixoploides o aneuploides (Manzoor et al., 2019b). Es necesario definir la dosis según el tipo de cultivo, Niu et al. (2016) en *J. curcas*, extendieron el tiempo de exposición de 4 a 7 días y se incrementó el porcentaje de poliploidización de 10 a 15% respectivamente. Además, Talebi et al. (2017) mencionan mayor efecto de poliploidización con orizalina al exponerla a 24 horas, logrando alcanzar hasta 20% de tetraploides.

2.7. MÉTODOS DIRECTOS PARA LA ESTIMACIÓN DEL NIVEL DE PLOIDÍA

2.7.1. Estimación del nivel de ploidía

Conocer el nivel de ploidía de una especie y cuantificar la diversidad de citotipos dentro de la especie es esencial para mejorar la comprensión de la sistemática y evolución de las plantas (Correa Dos Santos et al., 2017).

Como se ha mencionado, los eventos de duplicación son comunes tanto de forma natural como en los programas de mejoramiento para la obtención de individuos poliploides, donde se requiere la caracterización de este material y determinación de su nivel de ploidía posterior a los tratamientos que son sometidos (Dirihan et al., 2013). Este puede conocerse a través de métodos directos con la ayuda de un microscopio mediante el conteo del número de cromosomas en las células o estimarlo a través de la comparación entre el número de cromosomas conocido y cantidad de ADN conocido, analizándolas por citometría de flujo (Zhang et al., 2012). Por otro lado, existen métodos indirectos donde se evalúan características morfológicas que pueden predecir un cambio en el nivel de ploidía, como tamaño de estoma, la densidad estomática, el tamaño del polen entre otros (McGoey et al., 2014).

a. Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica ampliamente utilizada para la estimación del tamaño de genoma y determinación del nivel de ploidía en las plantas por su precisión, efectividad, bajo costo operativo y corto tiempo empleado por muestra (Garavello et al., 2019). Sus aplicaciones han sido diversificadas en diferentes ramas como la biomédica, incluyendo la inmunología, hematología, oncología y otras ramas como la botánica, taxonomía, entre otras (Vrána et al., 2014).

Mediante el citómetro de flujo (Figura 4) se pueden analizar las propiedades ópticas como la fluorescencia y dispersión de luz de partículas microscópicas de un líquido en suspensión donde las células son medidas individualmente a altas velocidades (1000-10000/s) lo que facilita la toma de muestras en poblaciones (McKinnon, 2018). El análisis individual de los núcleos permite la identificación de muestras con células en división asincrónica. Las cantidades de ADN pueden ser analizadas con alta precisión, donde los coeficientes de variación (CV) de los picos de ADN generalmente oscilan entre 1 y 5% (Doležel et al., 2007). Los resultados se presentan en forma de histogramas monoparamétricos de distribución de frecuencias, gráficos biparamétricos o multiparamétricos (Vrána et al., 2014).

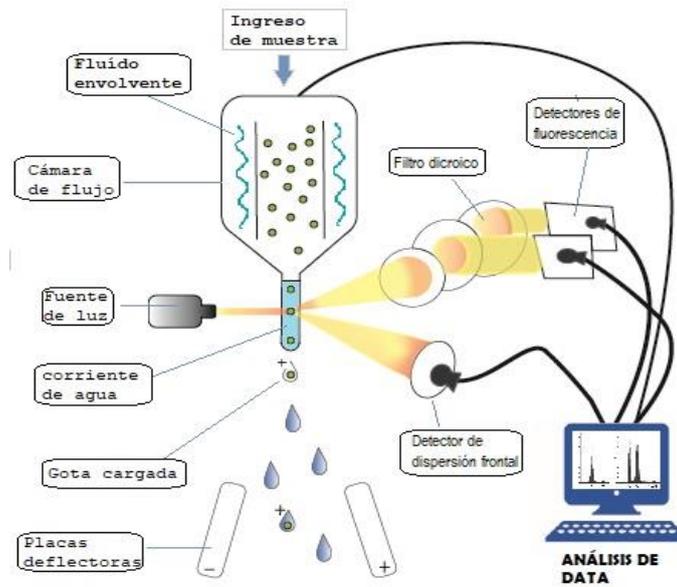


Figura 7: Flujograma del funcionamiento citómetro de flujo

Fuente: Adaptado de Vraná, 2014

b. Solución tampón

Para analizar una muestra por citometría de flujo es necesaria la preparación de suspensiones de núcleos intactos, que serán teñidos por un fluorocromo específico de ADN como se explicará más adelante. Se han desarrollado diferentes fórmulas de soluciones tampón para preservar la integridad del contenido nuclear, proteger el ADN de la degradación, liberar los núcleos de las células y facilitar su tinción. En 1973 se utilizaron enzimas hidrolíticas para desintegrar las paredes celulares y liberar los núcleos del tejido; sin embargo, esta técnica tomaba bastante tiempo y era poco práctica. En 1983, se desarrolló un método rápido para aislar los núcleos de las plantas triturando los tejidos vegetales en una solución tampón. Desde entonces, ha sido el método principal y más adecuado para el aislamiento nuclear en plantas (Loureiro et al., 2006).

Existen más de 25 tampones de lisis; sin embargo, solo 5 son ampliamente utilizados (Tabla 6). Estas sustancias están compuestas de un estabilizador de cromatina ($MgCl_2$, $MgSO_4$, espermina, etc.) un agente quelatante (ácido etilendiaminotetracético – EDTA, citrato de sodio), sales inorgánicas (KCl, NaCl) para lograr una fuerza iónica adecuada, tampones orgánicos [Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS), Tris-hidroximetilaminometano (TRIS) y otros]. Así mismo es necesario estabilizar la solución a pH entre 7-8 y agregar un detergente no iónico (Triton X-100, Tween 20) para la liberación de núcleos (Loureiro et al., 2006).

Tabla 6: Soluciones tampón para aislamiento de núcleos más utilizados en citometría de flujo (Cires et al., 2011; Doležel et al., 2007; Loureiro et al., 2006).

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

c. Fluorocromos

Existe gran variedad de fluorocromos (Tabla 7) que se unen estequiométricamente a los ácidos nucleicos (Cires et al., 2011), por lo que es importante estandarizar un protocolo adecuado para el análisis de la muestra según el cultivo.

Tabla 7 : Características de algunos fluorocromos utilizados para citometría de flujo.

Fluorocromo	Interacciona con	Concentración µg/mL	Referencias
Bromuro de etidio	Ácido nucleico	50-150	Staalsoe et al. (1999) Dent et al. (2008) Persson et al. (2006)
Yoduro de propidio	Ácido nucleico	50-150	(Pattanapanyasat et al., 1997) (Riccardi & Nicoletti, 2006a)
4',6-diamidino-2-fenilindol DAPI	ADN	2-4	Otto (1990) Kravtsov et al. (2001) van Vianen et al. (1990)
Hoechst 33258	ADN	2-4	Brown et al. (1980) Izumiyama et al. (2009)
Mitramicina	-	50-100	Kravtsov et al. (2001) (Larsen et al., 1986)

d. Yoduro de propidio

Riccardi & Nicoletti (2006) describen al yoduro de propidio como una molécula fluorescente que se une estequiométricamente a los ácidos nucleicos y donde la emisión de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN y/o ARN contenido en una célula, no obstante, este compuesto no puede atravesar células con membranas plasmáticas intactas y solo puede penetrar células muertas con membrana dañada. Por ello, se utiliza para diferenciar células muertas (membranas plasmáticas permeables independientemente del mecanismo de muerte) de las células vivas con membranas intactas (Figura 7). El yoduro de propidio se excita con longitudes de onda entre 400 y 600 nm y emite una luz entre 600 y 700 nm, por lo que es compatible con láseres fotodetectores encontrados en citómetros de flujo (Crowley et al., 2016).

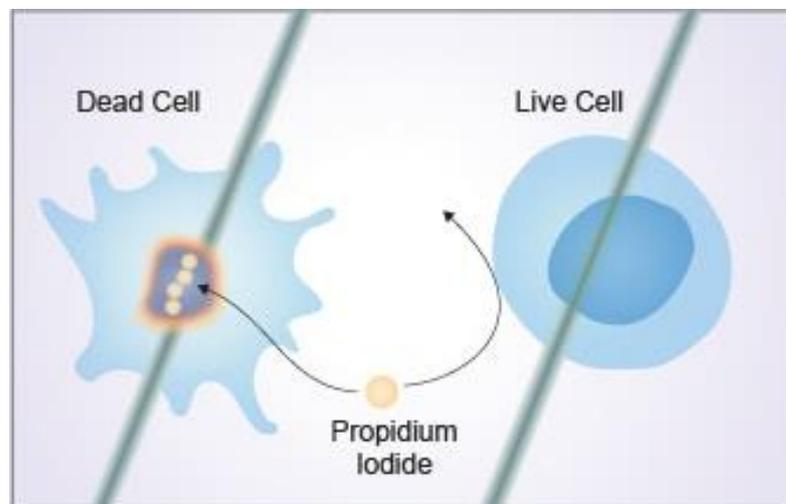


Figura 8: Mecanismo de acción del yoduro de propidio. Tomado de R&D System.

2.7.2. Tamaño de genoma en plantas

El tamaño de genoma está referido a la cantidad de ADN que contiene el núcleo celular, este valor se expresa en la cantidad de pares de bases de ADN que componen el genoma (Pellicer et al., 2018). En la actualidad, el tamaño de genoma se considera como evidencia de biodiversidad (Figura 9). Temsch et al. (2021) afirman que dentro del grupo Embryophyta existen alrededor de 2300 especies cuyo tamaño de genoma varía desde 0,0624 pg/1C (*Genlisea tuberosa*) hasta 152,23 pg/1C (*Paris japónica*). Además, es importante para la identificación de especies, verificación de su posición taxonómica e identificación de material vegetal cultivado *in vitro* cuyo genoma ha sido modificado por variación somaclonal (Sliwinska, 2018).

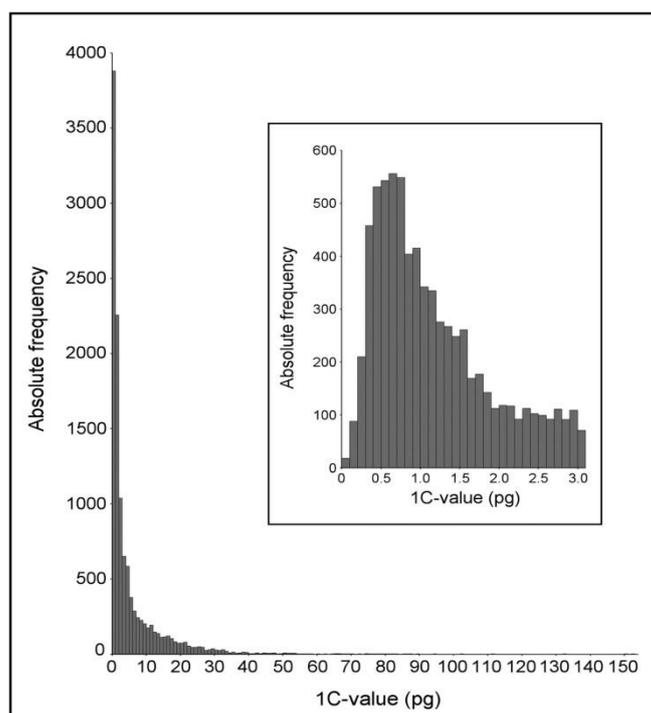


Figura 9: Histograma de tamaño de genoma de diferentes angiospermas (Temsch et al., 2021)

Los principales mecanismos que explican la expansión del genoma en una especie son la poliploidía y la acumulación de secuencias de ADN repetitivas que constituyen la mayor parte del genoma. Este primer mecanismo, tiene impacto directo en el tamaño del genoma, incluso en ausencia de hibridación. Adicionalmente, mejora la diversidad genética y el dinamismo genómico e incluso sugiere que los eventos de poliploidía contrarrestan la reducción del tamaño de genoma, evitando la pérdida de genes fundamentales (Vu et al., 2015). Estos valores pueden ser expresados en pg (picogramos) o Mbp (millón de pares de bases), según Doležel et al. (2007), 1 pg = 978 Mpb.

Para la determinación del tamaño de genoma es necesario comparar los núcleos en suspensión de un estándar de referencia (muestra de tamaño conocido) y la muestra de la especie por determinar; en la Tabla 8 se muestran algunos de estos estándares. Esta estandarización puede ser externa o interna. La primera implica aislar, teñir y analizar por separado la muestra y el estándar (Figura 10-A), donde se registran las posiciones de los picos de ADN en ambas muestras y se calcula el contenido de ADN de la muestra desconocida en función al cociente de intensidad de fluorescencia (IF); sin embargo, este resultado no es preciso, por ello se recomienda su uso para la determinación preliminar (Sliwinska et al., 2021).

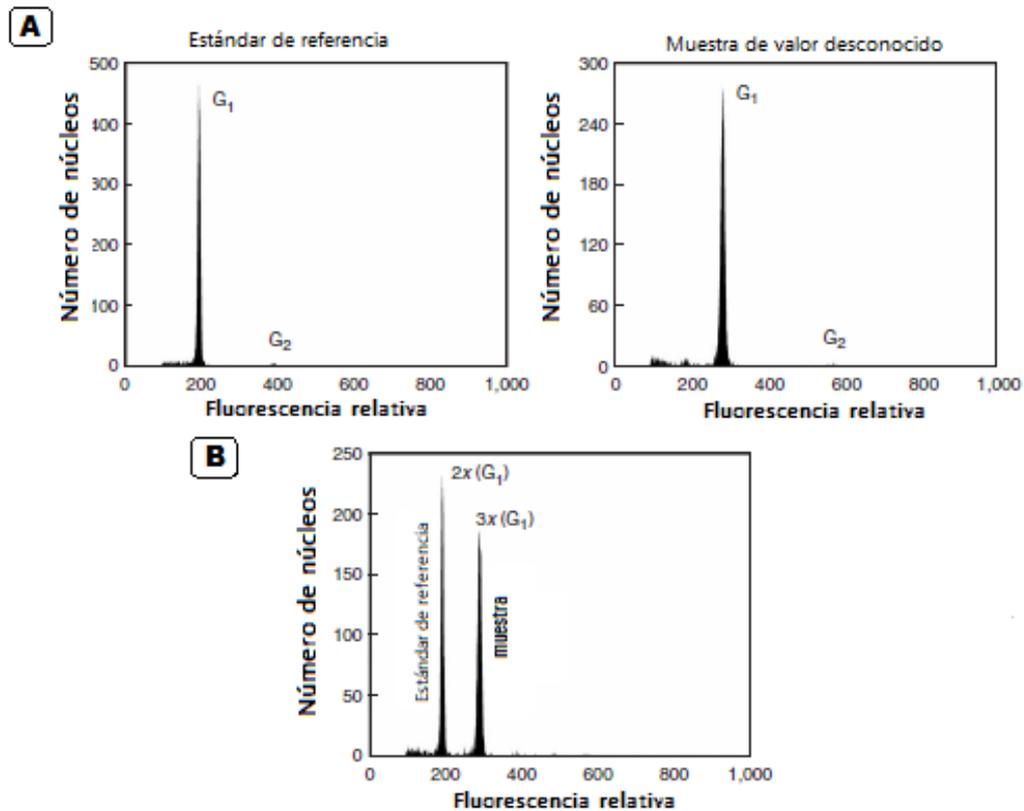


Figura 10: Histogramas de citometría correspondientes: A) Estandarización externa B) Estandarización interna. Modificado de Doležel et al. (2007).

Por otro lado, en la estandarización interna los núcleos de la muestra desconocida y estándar de referencia se aíslan, tiñen y analizan simultáneamente en la misma suspensión (Figura 10-B), lo que asegura condiciones de tratamiento idénticas para los núcleos y la muestra durante todo el proceso, por lo que todas las demás variables como metabolitos secundarios, temperatura, eficiencia del láser y cambios de flujo en la muestra, afectarían de la misma manera a los núcleos (Doležel, 1991; Sliwinska et al., 2021). Este método es ampliamente aceptado para la medición del tamaño de genoma, detección de aneuploidías y composición base del ADN (Temsch et al., 2021).

Pellicer et al. (2018) mencionan otro término relacionado al tamaño de genoma, el Valor C, que indica la masa de ADN en picogramos en un conjunto haploide de cromosomas (medido a partir de gametos o células germinales). El valor C se usa comúnmente para describir el ADN presente en células haploides (una sola copia del conjunto completo de cromosomas).

Tabla 8: Estándares de referencia recomendados para la estimación de contenido de ADN (Dolezel et al., 2007).

Plantas y cultivares	Contenido de ADN 2C (pg ADN)
<i>Raphanus sativus</i> L. "Saxa"	1.11
<i>Solanum lycopersicum</i> L. "Stupické polni rané"	1.96
<i>Glycine max</i> Merr. "Polanka"	2.5
<i>Zea mays</i> L. "CE-777"	5.43
<i>Pisum sativum</i> L. "Ctirad"	9.09
<i>Secale cereale</i> L. "Dankovské"	16.19
<i>Vicia faba</i> L. "Inovec"	26.9
<i>Allium cepa</i> L. "Alice"	34.89

a. Interpretación de los resultados

Los resultados obtenidos del citómetro de flujo pueden ser representados a través de gráficas de puntos, figuras tridimensionales e histogramas, por ello se debe elegir la gráfica que mejor represente a la muestra sin generar confusiones (Shapiro, 2003).

Los histogramas mayormente empleados en citometría en plantas son los monoparamétricos (Figura 8), donde se observa el parámetro seleccionado en el eje "X" (contenido de ADN), mientras que en el eje de las "Y" normalmente suele estar el número de células o eventos analizados.

Laguado (2007) mencionan a los histogramas biparamétricos (Figura 11), también llamados dot-plots, donde son comparados dos parámetros, en base a sus propiedades de luz emitida por desviación frontal (FSC) que determina el tamaño de cada célula y la dispersión lateral (SSC) que representan la complejidad o granularidad de la partícula intracelular.

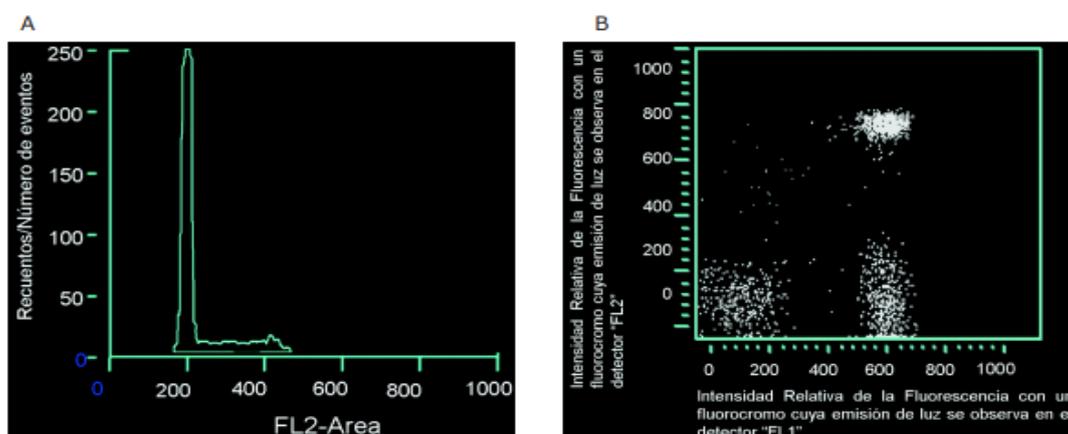


Figura 11: A) Histograma monoparamétrico, se observa la intensidad de fluorescencia (eje X) vs. el número de eventos (eje Y). B) Histograma biparamétrico Intensidad de Fluorescencia en el detector FL1 vs. el detector FL2, los puntos blancos son las células detectadas definidas como negativas (Laguado, 2007).

b. Conteo de cromosomas

Las características citológicas se emplean para diferenciar y rastrear la filogenia de los organismos, es decir, parte de la citotaxonomía, popular término en la taxonomía de plantas en los años de 1930 y 1960 que incluye el número de cromosomas, la morfología, asociación, el comportamiento y la citoquímica cromosómica, resultados valiosos que han revolucionado las interpretaciones filogenéticas (Honnegowda Venkatesh, 2021).

Es ideal que el número de cromosomas sea evaluado en células que se encuentren en división celular mitótica o meiótica. El conteo en fase mitótica (Figura 12) de las células es más sencillo y práctico y estas se encuentran en las puntas de raíces principalmente; sin embargo, si no se tiene la disponibilidad de raíces se puede utilizar puntos de crecimiento como brotes jóvenes, hojas o callos (Maluszynska, 2003).

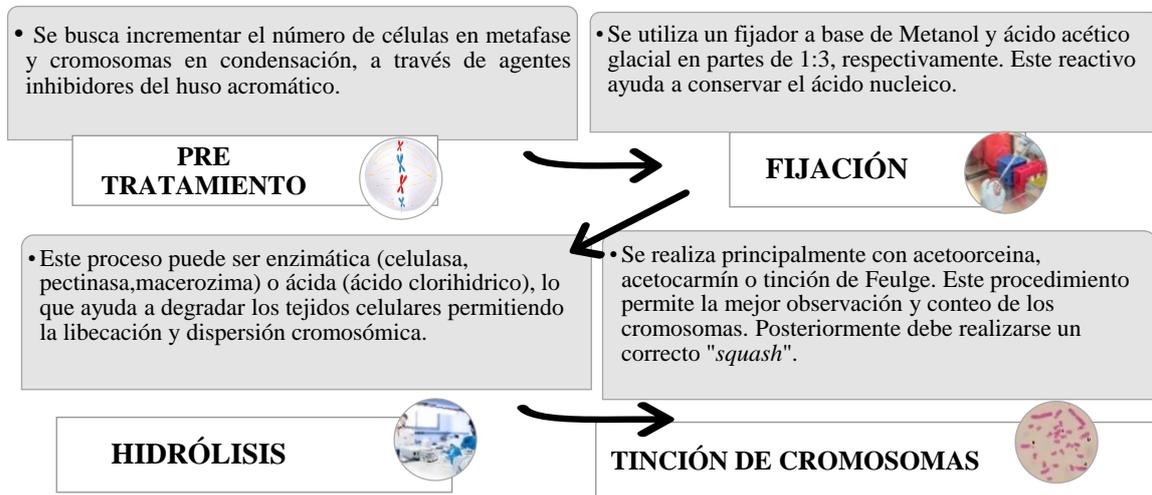


Figura 12: Flujograma conteo de cromosomas

2.7.3. Parámetros asociados al nivel de ploidía

a. Tamaño y densidad estomática

Diversos estudios han demostrado con frecuencia que el tamaño de los estomas, la densidad estomática y el número de cloroplastos dentro de las células guardianas varían significativamente al duplicar el número de cromosomas, en comparación del estado diploide (Monda et al., 2016; Qin & Rotino, 1995; Urwin et al., 2007). Las características de los estomas (densidad y tamaño) se han considerado como parámetros para distinguir el nivel de ploidía en la familia de las Orchidaceae como *Cymbidium* (Wimber & Van-Cott, 1966), *Paphiopedilum* (Watrous & Wimber, 1988) y *Phalaenopsis* (W. Chen et al., 2009).

También se ha demostrado para cultivos ornamentales como es el caso de cultivares de *Bougainvillea*, donde el tamaño medio reportado de los tetraploides fue 1,95 y 2,09 veces más que de los diploides. En cuanto a la densidad estomática en plantas diploides fue de 1,85 y 1,96 veces más que la observada en plantas tetraploides (Anitha et al., 2017). En el cultivo de jengibre, se reportan resultados similares con respecto a la frecuencia estomática en plantas diploides, cuyos valores fueron 1.8 veces más a lo observado en plantas tetraploides (Sakhanokho et al., 2009).

El aumento del número de cromosomas en los poliploides suele cambiar las expresiones génicas, lo que da como resultado alteraciones fenotípicas, incluidas la densidad y tamaño de estomas en las plantas (Comai, 2005). Por ejemplo, Rao et al.(2019), indujeron tetraploides de *Lycium ruthenicum* con colchicina, obteniendo menor densidad estomática ($94,3 \pm 10,54 / \text{mm}^2$) que en los diploides ($189,6 \pm 19,20 / \text{mm}^2$), como consecuencia del incremento en el tamaño de los estomas.

b. Tamaño de polen

El tamaño del polen varía considerablemente en las plantas, de 13 a 130 μm de diámetro e incluso puede variar dentro del mismo género (Knight et al., 2010). Existe correlación positiva entre el tamaño del grano de polen y el contenido de ADN nuclear, el cual se ve incrementado en la poliploidización inducida (Möller, 2018); sin embargo, pocos trabajos confirman esta correlación entre el nivel de ploidía y tamaño de polen (Sanders, 2021).

Los granos de polen son haploides (n) cuando provienen de plantas diploides (2n), pero si estas plantas se ven afectadas por la poliplodización, el estado natural haploide (n) se modifica a 2n o incluso a niveles más altos. Sanders (2021) reporta que el incremento en el tamaño de genoma, resulta en mayor dimensión de los granos de polen (Tabla 9).

Tabla 9: Estudios relacionados entre la ploidía y el tamaño de polen reportados por familia, genero, variación de ploidía y como la duplicación de ADN puede cambiar el volumen del polen.

Familia	Género	N° de cromosomas	Duplicación del ADN lleva a:	Referencia
Boraginaceae	<i>Lappula</i>	<i>deflexa</i> (2n=24) <i>squarrosa</i> (2n=48)	1.5x a 2x polen más largo	(Clarke, 1977)
Convolvulaceae	<i>Cuscuta</i>	<i>epithymum</i> (2n=14) <i>carapestris</i> (2n=56)	1.2x polen más largo	(Cronk & Clarke, 1981)
Papaveraceae	<i>Fumaria</i>	<i>murialis</i> (2n=30) <i>capreolata</i> (2n=60)	1.3x polen más largo	(Kalis, 1979)
Poaceae	<i>Andropogon</i>	especies varias (2n=60, 120 y 180)	1.2x polen más largo	(Gould, 1957)
Polygonaceae	<i>Rumex</i>	<i>acetosella</i> (2n=14, 28 y 42)	1.1x a 1.3x polen más largo	(van Leeuwen et al., 1958)
Convolvulaceae	<i>Ipomoea</i>	<i>trifida</i> con polen diploide	1.3x polen más largo	(Orjeda et al., 1990)
Brassicaceae	<i>Arabidopsis</i>	<i>thaliana</i> con polen diploide y tetraploide	1.7x polen más largo	(Bennett, 1972)

2.8. USO DE POLIPLOIDES EN LA INDUSTRIA

Esta técnica de producción de plantas mejoradas viene siendo empleado desde los años 50, rescatando las características ventajosas para introducir nuevas variedades. Estos trabajos comienzan con la producción de autotetraploides, que se inician con la aplicación de colchicina o altas temperaturas; sin embargo, estos primeros intentos fracasaron: el individuo tetraploide de linaza reportó menor contenido de fibra y grasas que el diploide (Hoffmann et al., 1979). Dos de los principales objetivos de la poliploidización son incrementar el tamaño de las partes vegetativas y el contenido de los componentes bioquímicos. Por ejemplo, en plantas herbáceas como *Chamomilla recutita* (L.) el aumento de ploidía incrementa el contenido enzimático y otros metabolitos secundarios que contribuyen a la mayor producción de aceites, flavonoides, bisaboloides, además de presentar mayor altura de planta, tamaño y peso seco de las semillas (Gosztola et al., 2006). En la actualidad, alrededor de un cuarto de las variedades cultivadas de manzanilla son tetraploides inducidos por

colchicina, resaltando la importancia del uso de esta técnica en especies de uso medicinal (Das, 2015).

Otro importante cultivo es el algodón, cuya fibra sigue siendo mundialmente utilizada. El género *Gossypium* es representado en dos niveles de ploidía; diploide ($2n = 26$) y tetraploide ($2n = 52$). Este último proveniente de una alopoliploidización de dos especies diploides. El mejoramiento de este cultivo se centra en la localización de genes que determinan la calidad de la fibra a partir de los mecanismos de elongación de células y sus paredes. Hasta el momento, el alotetraploide con genes AADD presentan la mejor calidad y rendimiento de fibra que sus pares diploides (Renny-Byfield & Wendel, 2014).

Otra aplicación en la industria es usar la poliploidización como una herramienta para generar genotipos deseados o superar barreras genéticas, pues como se ha mencionado anteriormente son fuente de nuevas variaciones a través de las mutaciones cromosómicas. Además, los tetraploides son utilizados para producir variedades triploides, logrando así especies que no producen semillas. Un ejemplo de ello es la variedad triploide de lúpulo que se caracteriza por poseer un menor número de semillas, lo que beneficia en evitar el proceso de limpieza antes de la molienda. Otra ventaja es que las variedades triploides poseen mayor calidad en cuanto al sabor en la cerveza (Trojak-Goluch & Skomra, 2018). Por otro lado, Lam et al. (2014) estudiaron la inducción a tetraploidía en *Acacia crassicarpa* para obtener plantas triploides pues esta especie es considerada como una maleza con una producción excesiva de semillas. Se utilizaron dos agentes poliploidizadores, colchicina y orizalina. Con el primero se logró la máxima eficiencia de tetraploidización (12,81%) en dosis de 0,02% con un 61% de sobrevivencia, mientras que con orizalina no se vió afectada la germinación ni supervivencia de las plántulas y la eficiencia de tetraploidización sólo alcanzó el 3,10%.

Otro estudio fue realizado en *Taraxacum kok-saghyz* para incrementar el rendimiento en la producción de caucho mediante inducción de poliploides. El tratamiento óptimo se obtuvo a concentración de 0,1% de colchicina por 48 horas con 56,6% de eficiencia. Los resultados a los dos meses mostraron incremento de 47,7% en la producción de caucho; sin embargo, disminuyó la concentración de inulina/azúcares en las plantas tetraploides (Luo, Iaffaldano, & Cornish, 2017).

Escandon et al. (2005) obtuvieron nuevas variedades comerciales al duplicar material genético de *Scoparia montevidensis*, con el uso de concentraciones de colchicina de 0,0; 0,1; 0,05; 0,01 y 0,001% durante 24 y 48 horas, de un total de 364 plantas tratadas se lograron

cuatro plantas tetraploides y 16 quimeras. En las plantas tetraploides se incrementó el área foliar, diámetro del tallo y tamaño de flores.

Rodríguez et al. (2006) realizaron un estudio en *Physalis peruviana L.*, cuya carga genética era $2n=24$ y 32 . Luego de la duplicación cromosómica con colchicina al $0,01\%$ y solubilizada en DMSO (Dimetilsulfóxido) aplicando a semillas germinadas *in vivo* como *in vitro*, obtuvieron tetraploides con $2n=4n-4=64$ cromosomas, material que tuvo mayor actividad fotosintética, número de estomas y tamaño de frutos.

Pintos et al. (2007) duplicaron el número de cromosomas para obtener plantas dobles haploides en alcornoque (*Quercus suber L.*). Se utilizaron tres agentes antimitóticos, colchicina, orizalina y amiprofos-metil (APM), que fueron aplicados en el cultivo de anteras *in vitro* en diferentes concentraciones y tiempos de exposición. El agente con mejor respuesta fue la orizalina a $0,01$ mM por 48 horas, alcanzando 50% de embriones duplicados.

Escandón et al. (2006) obtuvieron una nueva variedad poliploide de *Bacopa monnieri* a partir de dos plantas tetraploides mediante la inmersión de segmentos nodales en solución de colchicina al $0,001\%$, $0,01\%$ y $1,0\%$ con DMSO durante 24 y 48 horas, las cuales mostraron deficiencia en el tamaño y color de las hojas con respecto al control.

Molero-Paredes & Matos (2008), indujeron poliploides en *Aloe vera*, la duplicación del número de cromosomas incrementó la altura de las plantas y longitud, ancho, espesor y volumen foliar con respecto a las plantas diploides y quimeras, por lo que estimaron que la poliploidización podría constituir la alternativa para aumentar la producción de biomasa celular en esta especie.

Roughani et al. (2017) reportaron el aumento de cromosomas para incrementar el tamaño de hojas en espinaca. Para ello, sumergieron las semillas sin germinar en una solución acuosa de colchicina ($1, 5$ y 10 mg L⁻¹) y trifuralina ($2,5; 5$ y $7,5$ mg L⁻¹) durante 16, 24 y 32 horas, mientras que en orizalina ($0,01; 0,05$ y $0,1$ mg L⁻¹) por 6, 12 y 24 horas. El nivel de ploidía fue determinado por citometría de flujo y se concluyó que al incrementar la dosis de colchicina disminuye el porcentaje de germinación. No se encontraron diferencias significativas en la eficiencia entre estos tres agentes antimitóticos; sin embargo, se recomienda el uso de colchicina por su baja toxicidad, menor costo y su habilidad para incrementar el nivel de ploidía a menores dosis.

III. METODOLOGÍA

3.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO

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

3.2. MATERIALES

3.2.1. Material vegetal

Semillas de Cañihua (*Chenopodium pallidicaule* A.) variedad ILLPA – INIA, de la estación experimental Agraria Illpa, del Instituto Nacional de Innovación Agraria, Puno (Figura 13).



Figura 13: Semillas de Illpa-INIA usadas para la investigación.

3.2.2. Materiales

Tabla 10: Insumos, materiales y equipos empleados en la investigación.

Insumos	Materiales	Equipos de laboratorio
Sustrato Premix #3	Placas Petri	Autoclave JISICO I- NAS81
Esmalte transparente	Papel toalla	Microcentrífuga
Colchicina	Piceta y Pinzas	Citómetro de flujo Attune NxT
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Bisturí N°10	Cámara fotográfica Dino-capture 2.0
Ác. Acético glacial al 96%	Láminas cobre y porta objetos	Microscopio Olympus BX40F4
Agua destilada	Macetas	Balanza de precisión
Orizalina	Vasos precipitados	Vortex
Alcohol al 70%	Micropipetas de 1000 y 200 µm	
Acetocarmín al 2%	Etiquetas	
Soluciones buffer Otto I y II	Filtros de 50 µm	
RNAsa	Bolsas de papel	

3.3. METODOLOGÍA

3.3.1. Prueba de germinación

Se utilizaron semillas de cañihua de la variedad Illpa-INIA y se llevaron a cabo pruebas de germinación en placas Petri con 4 repeticiones. En cada placa se dispuso papel toalla, acomodando un total de 25 semillas por placa. Luego, se humedeció el papel con agua destilada y se colocaron las placas en una cámara de germinación durante 7 días. Este procedimiento se basó en las pautas recomendadas por la guía ISTA para la evaluación de semillas (Figura 14).

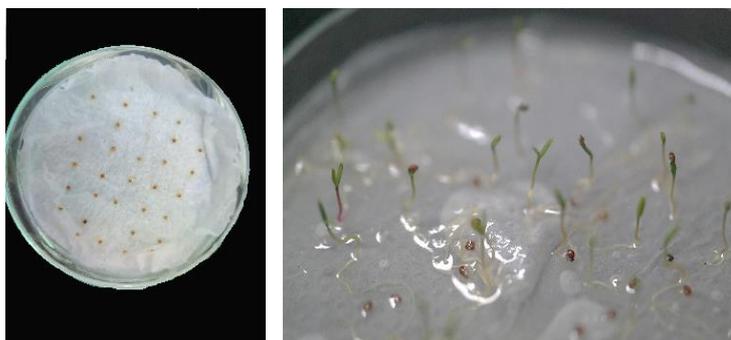


Figura 14: Prueba de germinación con semillas de cañihua Illpa-INIA.

3.3.2. Desinfección de semillas de cañihua

Las semillas de cañihua fueron sometidas a un proceso de desinfección mediante inmersión en hipoclorito de sodio, utilizando lejía comercial al 4% (0.4 ml de lejía comercial en 10 ml de agua destilada) durante un período de 5 minutos y transcurrido este tiempo se realizó tres enjuagues con agua destilada para eliminar cualquier residuo.

3.3.3. Tratamiento en colchicina

Posteriormente a la desinfección de semillas, estas se sumergieron en soluciones de colchicina al 0.5%, 0.75% y 1.0%, previamente diluida en DMSO al 2%. Cada uno de estos tratamientos tuvo una duración de 12 horas y se llevaron a cámara de germinación, manteniendo una temperatura constante de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y asegurando oscuridad al cubrir las muestras con papel aluminio (Figura 15). Para concluir el proceso, se realizó un enjuague exhaustivo de las semillas en cinco ocasiones, utilizando agua destilada. Es importante destacar que cada una de las dosis de colchicina se replicó cuatro veces, empleando 25 semillas en cada repetición para garantizar la robustez de los resultados.

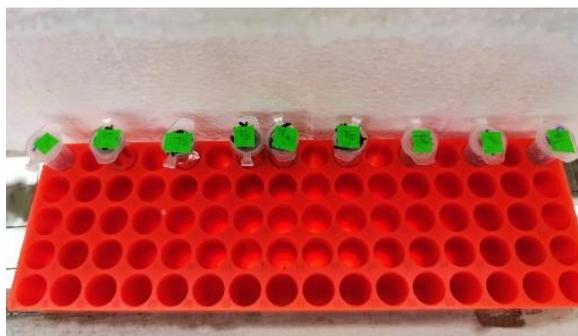


Figura 15: Tubos eppendorf de 2 ml con semillas de cañihua remojadas en los agentes antimicrobóticos.

Las semillas fueron colocadas en macetas utilizando Premix #3 como sustrato y en cámara de germinación durante 07 días, bajo condiciones controladas de temperatura ($16\pm 2^\circ\text{C}$), humedad relativa (50-70%) y fotoperiodo de 12 h/día (Figura 16). Posteriormente, se trasladaron a una casa malla hasta el final de su ciclo.



Figura 16: Cámara de germinación.

3.3.4. Tratamiento en orizalina

Las semillas empleadas para este tratamiento fueron desinfectadas bajo el mismo protocolo descrito anteriormente. Estas semillas fueron pregerminadas durante 6 horas con agua destilada hasta la aparición de las radículas con el fin de lograr mejor absorción del reactivo. Posteriormente, se sumergieron en orizalina a 25, 50 y 75 ppm por 50 minutos en una cámara de germinación a temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$, cubierto con papel aluminio para evitar la fotosensibilidad del reactivo. Finalmente, las semillas se enjuagaron con agua destilada para eliminar cualquier residuo. La orizalina concentrada fue diluida gota a gota con alcohol al 96% enrasados con alcohol al 40% (Figura 17).



Figura 17: Dilución de orizalina con alcohol.

El mismo procedimiento de germinación utilizado en el experimento de colchicina se empleó para el caso de la orizalina (Figura 18).

3.4. EVALUACIONES



Figura 18: Evaluación a los 7 días después de siembra en casa malla.

3.4.1. En macetas

a. Porcentaje de germinación y supervivencia

El porcentaje de germinación fue evaluado a los 04 días de sembradas las semillas. Posteriormente se evaluó el porcentaje de supervivencia a los 09 y 30 días después de siembra (Figura 19).

Para el cálculo del porcentaje se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Germinación/ Supervivencia} = \frac{\text{Número de plántulas germinadas/sobrevivientes}}{\text{Número total de semillas}} \times 100$$



Figura 19: Evaluación de supervivencia a los 30 días después de siembra.

b. Tamaño de planta

La altura de planta fue tomada a los 30 días después de la siembra, en estado de pre-antesis (Figura 20). Se midió desde el primer par de hojas verdaderas hasta el ápice con ayuda de una cinta métrica (Denaeghel et al.,2018). Para este parámetro se consideraron 10 plantas por cada nivel de ploidía encontrado.



Figura 20: Medición de altura de planta a los 30 días después de siembra.

3.4.2. En hojas

a. Medición del tamaño de estoma

Se colectaron las hojas cercanas al ápice de cada planta, se lavaron con detergente para poder limpiar la epidermis de los oxalatos de calcio de la cañihua y cualquier suciedad que pudiese estar adherida a la superficie, estas hojas pequeñas se enjuagaron con agua destilada y secaron en papel toalla. Las hojas se cubrieron con esmalte de uñas transparente, luego se despegó la epidermis inferior (Figura 21), se colocó en un portaobjetos con una gota de agua destilada y un cubreobjetos. Estas muestras se utilizaron para la medición de largo, ancho y densidad estomática, en el microscopio con aumento de 40X, donde se tomaron las fotos y fueron medidas mediante el programa Dinocapture 2.0 (AnMo Electronics Corporation, 2016). Por cada hoja se evaluaron 30 estomas.



Figura 21: Hojas de cañihua para medición de estoma con la técnica del esmaltado.

b. Densidad estomática

La medición de la densidad estomática involucró varias etapas. En primer lugar, se procedió a la recolección de hojas primarias (hojas iniciales y jóvenes), las cuales fueron cuidadosamente enjuagadas y posteriormente secadas delicadamente en papel toalla. Para llevar a cabo la medición de la densidad estomática, se aplicó la técnica de la impresión de la capa de esmalte sobre las muestras de hojas, estas láminas fueron observadas bajo el microscopio Olympus BX40F4 con una gota de agua. Para capturar y analizar las imágenes resultantes, se utilizó el software DinoCapture 2.0.

Adicionalmente, se empleó la siguiente fórmula para calcular la densidad estomática:

$$DE = \frac{NE}{AF}$$

DE: Densidad estomática

NE: Número de estomas

AF: Unidad de área foliar en mm²

3.4.3. En grano de polen

a. Diámetro de polen

Para la determinación del diámetro de polen, se recolectó el polen de cada planta con ayuda de una pinza en un portaobjetos que contenía una microgota 100 µl de Acetocarmín al 2% se deja reposando unos 3 minutos y se coloca el cubreobjetos (Gupta et al., 2017). Esta muestra se observó bajo un microscopio Olympus BX40F4 y se procesó mediante el software DinoCapture 2.0 (AnMo Electronics Corporation, 2016).

3.4.4. Determinación del nivel de ploidía

Se recolectaron las hojas del tercio superior de la planta y se enjuagaron con agua y detergente por 3 minutos aproximadamente. Este procedimiento se llevó a cabo con el propósito de eliminar cualquier suciedad y cristales de oxalato de calcio de las hojas de cañihua los cuales podrían generar errores en el análisis de citometría. Posteriormente se secaron las hojas con papel toalla y se procedió a preparar las muestras de acuerdo con el protocolo de Doležel et al. (2007), según el análisis de ploidía con estándar externo, donde se prepara una muestra a partir de una planta (de referencia) con una ploidía conocida (número de cromosomas) y son analizadas en diferentes momentos. Como estándar de referencia externo se utilizó *Solanum lycopersicum* L. "Stupické polni rané".

Para la preparación de muestras, se tomó una superficie de 1 cm² de área foliar a la cual se le añadieron 300 µl de solución buffer para la extracción de núcleos (Otto I). Luego se picó la muestra en una placa Petri fría con ayuda de una hoja de afeitar nueva, se vertió el contenido en un filtro de nylon de 40 µm y el líquido resultante se recolectó en tubos eppendorf. Estos tubos se mantuvieron a baja temperatura durante 5 minutos y se añadió Otto II, solución que contiene el fluorocromo Ioduro de propidio. Finalmente, cada muestra se analizó cada muestra en el citómetro de flujo Attune Nxt (Thermo Fisher Scientific) (Figura 22).

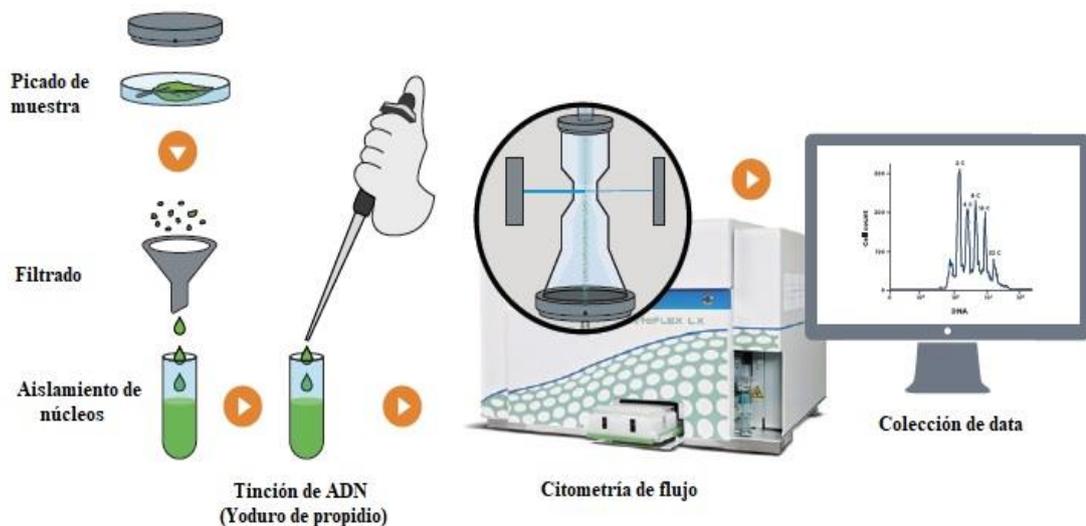


Figura 22: Procesamiento de muestra para análisis de citometría de flujo.

3.4.5. Determinación del tamaño de genoma

Las hojas tiernas fueron recolectadas, se enjuagaron con agua y detergente por 3 minutos aproximadamente. Este procedimiento se llevó a cabo con el propósito de eliminar cualquier suciedad y cristales de oxalato de calcio de las hojas de cañihua los cuales podrían generar errores en el análisis de citometría.

A continuación, se siguió el protocolo descrito por Doležel et al. (2007), en el cual se incorpora el uso de una planta de tamaño de genoma conocido (estándar de referencia). Para llevar a cabo este proceso, se empleó 1 cm² de tejido foliar del estándar de referencia y de la muestra a analizar en una placa Petri refrigerada previamente. A ambas muestras se les añadió 500 µl de Otto I y se procedió a picarlas con una cuchilla de afeitarse nueva. La solución restante se filtró a través de una malla de 40 µm y fue colectada en un tubo eppendorf. Posteriormente, se añadió Otto II, que contiene 50 µg/ml de yoduro de propidio y RNasa durante 5 minutos y finalmente, se procedió al análisis mediante citómetro de flujo Attune Nxt (Thermo Fisher Scientific).

El tamaño de genoma fue determinado utilizando la fórmula propuesta por Doležel et al. (2007):

$$TG(A) = TG(B) \times \frac{\text{Posición medio del pico } G_1 (A)}{\text{Posición medio del pico } G_1 (B)}$$

TG: Tamaño de genoma

A: Planta con tamaño de genoma desconocido en picogramos

B: Planta con tamaño de genoma conocido en picogramos

G₁: Primera fase del ciclo celular donde las células se preparan para la división.

3.4.6. Análisis estadístico

a. Diseño experimental

Se empleó el diseño Completamente al azar (DCA) 5 tratamientos y 4 repeticiones. Se tuvieron 2 experimentos con diferentes agentes poliploidizadores: colchicina y orizalina (Tabla 11 y 12).

Tabla 11: Descripción de los tratamientos con colchicina

Tratamiento	Agente	Concentración	Tiempo
T0 (Control)	Agua destilada	-	
T1	DMSO	2%	
T2	Colchicina	0,50%	12 horas
T3	Colchicina	0,75%	
T4	Colchicina	1,00%	

Tabla 12: Descripción de los tratamientos con orizalina.

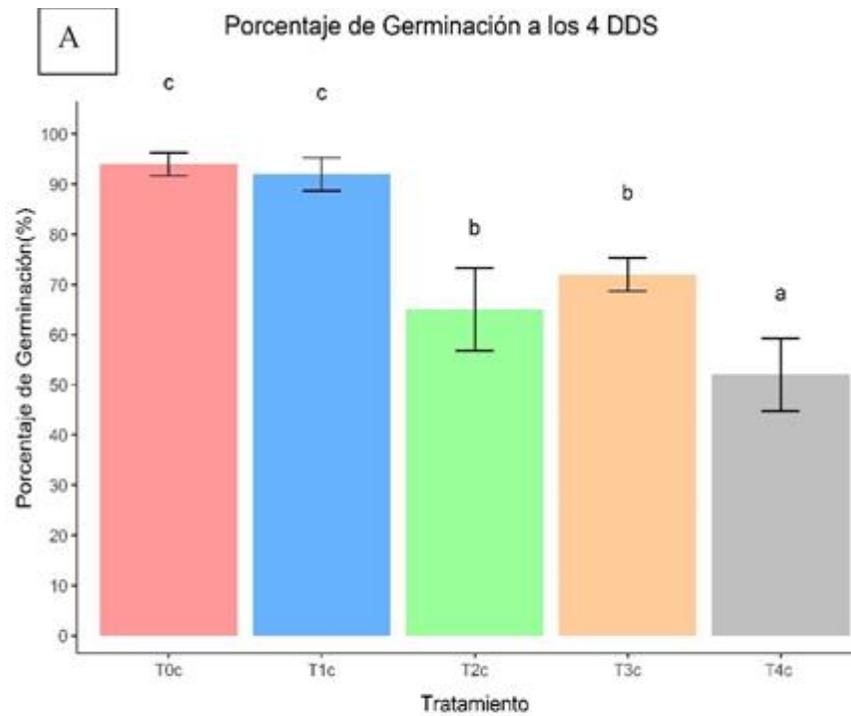
Tratamiento	Agente	Concentración	Tiempo
T0(Control)	Agua destilada	-	
T1	Alcohol	40%	
T2	Orizalina	25 ppm	50 minutos
T3	Orizalina	50 ppm	
T4	Orizalina	75 ppm	

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

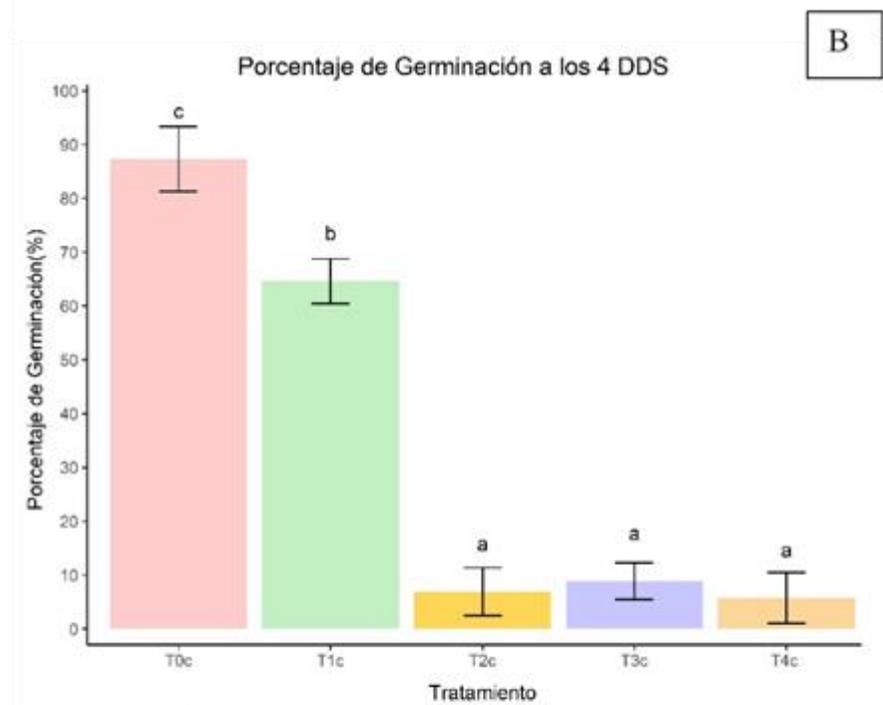
4.1. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE AGENTES ANTIMITÓTICOS EN LA GERMINACIÓN DE LA SEMILLA DE CAÑIHUA

Los resultados de germinación a los 4 DDS presentados en la Figura 23, indican que a medida que se incrementa la dosis de colchicina y orizalina, la tasa de germinación disminuye. Asimismo, se observa que la utilización de DMSO al 2% como solvente no tiene un efecto adverso en la germinación de las semillas, como se detalla en la Tabla 13 ($p \geq 0.05$). Esto se debe a que el DMSO aumenta la permeabilidad de la membrana sin causar toxicidad. Cabe destacar que investigadores como Sanders & Hull (1970) han señalado que concentraciones superiores al 2% resultan ser fitotóxicas en semillas cuando se combinan con colchicina.

Tanto la colchicina como la orizalina se clasifican como reactivos tóxicos; sin embargo, la orizalina se prefiere como alternativa para inducir la duplicación de cromosomas debido a su menor nivel de toxicidad y a su mayor capacidad para interactuar con los microtúbulos de las plantas, incluso a concentraciones más bajas en comparación con la colchicina, tal como se ha señalado en investigaciones previas (Zhang et al., 2020). Un aspecto positivo de utilizar estos agentes antimitóticos en concentraciones reducidas es que permite mantener la exposición durante un período prolongado, logrando, al mismo tiempo, un porcentaje de germinación que incluye algunas plantas poliploidizadas. Según Manzoor et al. (2019), para lograr el efecto de poliploidización en las plantas, se recomienda el uso de dosis bajas junto con exposiciones prolongadas.



T0c: Agua destilada
 T1c: Agua destilada + DMSO 2%
 T2c: Colchicina 0,50%
 T3c: Colchicina 0,75%
 T4c: Colchicina 1%



T0: Agua destilada
 T1c: Alcohol al 40%
 T2c: Orizalina 25 ppm
 T3c: Orizalina 50 ppm
 T4c: Orizalina 75 ppm

Figura 23: (A) Evaluación del porcentaje de germinación de la colchicina a los 4 DDS. (B) Evaluación del porcentaje de germinación de orizalina a los 4 DDS. Las líneas sobre las barras representan SD (Desviación estándar).

Como se observa en el Figura 23B y Tabla 13, la orizalina causó una disminución del porcentaje de germinación por debajo del 9%. Mo et al. (2020) reporta resultados similares donde altas dosis de orizalina inhiben la germinación de semillas en *Rhododendro*. La orizalina puede detener las células en fases específicas del ciclo celular, como la interfase o la mitosis, que puede conducir a la interrupción de eventos celulares críticos, incluida la germinación de las semillas.

Por otro lado, la germinación en el experimento con orizalina, disminuyó significativamente en contraste con el tratamiento control por efecto del alcohol al 40% (T1c) empleado para diluir la orizalina (Tabla 13). Salehi et al. (2008) y Butnor et al. (2018) reportan la disminución en la germinación de semillas de *Lolium* y *Picea*, al remojarlas en etanol a concentraciones de 10% y 40,8% respectivamente, a consecuencia que este solvente causa daños en el embrión de las semillas.

Tabla 13: Germinación de colchicina y orizalina a los 4 DDS considerando el efecto de los solventes de los agentes antimítóticos (Colchicina T1: DMSO AL 2% y Orizalina T1: Alcohol al 40%).

Agente antimítótico	Tratamiento	% de Germinación±SD*
Colchicina	T0	94.0±2.31 c
	T1	92.0±3.27 c
	T2	65.0±8.25 b
	T3	72.0±3.27 b
	T4	52.0±7.30 a
Orizalina	T0	87.3±6.07 c
	T1	64.6±4.17 b
	T2	6.92±4.44 a
	T3	8.85±3.41 a
	T4	5.77±4.76 a

*Desviación estándar.

4.2. EFECTO DE LOS AGENTES ANTIMÍTÓTICOS EN LA SUPERVIVENCIA EN PLANTAS DE CAÑIHUA.

Al pasar los días ambos agentes antimítóticos disminuyen el porcentaje de supervivencia de las plantas de cañihua, sin embargo; al incrementar la concentración de estos reactivos el porcentaje disminuye; a pesar de ello, el efecto de la orizalina es mucho mayor, pues la supervivencia a los 30 días desciende en promedio a 7,18% (Figura 24), mientras que tratamientos con colchicina disminuyeron a 46,0%. Las dosis más altas de 1% colchicina y

75 ppm de orizalina mostraron resultados de supervivencia de 69,41% y 5%, respectivamente. Bae et al. (2020) mencionan que la orizalina actúa a concentraciones mucho más bajas a diferencia de la colchicina, donde se evidenció respuesta de poliploidización a partir de dosis de 20 ppm aplicadas en ápices de *Citrullus lanatus*.

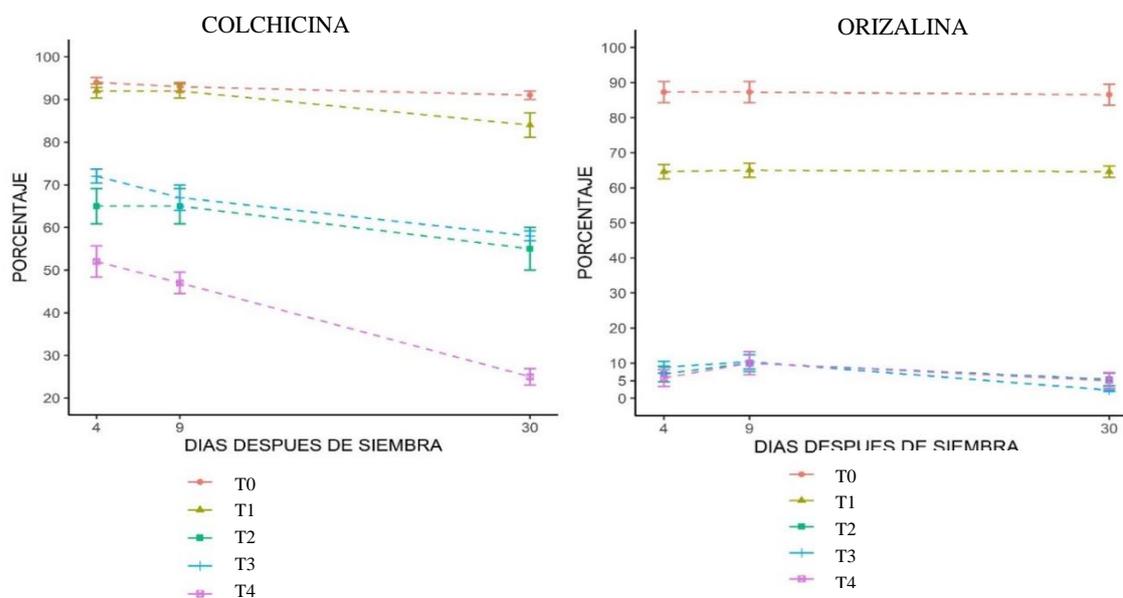


Figura 24: Supervivencia de **plantulas** de cañihua durante 30 días luego de ser tratadas con colchicina y orizalina respectivamente.

4.3. IDENTIFICACIÓN DE PARÁMETROS MORFOLÓGICOS DE POLIPLOIDES EN EL CULTIVO DE CAÑIHUA.

4.3.1. Engrosamiento del hipocótilo en las plántulas

Durante la evaluación de supervivencia, las plántulas presentaron anomalías morfológicas en el hipocótilo como se muestra en la Figura 25. Mo et al. (2020), reportan estas características y mencionan que agentes antimitóticos como la orizalina pueden inhibir el crecimiento de la radícula y el hipocótilo, mientras que los cotiledones que se muestran suelen ser de un verde más oscuros y bastante gruesos, mostrando un incremento de contenido de clorofila. Narukawa et al. (2016), mencionan que existe relación entre el nivel de ploidía y la elongación celular ocasionada por daños en la cutícula y generando un crecimiento más lento.

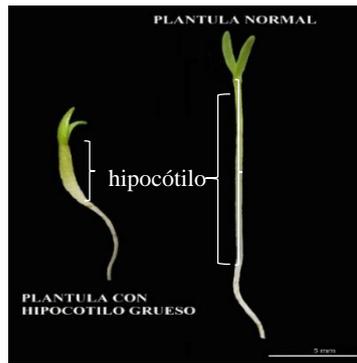


Figura 25: Plántula anormal y plántula normal.

4.3.2. Altura de planta de cañihua

La evaluación de este parámetro evidenció disminución de altura de la planta a los 30 DDS por efecto de ambos agentes antimitóticos como se muestra en la Figura 26 y 27. En estas figuras se observa una disminución porcentual promedio del 76,5% en comparación con el grupo control. Contrariamente a lo que comúnmente se reporta en la literatura, donde se sugiere que el tamaño de la planta aumenta con el nivel de ploidía (Gosztola et al., 2006; Liqin et al., 2019). Este fenómeno podría explicarse debido a daños a nivel de células cuticulares y acumulación de citoquininas que provocan entrenudos más cortos y hábitos de crecimiento más compactos en poliploides (Fakhrzad et al., 2023; Liu et al., 2007; Narukawa et al., 2016).

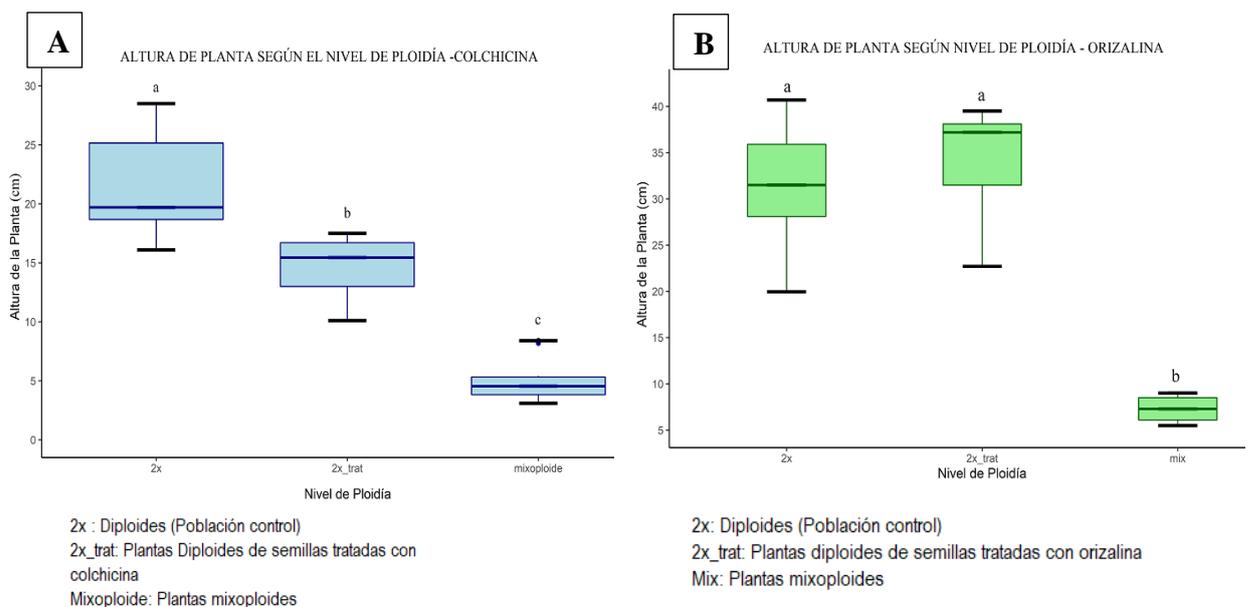


Figura 26: Evaluación de la altura de plantas de cañihua tratadas con: (A) Colchicina y (B) Orizalina.

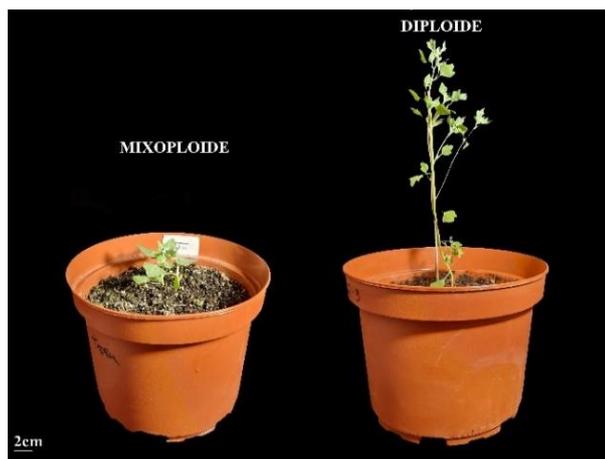


Figura 27: Diferencia entre la altura de plantas del grupo mixoploide con un diploide.

4.3.3. Engrosamiento de hoja en plantas poliploides de cañihua

Una de las características cualitativas que también se encontraron en las plantas del grupo mixoploide fue el engrosamiento y el cambio de color del tejido de las hojas en comparación del grupo diploide (Figura 28). Li et al. (2009) y Van de Peer et al. (2021) reportaron que la epidermis superior e inferior fueron más gruesas y con mayor pubescencia en las hojas de poliploides en comparación con las especies diploides de *Lonicera japónica*, características que evitan la pérdida de agua en las plantas, confiriendo mayor tolerancia a la sequía.

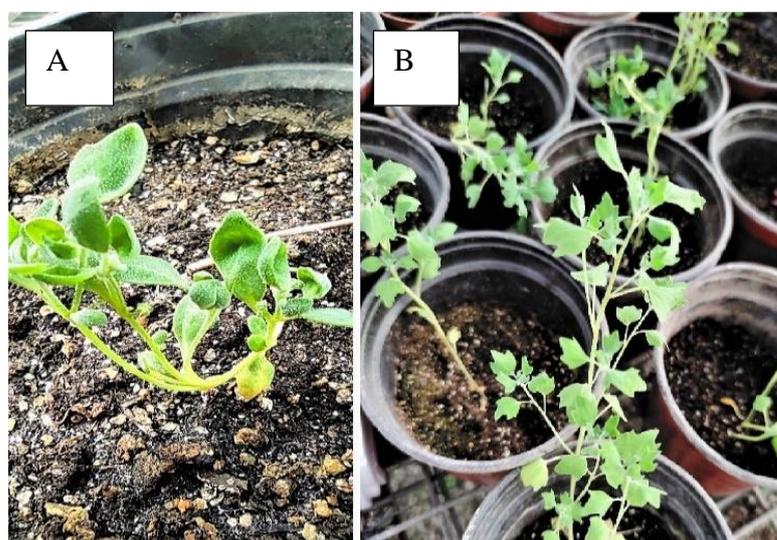


Figura 28: (A) Hojas engrosadas planta mixoploide.
(B) Hojas normales de planta diploide.

4.3.4. Retraso fenológico en plantas poliploides de cañihua

Las evaluaciones de supervivencia permitieron observar el comportamiento de plantas diploides y mixoploides a lo largo del ciclo de cultivo, evidenciando un retraso fenológico en la población mixoploide en comparación con los individuos diploides (Figura 29). Corneillie et al. (2019) y Otto (2007) han destacado que las plantas poliploides tienden a mostrar una división celular más lenta y un crecimiento más pausado, lo que se traduce en ciclos vegetativos prolongados y una floración tardía. Estas características son altamente valoradas en programas de mejoramiento genético enfocados en obtener una mayor producción de biomasa. Además, en el caso particular de la cañihua, este retraso fenológico resulta especialmente relevante para su cultivo destinado a la alimentación animal, debido a su elevado valor proteico y la capacidad de adaptarse a entornos desafiantes.

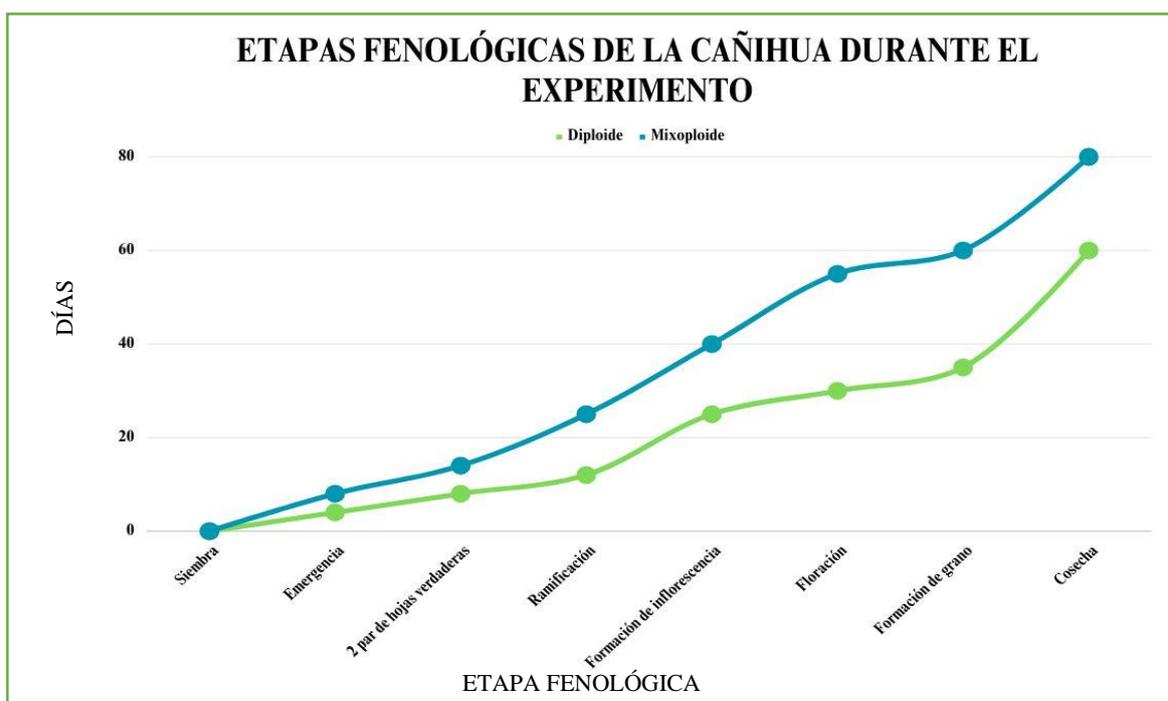


Figura 29: Etapas fenológicas de cañihua

4.4. DIFERENCIAS ESTOMÁTICAS EN POLIPLOIDES

4.4.1. Largo de estoma

El largo de estoma ha sido tomado como un marcador morfológico para la identificación del incremento en el nivel de ploidía. Es así como se ha reportado en diversas especies como en Rye Grass (Speckmann et al., 1965), trigo (Wang et al., 1989), café (Mishra, 1997) diferencias significativas a diferentes niveles de ploidía. Estos cambios en el tamaño celular

tienen impacto positivo en las plantas de mayor ploidía, reportándose la mejor regulación en el intercambio de gases (Lehmann & Or, 2015). Como se observa en la Figura 30 y Figura 31, las plantas tratadas con colchicina muestran el incremento significativo en el largo estomático de la población mixoploide ($20,9 \pm 0,509 \mu\text{m}$) en contraste del control ($15,34 \pm 0,374 \mu\text{m}$) y diploide tratado ($16,02 \pm 0,342 \mu\text{m}$), esto es explicado por el incremento del tamaño celular. Además, esta tendencia se mantuvo también en las plantas tratadas con orizalina reportando valores de $17,13 \pm 0,578$; $14,89 \pm 0,356$ y $15,12 \pm 0,362 \mu\text{m}$ para la población mixoploide, diploide tratado y el control respectivamente; sin embargo, no hubo diferencias estadísticas significativas entre las plantas tratadas con los agentes antimitóticos.

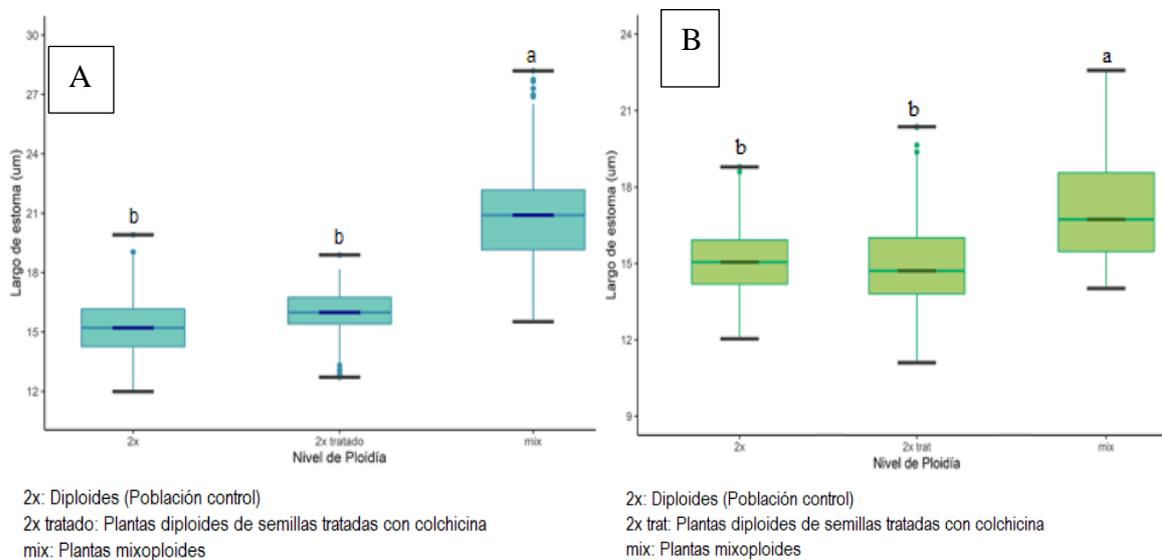


Figura 30: (A) Mediciones de largo de estoma de cañihua con colchicina.
(B) Mediciones del largo estomático de cañihua con orizalina.

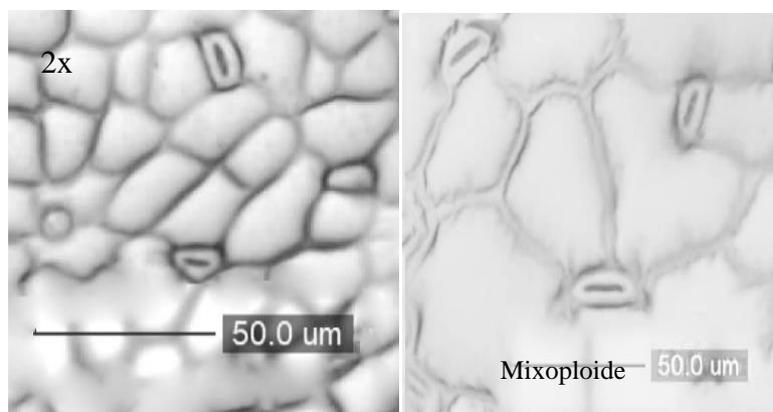


Figura 31: Diferencia en largo y ancho de estoma plantas tratadas con orizalina.

4.4.2. Ancho de estoma

Diversos estudios han señalado la estrecha conexión entre el tamaño de genoma y las dimensiones de las células (Kudo & Kimura, 2002; Monda et al., 2016; Urwin et al., 2007). Estas investigaciones han evidenciado consistentemente que las células poliploides tienden a ser más grandes que las células de sus progenitores diploides. Es fundamental destacar que la relación entre el nivel de ploidía y el tamaño celular no sólo impacta en las características morfológicas, sino que también influye en el fenotipo, la historia evolutiva y la división taxonómica, entre otros (Laere et al., 2009). En este contexto, los resultados del presente estudio revelan un mayor ancho de estoma en plantas mixoploides en comparación con las diploides de cañihua. Se puede observar en la figura 32, las tablas 13 y 14 hubo diferencia significativa tanto para la colchicina en las plantas tratadas con orizalina según los diferentes niveles de ploidía (diploides y mixoploides).

En el caso de colchicina, el grupo mixoploide presentó una medida de $10.96 \pm 0.342 \mu\text{m}$ mientras que el diploide tuvo $8.39 \pm 0.264 \mu\text{m}$. Por otro lado, las plantas diploides luego de ser tratadas muestran un ligero incremento en el ancho ($8.68 \pm 0.273 \mu\text{m}$) esto debido probablemente a las mutaciones que sufren las plantas al ser expuestas al reactivo. Adicionalmente, el efecto de la orizalina es similar al de colchicina, no obstante, se observa una mayor variabilidad, esto puede deberse a momentos de medición distintos donde el ancho estomático se encontraba en una apertura o cierre estomático como mencionan los autores descritos líneas arriba.

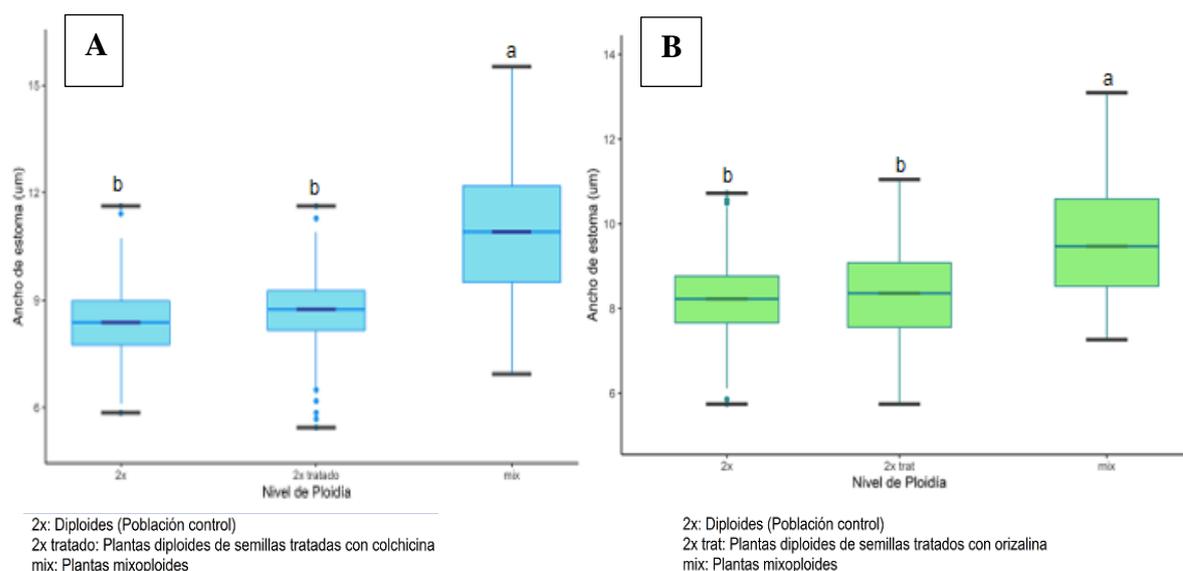


Figura 32: Evaluación del ancho de los estoma de las plantas tratadas con agentes poliploidizadores luego de ser agrupadas por citometría de flujo.(A) Colchicina (B) Orizalina.

4.4.3. Densidad estomática

Como se ha evidenciado para los parámetros ancho y largo de estoma, las plantas mixoploides tuvieron estomas más grandes, por lo cual el número de estomas por campo se redujo (Figura 33). Este efecto se evidencia para la colchicina y la orizalina, donde los valores fueron significativos de $259,91 \pm 7,866 \text{ mm}^2$ para la población mixoploide, y para los diploides $412,36 \pm 6,817 \text{ mm}^2$.

A diferencia del largo y ancho de estoma, que son características directamente proporcionales, la densidad estomática se presenta como un parámetro inversamente proporcional. Es decir, a medida que se incrementa el nivel de ploidía, la densidad estomática es menor. Como se ha mencionado uno de los cambios más recurrentes en las plantas poliploides es el incremento del tamaño celular, y principalmente en las células estomáticas (Rao et al., 2019).

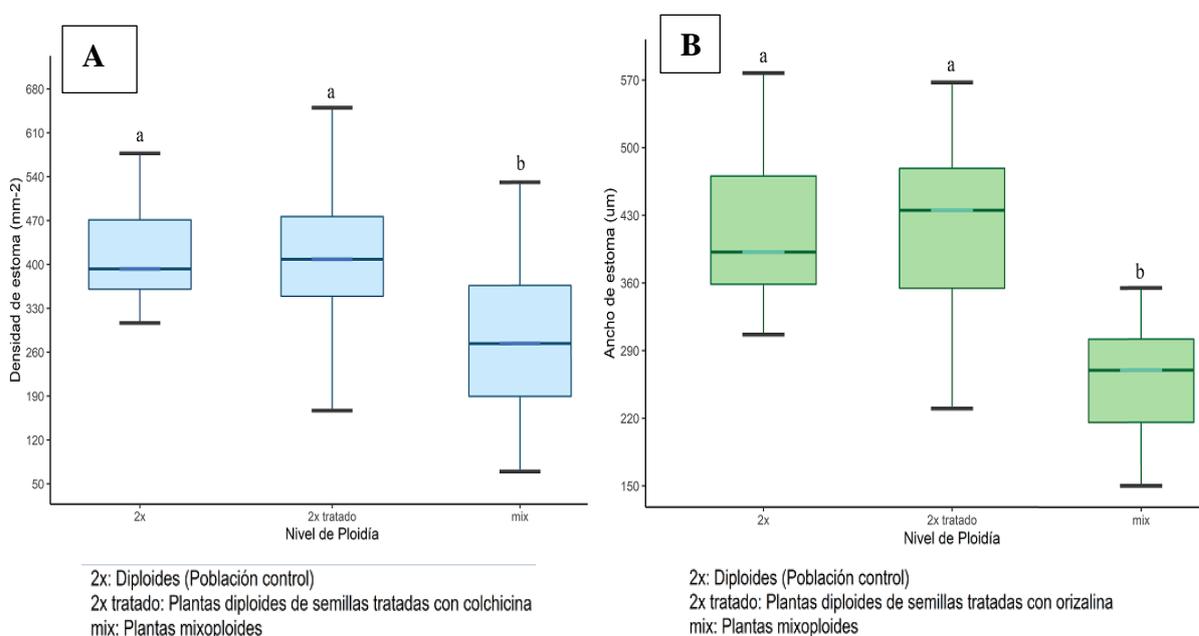


Figura 33: Evaluación de densidad estomática a plantas tratadas con agentes: (A) Colchicina y (B) Orizalina.

Por otro lado, en la Figura 34 se aprecia las diferencias mencionadas en largo y ancho de los estomas en los mixoploides en comparación con los diploides. El rango de valores desde 14.368 hasta 28.367 μm aproximadamente el doble del menor tamaño. Adicionalmente, se incrementó el tamaño de las células y disminución de la densidad estomática.

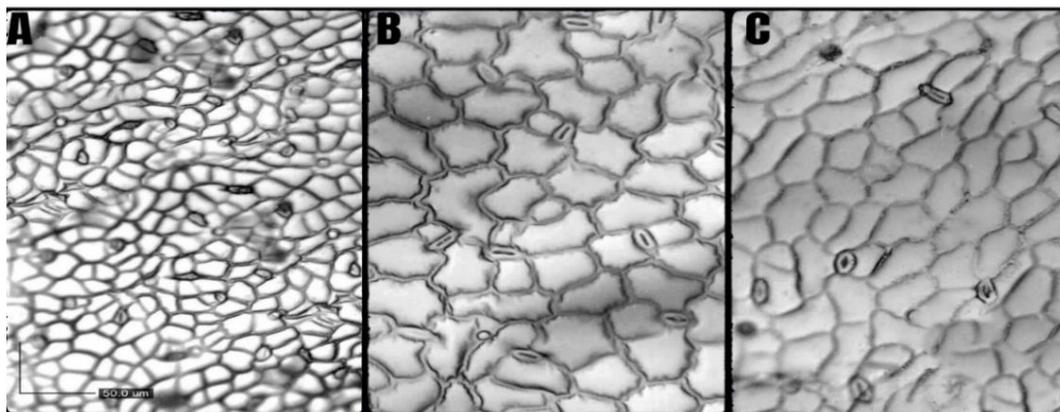


Figura 34: Tamaño y densidad estomática. (A) Diploide-Control (B) Mixoploide tratado con Colchicina. (C) Mixoploide tratado con Orizalina.

4.5. DIÁMETRO DE POLEN

En la Figura 35 y 36 se ilustra el impacto provocado por la colchicina y la orizalina en el incremento del tamaño del grano de polen. Al analizar el grupo de individuos mixoploides, se observa un incremento promedio del 16,5% en el diámetro del polen en comparación con el diploide de control, utilizando el primer reactivo. Por otro lado, al emplear orizalina, este incremento asciende a un 32,4% respecto al diploide. Ambos inductores de poliploidización lograron aumentar el diámetro del polen del diploide en más del 2,1%.

El tamaño del grano de polen ha sido tradicionalmente empleado como un marcador indicativo del nivel de ploidía en las plantas. Esto se relaciona con la tendencia observada en algunas especies vegetales donde existe una correlación positiva entre el tamaño del polen y el nivel de ploidía. En teoría, la poliploidía incrementa el tamaño del grano de polen al menos a la mitad. Autores como Mirzaee & Hassani (2010) y Tate et al. (2009) mencionan que la aplicación de colchicina puede aumentar el diámetro del polen, incluso cuando el nivel de ploidía es el mismo, como se evidencia en ambos experimentos.

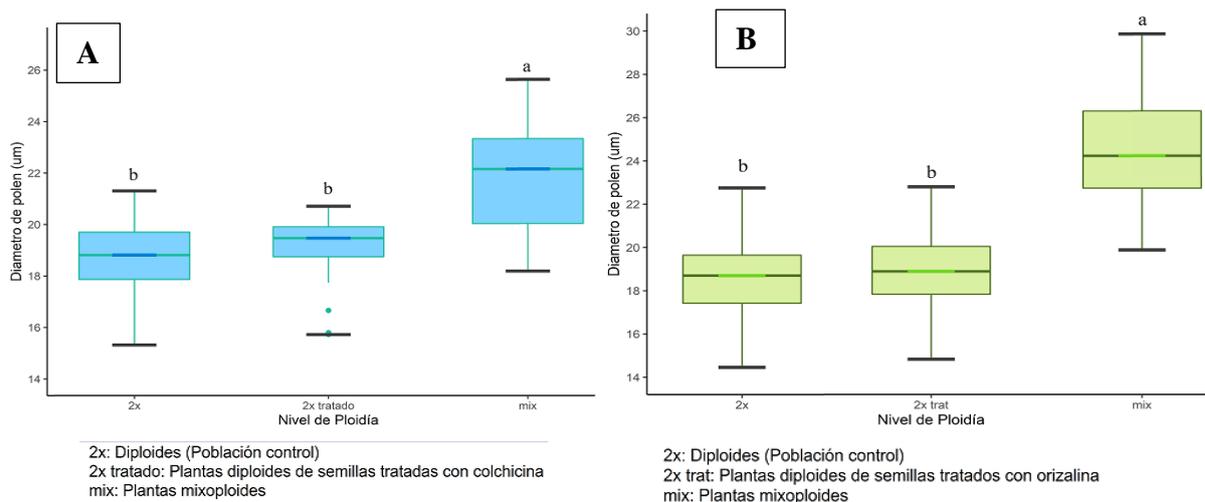


Figura 35: Evaluación del diámetro de polen en plantas de cañihua tratadas con: (A) Colchicina y (B) Orizalina.

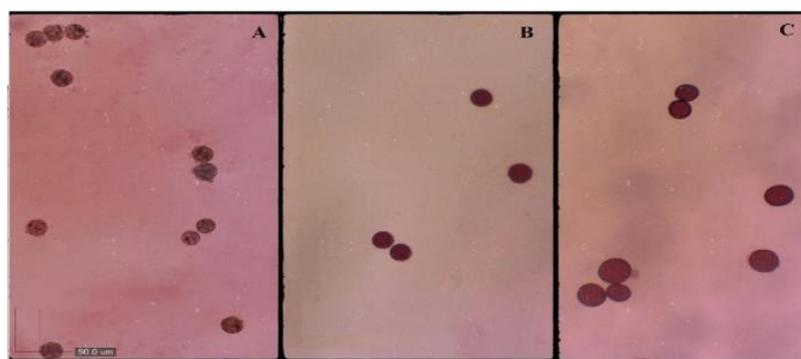


Figura 36: Diferencias entre granos de polen de cañihua con orizalina. (A) Diploide. (B) Diploide tratado. (C) Mixoploide

4.6. RELACIÓN ENTRE PARÁMETROS MORFOLÓGICOS Y CITOLÓGICOS Y NIVEL DE PLOIDÍA.

Colchicina: Como se resume en la Tabla 14, se observan diferencias significativas en los parámetros evaluados entre los grupos de plantas con distintos niveles de ploidía. El grupo mixoploide exhibe valores superiores en los parámetros de largo, ancho de estoma y diámetro de polen en comparación con el grupo diploide, lo que indica un impacto considerable del nivel de ploidía en estas características.

La Figura 37 respalda estos hallazgos al mostrar una clara relación positiva entre los parámetros mencionados y el nivel de ploidía. Se destaca especialmente una relación más marcada en el parámetro de largo de estoma. Estos resultados sugieren que, a medida que

aumenta el nivel de ploidía, se observa un incremento en el tamaño tanto del estoma (en términos de largo y ancho) como en el diámetro del polen. Estos hallazgos respaldan la idea de que la variación en el nivel de ploidía puede tener un impacto significativo en las características morfológicas evaluadas, proporcionando insights valiosos sobre la influencia de la ploidía en el desarrollo y la estructura de la planta (McGoey et al., 2014). Por otro lado, se evidenció una relación negativa entre los parámetros de densidad estomática y la altura de la planta en función del nivel de ploidía, indicando que a medida que aumenta el nivel de ploidía, ambos parámetros tienden a disminuir. Es relevante destacar que la relación más pronunciada se observó en el parámetro de altura de planta, como se muestra en el gráfico de correlación de Pearson (Figura 37).

Tabla 14: Resumen datos morfológicos para colchicina.

Nivel de ploidía	Altura de planta (cm)+ SD*	Largo de estoma (μm)+SD*	Ancho de estoma (μm)+SD*	Densidad estomática (mm ⁻²)+SD *	Diámetro de polen (μm)+SD*
Diploide	21.45 ± 1.385 a	15.34 ± 0.374 b	8.39 ± 0.264 b	413.27 ± 9.723 a	18.75 ± 0.119 b
Diploide tratado	14.66 ± 0.869 b	16.02 ± 0.342 b	8.68 ± 0.273 b	402.62 ± 13.751 a	19.13 ± 0.122 b
Mixoploides	5.07 ± 0.582 c	20.91 ± 0.509 a	10.96 ± 0.342 a	281.75 ± 13.751 b	21.78 ± 0.138 a

*SD: Desviación estándar. Prueba de Tukey. P-valor ≥0.05

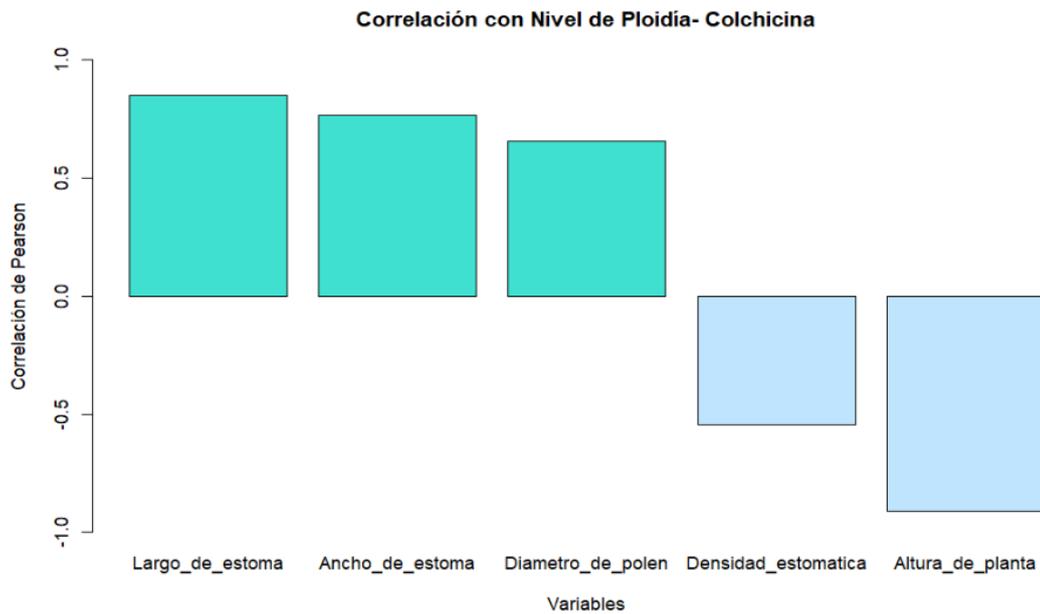


Figura 37: Correlación de Pearson entre el nivel de ploidía y los parámetros evaluados para las plantas de cañihua tratadas con colchicina.

Orizalina: Se destacó un patrón similar al observado con la colchicina. La población de plantas mixoploides exhibió diferencias significativas en comparación con la población diploide en todos los parámetros evaluados, como se detalla en la Tabla 15.

Al explorar las relaciones mediante el análisis de correlación de Pearson (Figura 38), se evidenció una asociación positiva entre el nivel de ploidía y los parámetros relacionados con el tamaño del estoma (largo y ancho), así como con el diámetro del polen. En contraste, se observó una relación negativa en relación con la densidad estomática y la altura de la planta.

Estos hallazgos refuerzan la consistencia en los efectos inducidos por la orizalina, corroborando la influencia del nivel de ploidía en los aspectos morfológicos y fisiológicos de las plantas, aspecto fundamental para comprender las respuestas a los agentes poliploidizantes.

Tabla 15: Resumen de características morfológicas para orizalina.

Nivel de ploidía	Altura de planta (cm)+SD*	Largo de estoma (μm)+SD*	Ancho de estoma (μm)+SD*	Densidad estomática (mm^{-2})+SD *	Diámetro de polen (μm)+SD*
Diploide	31.23 \pm 3.524 a	15.12 \pm 0.362 b	8.25 \pm 0.185 b	412.36 \pm 6.817 a	18.52 \pm 0.360 b
Diploide tratado	33.80 \pm 3.091 a	14.89 \pm 0.356 b	8.36 \pm 0.188 b	419.46 \pm 8.567 a	18.87 \pm 0.509 b
Mixoploides	7.28 \pm 0.671 b	17.13 \pm 0.578 a	9.56 \pm 0.302 a	259.91 \pm 7.866 b	24.53 \pm 0.360 a

*SD: Desviación estándar. Prueba de Tukey. P-valor ≥ 0.05

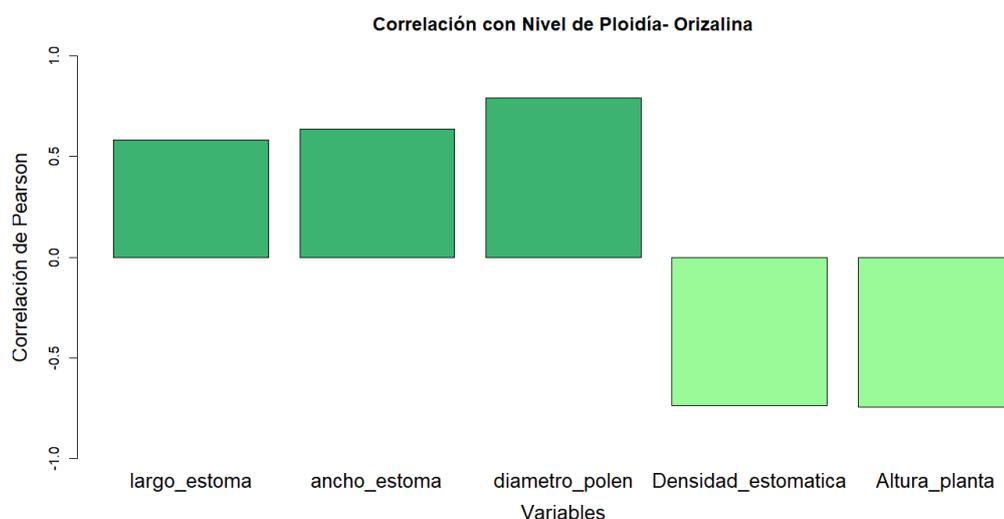


Figura 38: Correlación de Pearson entre el nivel de ploidía y los parámetros evaluados para las plantas de cañihua tratadas con orizalina.

4.7. COMPARACIÓN DE CONCENTRACIONES ÓPTIMAS PARA LA INDUCCIÓN DE POLIPLOIDÍA EN SEMILLAS DE CAÑIHUA: ESTUDIO CON COLCHICINA Y ORIZALINA

Los resultados presentados en la Tabla 16 revelan que la utilización de colchicina como agente poliploidizador generó un mayor número de individuos poliploides, alcanzando una tasa de poliploidización del 25.85%. En contraste, el experimento con orizalina solo logró una tasa del 2.75%, principalmente debido a la elevada mortalidad de las plántulas durante los primeros 30 días.

En relación con los tiempos de exposición, se determinó previamente que, a partir de las seis horas, las semillas tratadas con colchicina iniciaban el proceso de germinación, y la radícula emergía en un 80% del total de semillas a las 12 horas. Esta rápida germinación dificultaba la manipulación durante el enjuague del reactivo. Por ende, se buscó exponer las semillas a la colchicina durante el mayor tiempo posible.

Por otro lado, debido a la alta toxicidad de la orizalina, se observó que dosis más bajas eran eficaces (Manzoor et al., 2019). Sin embargo, se encontró que exposiciones superiores a una hora reducían la supervivencia de las plántulas a menos del 10%. Entre todos los tratamientos, aquel con una concentración de colchicina al 0.75%, con una exposición de 12 horas, logró el mayor porcentaje de individuos mixoploides.

Tabla 16: Eficiencia e inducción de poliploidización en cañihua con colchicina y orizalina.

Reactivo	[c]	Tiempo de exposición	N° semillas tratadas	Plantas sobrev.	Supervivencia (%)	Inducción de mixoploides	Diploides	Eficiencia de mixo.
A	0	12	100	91	91%	0.00%	100%	0.00%
	0.50%	12	100	49	49%	51.21%	48%	25.09%
	0.75%	12	100	49	49%	52.75%	47%	25.85%
	1.00%	12	100	20	20%	6.25%	94%	1.25%
B	0	50 min	100	85	85%	0.00%	100%	0.00%
	25 ppm	50 min	100	13	13%	14.58%	85.42%	1.90%
	35 ppm	50 min	100	11	11%	25.00%	75%	2.75%
	45 ppm	50 min	100	6	6%	0.00%	100%	0.00%

[c]: Concentración. A: Colchicina. B: Orizalina.

Adicionalmente, para la determinación del nivel de ploidía las plántulas sobrevivientes se analizaron por citometría de flujo. A continuación, la Figura 39 nos muestra los picogramas de dos especies analizadas, un mixoploide, que presenta picos adicionales que representan que existe células con ADN con una intensidad de fluorescencia mayor que en el gráfico que representa a un organismo diploide. Un mixoploide se caracteriza por la presencia de células con diferentes juegos cromosómicos (Kunakh et al., 2008), mientras que un diploide se caracteriza por poseer sólo dos juegos de cromosomas. El valor "C" se utiliza a menudo en citometría de flujo para determinar la ploidía de una célula o un tejido, y puede ser útil para la identificación de anomalías cromosómicas, como la poliploidía, que se produce cuando una célula tiene más de dos juegos de cromosomas. En este caso el pico 2C, representa las células que se encuentran en fase G0/G1 con ADN diploide. El pico 4C representa las células que se encuentran en fase G2 (que se encuentran en mitosis).

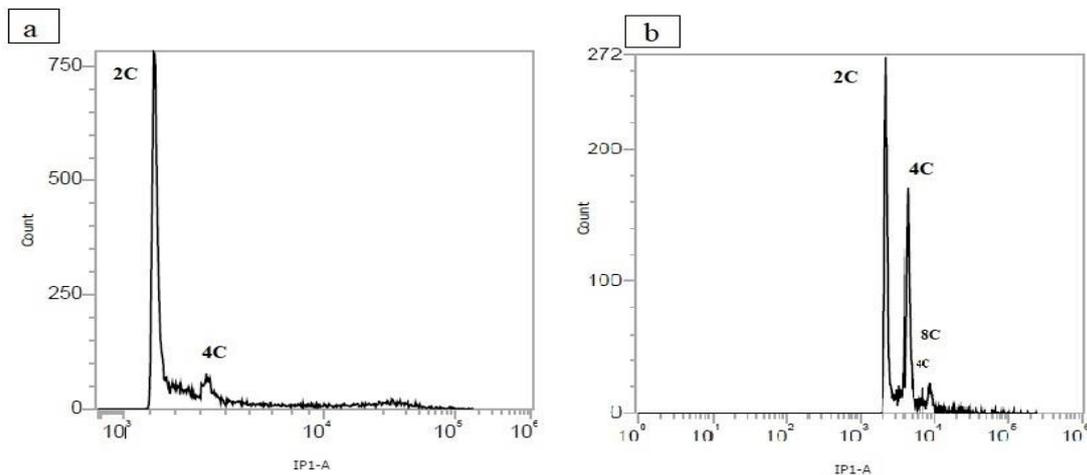


Figura 39: A. Histogramas monoparamétrico de un diploide de cañihua:
Histograma de un mixoploide de cañihua.

4.8. ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE GENOMA DE CAÑIHUA (*Chenopodium pallidicaule* a.) VAR. ILLPA INIA.

Se muestra en la Tabla 17 el análisis del contenido de ADN de los núcleos aislados de *Chenopodium pallidicaule* con un estándar de referencia (*Pisum sativum*) utilizando citometría de flujo. El contenido estimado de ADN nuclear 2C fue de 1.79 ± 0.007 pg (1C=875 Mbp) luego de realizar 6 evaluaciones de la cañihua variedad Illpa-INIA con un Coeficiente de variación (%CV) menor del 3%. Este valor promedio indica un tamaño de genoma relativamente pequeño de acuerdo con el rango definido para angiospermas de 1.4 a 3.5 pg (Sanders & Hull, 1970; Soltis et al., 2003) . Las especies con tamaño de genoma

pequeño se consideran más flexibles evolutivamente, lo que ha permitido colonizar ambientes nuevos y más diversos (Leitch et al., 1998). Por otro lado, se realizó la comparación de este dato con la referencia de la base de datos de DNA C-values (Leitch et al., 2019) y con la última reportada por Kolano (2011), donde existen diferencias, que pueden ser debido a deleciones, duplicaciones o respuestas del genoma al estrés ambiental (Price, 1976). Las diferencias en el contenido de ADN a menudo se originan como expansiones o contracciones de arreglos de secuencias repetidas de ADN como elementos genéticos móviles o transposones. Para este caso en específico, las plantas de cañihua se encuentran fuera de su zona de origen y en condiciones totalmente opuestas (Costa), pudiendo causar variaciones en el contenido de ADN.

Tabla 17: Estimación del contenido de ADN de la cañihua.

Especie	N. Científico	Estándar de referencia	x	Contenido de ADN (pg/2C)	±SE	Tamaño de genoma 1CxMpb ^a	Contenido de ADN (pg/2C) *	Contenido de ADN (pg/2C) +SD**
Cañihua -ILLPA	<i>Chenopodium pallidicaule</i>	<i>Pisum sativum</i>	2n = 2x= 18	1.79	0.007	875	1	0.886±0.034

^apg = 978 Mbp (Dolezel et al., 2003)

*DNA C-Value data base

**Kolano (2011).

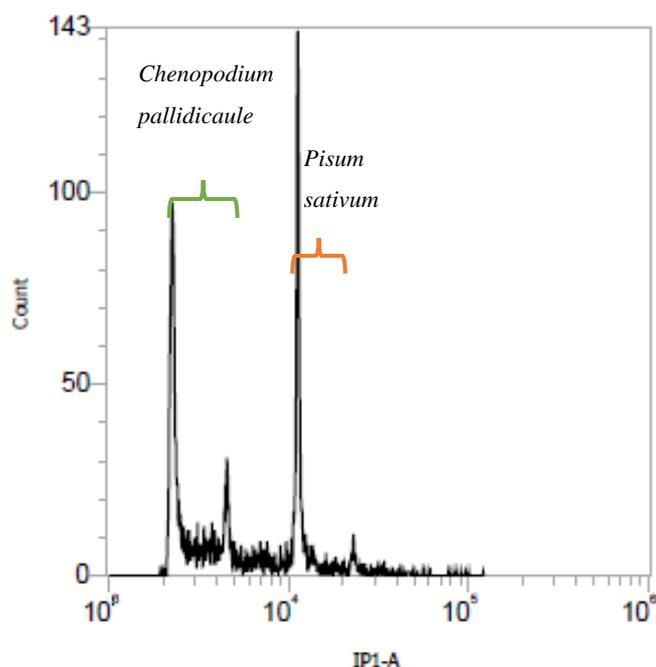


Figura 40: Citometría de flujo con estándar interno *Pisum sativum* para determinación del tamaño de genoma.

V. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos mediante la realización de esta investigación permiten extraer las siguientes conclusiones:

- Se logró modificar el nivel de ploidía con la obtención de mixoploides de cañihua (*Chenopodium pallidicaule* A.) mediante el remojo de semillas en soluciones de colchicina y orizalina.
- El efecto de los agentes mitóticos fue observado en la disminución de la germinación y supervivencia de plántulas de cañihua.
- Las plántulas de cañihua de la población mixoploide mostraron diferencias morfológicas como engrosamiento del hipocótilo, una menor altura de planta, engrosamiento de la cutícula en hojas, y retraso fenológico en comparación a la población control (diploide).
- Se encontró relación positiva entre el tamaño de estoma (largo y ancho) y el nivel de ploidía, es decir a mayor nivel de ploidía mayor tamaño de estoma.
- La densidad estomática y el nivel de ploidía tuvieron relación negativa; es decir, las plántulas de cañihua con mayor nivel de ploidía (población mixoploide) tuvieron menor densidad estomática.
- El tamaño de polen y el nivel de ploidía de las plantas de cañihua, tuvieron relación positiva, las plántulas con mayor tamaño de polen tuvieron mayor nivel de ploidía.
- Se determinó la concentración y tiempo óptimo de remojo de las semillas en el agente antimitótico; en colchicina 0,75% y 12 horas de remojo y en orizalina 35 ppm con 50 minutos de remojo.
- El tamaño de genoma de la cañihua variedad Illpa-INIA, fue estimado en $1,79 \pm 0,007$ pg.

VI. RECOMENDACIONES

- Para las características morfológicas como el ancho de hipocótilo en plántulas, el engrosamiento en cutícula y otros parámetros adicionales, se recomienda realizar evaluaciones cuantitativas para determinar estadísticamente la relación entre el parámetro y el nivel de ploidía.
- Se recomienda trabajar otro solvente para la dilución de orizalina, pues en el presente estudio se demostró el efecto del alcohol sobre la germinación de plántulas. Afectando así el experimento, pues diversos estudios mencionan que el uso de orizalina es más recomendable que la colchicina por su efecto a menores concentraciones y menor toxicidad.
- Se recomienda evaluar el comportamiento de estas bajo condiciones ideales, pues este experimento se llevó a cabo en casa malla y condiciones agroclimáticas adversas a la especie. Esto para poder evaluar el verdadero potencial de la población mixoploide.
- Se recomienda realizar un estudio del cariotipo de las plántulas mixoploides.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Alam, H., Razaq, M., & Salahuddin. (2015). Induced Polyploidy as a Tool for Increasing Tea (*Camellia sinensis* L.) Production. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)*, 22(3), 43–47. [https://doi.org/10.1016/s1006-8104\(16\)30005-8](https://doi.org/10.1016/s1006-8104(16)30005-8)
- Anitha, K., Jawahalal, M., Jhon Joel A, & Surendranath, R. (2017). *INDUCTION OF POLYPLOIDS AND ISOLATION OF PLOIDY VARIANTS THROUGH STOMATAL PARAMETERS IN BOUGAINVILLEA (BOUGAINVILLEA SPP)*. www.tjprc.org
- AnMo Electronics Corporation. (2016). *DinoCapture 2.0* (1.5.43; pp. 1–84).
- Apaza Mamani, V. (2010). Manejo y mejoramiento de kañiwa-Convenio Instituto Nacional de Innovación Agraria INIA-Puno-CIRMA. *Editorial Altiplano E.I.R.L.*, 1, 43.
- Aro, J. M., & Calsin Cutimbo, M. (2019). Elaboración de una mezcla alimenticia a base de quinua (*Chenopodium quinoa* W), cañihua (*Chenopodium pallidicaule* A), cebada (*Hordeum vulgare* L.), maiz (*Zea mays* L.), haba (*Vicia faba* L.) y soya (*Glycine max* L.) por el proceso de cocción-extrusión. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 21(2), 293–303.
- Baduel, P., Bray, S., Vallejo-Marin, M., Kolář, F., & Yant, L. (2018). The “Polyploid Hop”: Shifting Challenges and Opportunities Over the Evolutionary Lifespan of Genome Duplications. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6. <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00117>
- Bae, S. J., Islam, M. M., Kim, H. Y., & Lim, K. B. (2020). Induction of tetraploidy in watermelon with oryzalin treatments. *Horticultural Science and Technology*, 38(3), 385–393. <https://doi.org/10.7235/HORT.20200037>
- Bennett, M. (1972). Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 181(1063), 109–135. <https://doi.org/10.1098/rspb.1972.0042>

- Bonifacio, A. (2019). Improvement of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.) and qañawa (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) in the context of climate change in the high andes. *Ciencia e Investigacion Agraria*, 46(2), 113–124. <https://doi.org/10.7764/rcia.v46i2.2146>
- Bowers, J., & Paterson, A. (2021). *Chromosome number is key to longevity of polyploid lineages*. www.newphytologist.com
- Brown, G. v., Howard, R. J., & Battye, F. L. (1980). Separation of Stages of Plasmodium Falciparum-Infected Cells by means of a Fluorescence-Activated Cell Sorter. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 29(6), 1147–1149. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1980.29.1147>
- Butnor, J. R., Verrico, B. M., Vankus, V., & Keller, S. R. (2018). Ethanol exposure can inhibit red spruce (*Picea rubens*) seed germination. *Seed Science and Technology*, 46(2), 259–265. <https://doi.org/10.15258/sst.2018.46.2.07>
- Castro, M., Castro, S., & Loureiro, J. (2018). Production of synthetic tetraploids as a tool for polyploid research. *Web Ecology*, 18(2), 129–141. <https://doi.org/10.5194/we-18-129-2018>
- Chen, J. T., Coate, J. E., & Meru, G. (2020). Artificial Polyploidy in Plants. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.621849>
- Chen, J., Yu, Q., Patterson, E., Sayer, C., & Powles, S. (2021). Dinitroaniline Herbicide Resistance and Mechanisms in Weeds. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.634018>
- Chen, W., Tang, C., & Kao, Y. (2009). Ploidy doubling by in vitro culture of excised protocorms or protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* species. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 98.
- Chen, Y., Althiab Almasaud, R., Carrie, E., Desbrosses, G., Binder, B. M., & Chervin, C. (2020). Ethanol, at physiological concentrations, affects ethylene sensing in tomato germinating seeds and seedlings. *Plant Science*, 291. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110368>
- Cires, E., Cuesta, C., & Uría, R. (2011). *Una herramienta eficaz en el estudio de la Botánica: la citometría de flujo*. <https://doi.org/10.14198/cdbio.2011.37.03>

- Clarke, G. C. S. (1977). Boraginaceae. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 24(2), A59–A101. [https://doi.org/10.1016/0034-6667\(77\)90034-3](https://doi.org/10.1016/0034-6667(77)90034-3)
- Comai, L. (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 6, Issue 11, pp. 836–846). <https://doi.org/10.1038/nrg1711>
- Corneillie, S., de Storme, N., van Acker, R., Fangel, J. U., de Bruyne, M., de Rycke, R., Geelen, D., Willats, W. G. T., Vanholme, B., & Boerjan, W. (2019). Polyploidy Affects Plant Growth and Alters Cell Wall Composition. *Plant Physiology*, 179(1), 74–87. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00967>
- Corrêa Dos Santos, R., Goldman, G. H., & Riaño-Pachón, D. M. (2017). PloidyNGS: Visually exploring ploidy with Next Generation Sequencing data. *Bioinformatics*, 33(16), 2575–2576. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx204>
- Cronk, Q. C. B., & Clarke, G. C. S. (1981). Convolvulaceae. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 33(1), 117–135. [https://doi.org/10.1016/0034-6667\(81\)90086-5](https://doi.org/10.1016/0034-6667(81)90086-5)
- Crowley, L. C., Scott, A. P., Marfell, B. J., Boughaba, J. A., Chojnowski, G., & Waterhouse, N. J. (2016). Measuring cell death by propidium iodide uptake and flow cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(7), 647–651. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087163>
- Cubero, J. (2013). *Introducción a la mejora genética vegetal* (Tercera edición). ETSIAM Universidad de Córdoba - España. <https://books.google.com.ec/books?id=dT9angEACAAJ&printsec=copyright#v=onepage&q&f=false>
- Das, M. (2015). *Chamomile: Medicinal, biochemical and Agricultural aspects*. (CRC PRESS, Ed.).
- Denaeghel, H. E. R., van Laere, K., Leus, L., Lootens, P., van Huylenbroeck, J., & van Labeke, M. C. (2018). The variable effect of polyploidization on the phenotype in *escallonia*. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00354>
- Dent, A., Bergmann-Leitner, E., Wilson, D., Tisch, D., Rhonda, K., Vulule, J., Odada, P., Beeson, J., Angov, E., Moormann, A., & Kazura, J. (2008). Antibody-mediated growth inhibition of *Plasmodium falciparum*: relationship to age and protection from parasitemia in Kenyan children and adults. *PloS One*.

- Dhooghe, E., Grunewald, W., Leus, L., & van Labeke, M.-C. (2009). In vitro polyploidisation of Helleborus species. *Euphytica*, 165(1), 89–95. <https://doi.org/10.1007/s10681-008-9763-9>
- Dirihan, S., Terho, P., Helander, M., & Saikkonen, K. (2013). Efficient analysis of ploidy levels in plant evolutionary ecology. *Caryologia*, 66(3), 251–256. <https://doi.org/10.1080/00087114.2013.849414>
- Doležel, J. (1991). Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. In *Phytochemical analysis* (Vol. 2, pp. 143–154).
- Doležel, J., Greilhuber, J., & Suda, J. (2007). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols*, 2(9), 2233–2244. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.310>
- Ebrahimzadeh, H., Soltanloo, H., Shariatpanahi, M. E., Eskandari, A., & Ramezanpour, S. S. (2018). Improved chromosome doubling of parthenogenetic haploid plants of cucumber (*Cucumis sativus* L.) using colchicine, trifluralin, and oryzalin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 135(3), 407–417. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1473-y>
- Eeckhaut, T. G. R., Werbrouck, S. P. O., Leus, L. W. H., van Bockstaele, E. J., & Debergh, P. C. (2004). Chemically Induced Polyploidization in *Spathiphyllum wallisii* Regel through Somatic Embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78(3), 241–246. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000025659.19232.04>
- Eng, W.-H., & Ho, W.-S. (2019). Polyploidization using colchicine in horticultural plants: A review. *Scientia Horticulturae*, 246, 604–617. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.010>
- Escandon, A. S., Hagiwara, J. C., & Alderete, L. M. (2006). A new variety of *Bacopa monnieri* obtained by in vitro polyploidization. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(3), 0–0. <https://doi.org/10.2225/vol9-issue3-fulltext-8>
- Escandon, A. S., Miyajima, I., Alderete, M., Hagiwara, J. C., Facciuto, G., Mata, D., & Soto, S. M. (2005). Wild ornamental germplasm exploration and domestication based on biotechnological approaches. In vitro colchicine treatment to obtain a new cultivar of *Scoparia montevidiensis*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 8(2), 204–211. <https://doi.org/10.2225/vol8-issue2-fulltext-2>

- Fakhrzad, F., Jowkar, A., Shekafandeh, A., Kermani, M. J., & moghadam, A. (2023). Tetraploidy induction enhances morphological, physiological and biochemical characteristics of wallflower (*Erysimum cheiri* (L.) Crantz). *Scientia Horticulturae*, 308, 111596. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111596>
- Fleury, D., Jefferies, S., Kuchel, H., & Langridge, P. (2010). Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 61(12), 3211–3222. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq152>
- Gallone, A., Hunter, A., & Douglas, G. C. (2014). Polyploid induction in vitro using colchicine and oryzalin on Hebe ‘Oratia Beauty’: Production and characterization of the vegetative traits. *Scientia Horticulturae*, 179, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.09.014>
- Gandarillas, H. (1968). Número de cromosomas de la cañihua. *Ira Convención de Quenopodiaceas - Universidad Nacional Del Altiplano* .
- Gantait, S., Mandal, N., Bhattacharyya, S., & Das, P. K. (2010). A novel strategy for in vitro conservation of aloe vera L. through long term shoot culture. *Biotechnology*, 9(3), 326–331. <https://doi.org/10.3923/biotech.2010.326.331>
- Garavello, M., Cuenca, J., Dreissig, S., Fuchs, J., Houben, A., & Aleza, P. (2019). Assessing Ploidy Level Analysis and Single Pollen Genotyping of Diploid and Euploid Citrus Genotypes by Fluorescence-Activated Cell Sorting and Whole-Genome Amplification. *Frontiers in Plant Science*, 10(September), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01174>
- Gillooly, D. A., Touchell, D. H., & Ranney, T. G. (2015). In Vitro Polyploid Induction of *Ophiopogon planiscapus*. In *Plant Breeding and Evaluation* (Vol. 60).
- Giuliani, A., Hintermann, F., Rojas, W., & Padulosi, S. (2012). Biodiversity of andean grains: Balancing market potential and sustainable livelihoods. In *Biodiversity of andean grains: Balancing market potential and sustainable livelihoods*.
- Gosztola, B., Németh, E., Sárosi, S., Szabó, K., & Kozák, A. (2006). Comparative evaluation of chamomile (*Matricaria recutita* L.) populations from different origin. *International Journal of Horticultural Science*, 12(1). <https://doi.org/10.31421/IJHS/12/1/629>

- Gould, F. W. (1957). Pollen Size as Related to Polyploidy and Speciation in the *Andropogon saccharoides*-*A. Barbinodis* Complex. *Brittonia*, 9(2), 71. <https://doi.org/10.2307/2804771>
- Greilhuber, J., Dolezel, J., Lysak, M., & Bennett, M. (2005). The Origin, Evolution and Proposed Stabilization of the Terms “Genome Size” and “C-Value” to Describe Nuclear DNA Contents. *Annals of Botany*, 95(1), 255–260. <https://doi.org/10.1093/aob/mci019>
- Guillen-Andrade, H., Khairallah, M., Singh, R., Castillo, F., & Hoisington, D. (2001). *Construcción de un mapa genético para trigo harinero mediante RFLPs y SSRs*. 9.
- Guo, M., Davis, D., & Birchler, J. A. (1996). Dosage Effects on Gene Expression in a Maize Ploidy Series. *Genetics*, 142(4), 1349–1355. <https://doi.org/10.1093/genetics/142.4.1349>
- Gupta, A. K., Singh, M., Marboh, E. S., Nath, V., Pongener, A., & Anal, A. K. D. (2017). Pollen Quantity, Viability and in vitro Pollen Germination of Longan (*Dimocarpus longan* Lour.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(7), 270–278. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.607.032>
- Hebert, C. J., Touchell, D. H., Ranney, T. G., & Lebude, A. v. (2010). In vitro shoot regeneration and polyploid induction of *Rhododendron* “Fragrantissimum Improved.” *HortScience*, 45(5), 801–804. <https://doi.org/10.21273/hortsci.45.5.801>
- Heitkam, T., Weber, B., Walter, I., Ost, C., & Schmidt, T. (2019). Satellite DNA landscapes after allotetraploidisation of quinoa (*Chenopodium quinoa*) reveal unique A and B subgenomes. In *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/774828>
- Heslop-Harrison, J. S., & Schwarzacher, T. (2007). Domestication, genomics and the future for banana. *Annals of Botany*, 100(5), 1073–1084. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm191>
- Hoffmann, W., Mudra, A., & Plarre, W. (1979). Szczegółowa Hodowla Róślin. *PWRL: Warszawa*, 549–592.
- Honnegowda Venkatesh, K. (2021). *Chapter Studies on Basic Chromosome Number, Ploidy Level, Chromosomal Association and Configuration and Meiotic Behavior in Mulberry (Morus Spp.)*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.97143>

- IPGRI, PROINPA, & IFAD. (2005). Descriptores para cañahua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen). In *International Plant Genetic Resources Institute* (Vol. 1).
- ITIS Standard Report Page: Chenopodium pallidicaule*. (n.d.). Retrieved February 27, 2021, from https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=506566#null
- Izumiyama, S., Omura, M., Takasaki, T., Ohmae, H., & Asahi, H. (2009). Plasmodium falciparum: Development and validation of a measure of intraerythrocytic growth using SYBR Green I in a flow cytometer. *Experimental Parasitology*, *121*(2), 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.10.008>
- Jiang, Y., Liu, S., Hu, J., He, G., Liu, Y., Chen, X., Lei, T., Li, Q., Yang, L., Li, W., Hu, D., Li, J., & Gao, S. (2020). Polyploidization of *Plumbago auriculata* Lam. in vitro and its characterization including cold tolerance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *140*(2), 315–325. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01729-w>
- Jin-xian, G. (2010). *The Effect of Colchicine on the Form of Saintpaulia ionantha in vitro*.
- Kalis, A. J. (1979). Papaveraceae. *Review of Palaeobotany and Palynology*, *28*(3–4), A209–A260. [https://doi.org/10.1016/0034-6667\(79\)90034-4](https://doi.org/10.1016/0034-6667(79)90034-4)
- Khosravi, P., Kermani, M. J., Nematzadeh, G. A., Bihanta, M. R., & Yokoya, K. (2008). Role of mitotic inhibitors and genotype on chromosome doubling of *Rosa Euphytica*, *160*(2), 267–275. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9571-7>
- Knight, C. A., Clancy, R. B., Götzenberger, L., Dann, L., & Beaulieu, J. M. (2010). On the Relationship between Pollen Size and Genome Size. *Journal of Botany*, *2010*, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2010/612017>
- Kolano, B., Gardunia, B. W., Michalska, M., Bonifacio, A., Fairbanks, D., Maughan, P. J., Coleman, C. E., Stevens, M. R., Jellen, E. N., & Maluszynska, J. (2011). Chromosomal localization of two novel repetitive sequences isolated from the *Chenopodium quinoa* Willd. genome. *Genome*, *54*(9), 710–717. <https://doi.org/10.1139/g11-035>
- Kravtsov, A. L., Grebenyukova, T. P., Bobyleva, E. v., Golovko, E. M., Malyukova, T. A., Lyapin, M. N., Kostyukova, T. A., Yezhov, I. N., & Kuznetsov, O. S. (2001). *Flow*

- cytofluorometric assay of human whole blood leukocyte DNA degradation in response to <emph type="I">Yersinia pestis</emph> and <emph type="I">Staphylococcus</emph> aureus</title>* (V. v. Tuchin, Ed.; pp. 260–267). <https://doi.org/10.1117/12.431530>
- Kudo, N., & Kimura, Y. (2002). *Nuclear DNA endoreduplication during petal development in cabbage: relationship between ploidy levels and cell size.*
- Kunakh, V. A., Adonin, V. I., Ozheredov, S. P., & Blyum, Ya. B. (2008). Mixoploidy in wild and cultivated species of Cruciferae capable of hybridizing with rapeseed *Brassica napus*. *Cytology and Genetics*, 42(3), 204–209. <https://doi.org/10.3103/s0095452708030079>
- Laere, K. van, Dewitte, A., Huylenbroeck, J. van, & Bockstaele, E. van. (2009). Evidence for the occurrence of unreduced gametes in interspecific hybrids of *Hibiscus*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 84(2), 240–247. <https://doi.org/10.1080/14620316.2009.11512511>
- Laguado, J. (2007). APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN MICROBIOLOGÍA, VETERINARIA Y AGRICULTURA. In *REVISIÓN LITERATURA Rev.MVZ Córdoba* (Vol. 12, Issue 2). www.cyto.purdue.edu
- Lam, H. K., Harbard, J. L., & Koutoulis, A. (2014a). Tetraploid induction of *Acacia crassicarpa* using colchicine and oryzalin. *Journal of Tropical Forest Science*, 26(3), 347–354.
- Lam, H. K., Harbard, J. L., & Koutoulis, A. (2014b). TETRAPLOID INDUCTION OF *ACACIA CRASSICARPA* USING COLCHICINE AND ORYZALIN. In *Journal of Tropical Forest Science* (Vol. 26, Issue 3).
- Larsen, J. K., Byskov, A. G., & Christensen, I. J. (1986). *Flow cytometry and sorting of meiotic prophase cells of female rabbits.*
- Lavania, U. C. (2005). Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phyto-pharmaceuticals. *Plant Genetic Resources*, X, 1–21.
- Lehmann, P., & Or, D. (2015). Effects of stomata clustering on leaf gas exchange. *New Phytologist*, 207(4), 1015–1025. <https://doi.org/10.1111/nph.13442>

- Leitch, I. J., Chase, M. W., & Bennett, M. D. (1998). Phylogenetic Analysis of DNA C-values Provides Evidence for a Small Ancestral Genome Size in Flowering Plants. In *Annals of Botany* (Vol. 82). https://academic.oup.com/aob/article/82/suppl_1/85/211204
- Leung, Y. Y., Yao Hui, L. L., & Kraus, V. B. (2015). Colchicine-Update on mechanisms of action and therapeutic uses. In *Seminars in Arthritis and Rheumatism* (Vol. 45, Issue 3, pp. 341–350). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2015.06.013>
- Li, W.-L., Berlyn, G. P., & Ashton, P. M. S. (1996). Polyploids and their Structural and Physiological Characteristics Relative to Water Deficit in *Betula papyrifera* (Betulaceae). *American Journal of Botany*, 83(1), 15. <https://doi.org/10.2307/2445949>
- Liqin, G., Jianguo, Z., Xiaoxia, L., & Guodong, R. (2019). Polyploidy-related differential gene expression between diploid and synthesized allotriploid and allotetraploid hybrids of *Populus*. *Molecular Breeding*, 39(5). <https://doi.org/10.1007/s11032-019-0975-6>
- Liu, G., Li, Z., & Bao, M. (2007). Colchicine-induced chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its effect on plant morphology. *Euphytica*, 157(1–2), 145–154. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9406-6>
- Loureiro, J., Rodriguez, E., Doležel, J., & Santos, C. (2006). Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. *Annals of Botany*, 98(3), 679–689. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl141>
- Maluszynska, J. (2003). *Cytogenetic tests for ploidy level analyses-chromosome counting*. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-94-017-1293-4_51
- Mamani, E. (2013). *Características moleculares de 26 accesiones de cañihua con mayor rendimiento en grano del altiplano de Puno*. [Tesis para título de Ing. Agrónomo]. Universidad Nacional del Altiplano.
- Mangelson, H., Jarvis, D. E., Mollinedo, P., Rollano-Penalzoza, O. M., Palma-Encinas, V. D., Gomez-Pando, L. R., Jellen, E. N., & Maughan, P. J. (2019). The genome of *Chenopodium pallidicaule*: An emerging Andean super grain. *Applications in Plant Sciences*, 7(11), 1–12. <https://doi.org/10.1002/aps3.11300>

- Manuel Rodríguez-Domínguez, J., Tapia-Campos, E., & Barba-Gonzalez, R. (2020). Physical mapping of 45S and 5S rDNA in two *Sprekelia formosissima* cytotypes (Amaryllidaceae) through Fluorescent In Situ Hybridization (FISH). *International Journal of Cytology*, 73(3), 121–126. <https://doi.org/10.13128/caryologia-578>
- Manzoor, A., Ahmad, T., Bashir, M. A., Hafiz, I. A., & Silvestri, C. (2019a). Studies on colchicine induced chromosome doubling for enhancement of quality traits in ornamental plants. In *Plants* (Vol. 8, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/plants8070194>
- Manzoor, A., Ahmad, T., Bashir, M., Hafiz, I., & Silvestri, C. (2019b). Studies on Colchicine Induced Chromosome Doubling for Enhancement of Quality Traits in Ornamental Plants. *Plants*, 8(7), 194. <https://doi.org/10.3390/plants8070194>
- Mayta, N. Y. (2019). Prospectiva económica de la producción y comercialización de la cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) en la Región de Puno. *Universidad Nacional Agraria La Molina*, 1–121.
- McGoey, B. v, Chau, K., & Dickinson, T. A. (2014). Stomata Size in Relation to Ploidy Level in North American Hawthorns (*Crataegus*, Rosaceae). *Madroño*, 61(2), 177–193. <https://doi.org/10.3120/0024-9637-61.2.177>
- McKinnon, K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology*, 120(1). <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
- Melaragno, J. E., Mehrotra, B., & Coleman, A. W. (1993). Relationship between Endopolyploidy and Cell Size in Epidermal Tissue of Arabidopsis. *The Plant Cell*, 1661–1668. <https://doi.org/10.1105/tpc.5.11.1661>
- Mercado, F. (2014). *DIVERSIDAD Y SISTEMÁTICA DEL GÉNERO Opuntia s.s., EN LA REGIÓN DE LOS CABOS, BAJA CALIFORNIA SUR, MEXICO*. Centro de Investigaciones biológicas del Noroeste.
- Mirzaee, M., & Hassani, M. E. (2010). Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment Characterisation of novel storage protein genes View project *Ocimum basilicum* polyploidy View project. In *Article in International Journal of Plant Production*. www.ijpp.info

- Mishra, M. K. (1997). Stomatal Characteristics at Different Ploidy Levels in *Coffea L.* In *Annals of Botany Company* (Vol. 80).
- MO, L., CHEN, J. hao, CHEN, F., XU, Q. wei, TONG, Z. kang, HUANG, H. hong, DONG, R. hui, LOU, X. zhen, & LIN, E. pei. (2020). Induction and characterization of polyploids from seeds of *Rhododendron fortunei* Lindl. *Journal of Integrative Agriculture*, 19(8), 2016–2026. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63210-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63210-5)
- Molero Paredes, T., Viloría Narváez, M., & Viloría Fernández, E. (2018). Inducción de poliploidía con clochicina en vitroplantas de *Aloe vera* (L.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 97–105. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73762>
- Molero-Paredes, T., & Matos, Á. (2008). *Efectos de la inducción artificial de la poliploidía en plantas de Aloe Vera (L.)* (Vol. 42, Issue 1).
- Möller, M. (2018). Nuclear DNA C-values are correlated with pollen size at tetraploid but not diploid level and linked to phylogenetic descent in *Streptocarpus* (Gesneriaceae). *South African Journal of Botany*, 114, 323–344. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.11.017>
- Monda, K., Araki, H., Kuhara, S., Ishigaki, G., Akashi, R., Negi, J., Kojima, M., Sakakibara, H., Takahashi, S., Hashimoto-Sugimoto, M., Goto, N., & Iba, K. (2016). Enhanced stomatal conductance by a spontaneous Arabidopsis tetraploid, Me-0, results from increased stomatal size and greater stomatal aperture. *Plant Physiology*, 170(3), 1435–1444. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01450>
- Montaño Quiroga, C. C. (2015). *Empresas cochabambinas y Cañahua: ¿Una alternativa para la economía regional?* Universidad Mayor de San Simon.
- Mora, F., Palma-Rojas, C., & Jara-Seguel, P. (2005). Comparación del cariotipo de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus cladocalyx* (Myrtaceae). *Agricultura Técnica*, 65(1). <https://doi.org/10.4067/s0365-28072005000100002>
- Moreno Contreras, C. V. (2018). Nota técnica de Granos Andinos. *Ministerio de Agricultura y Riego*, 1(1), 10.
- Narro, A. (2010). *DUPLICACIÓN CROMOSÓMICA EN HÍBRIDOS INTERGENÉRICOS Helianthus annuus x Tithonia rotundifolia* BRICIA ANAYANKY BARRERA ROMO

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de Universidad Autónoma Agraria.

- Narukawa, H., Yokoyama, R., & Nishitani, K. (2016). Possible pathways linking ploidy level to cell elongation and cuticular function in hypocotyls of dark-grown *Arabidopsis* seedlings. *Plant Signaling and Behavior*, 11(2). <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1118597>
- Niimi, H., Watanabe, M., Serizawa, H., Koba, T., Nakamura, I., & Mii, M. (2015). Amiprophosmethyl-induced efficient; production of polyploids in raphanobrassica with the aid of aminoethoxyvinylglycine (AVG) in the culture medium. *Breeding Science*, 65(5), 396–402. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.65.396>
- Nimura, M., Kato, J., Horaguchi, H., Mii, M., Sakai, K., & Katoh, T. (2006). Induction of Fertile Amphidiploids by Artificial Chromosome-doubling in Interspecific Hybrid between *Dianthus caryophyllus* L. and *D. japonicus* Thunb. *Breeding Science*, 56(3), 303–310. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.56.303>
- Niu, L., Tao, Y.-B., Chen, M.-S., Fu, Q., Dong, Y., He, H., & Xu, Z.-F. (2016). Identification and characterization of tetraploid and octoploid *Jatropha curcas* induced by colchicine. *Caryologia*, 69(1), 58–66. <https://doi.org/10.1080/00087114.2015.1110308>
- .Novikova, P. Y., Hohmann, N., & van de Peer, Y. (2018). Polyploid *Arabidopsis* species originated around recent glaciation maxima. *Current Opinion in Plant Biology*, 42, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.01.005>
- 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. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111026>
- Otto, F. (1990). *Chapter 11 DAPI Staining of Fixed Cells for High-Resolution Flow Cytometry of Nuclear DNA* (pp. 105–110). [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)60516-6](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)60516-6)
- Otto, S. P. (2007). The Evolutionary Consequences of Polyploidy. *Cell*, 131(3), 452–462. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.022>

- Pablo Rodriguez, J., & Sørensen, M. (2021). Underutilized Andean Crop Kañawa (*Chenopodium Pallidicaule* Aellen). *Biodiversity Online Journal*, 1(4). <https://doi.org/10.31031/BOJ.2021.01.000517>
- Pan-pan, H., Wei-xu, L., Hui-hui, L., & zeng-xu, X. (2018). In vitro induction and identification of autotetraploid of *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb.f. by colchicine treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 132(3), 425–432. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1339-8>
- Parsons, J. L., Martin, S. L., James, T., Golenia, G., Boudko, E. A., & Hepworth, S. R. (2019). Polyploidization for the Genetic Improvement of *Cannabis sativa*. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00476>
- Pattanapanyasat, K., Thaithong, S., Kyle, D. E., Udomsangpetch, R., Yongvanitchit, K., Hider, R. C., & Webster, H. K. (1997). Flow cytometric assessment of hydroxypyridinone iron chelators on in vitro growth of drug-resistant malaria. *Cytometry*, 27(1), 84–91. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19970101\)27:1<84::AID-CYTO11>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19970101)27:1<84::AID-CYTO11>3.0.CO;2-O)
- Pellicer, J., Hidalgo, O., Dodsworth, S., & Leitch, I. J. (2018). Genome size diversity and its impact on the evolution of land plants. In *Genes* (Vol. 9, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/genes9020088>
- Persson, K. E. M., Lee, C. T., Marsh, K., & Beeson, J. G. (2006). Development and Optimization of High-Throughput Methods To Measure *Plasmodium falciparum* - Specific Growth Inhibitory Antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(5), 1665–1673. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.5.1665-1673.2006>
- Pintos, B., Manzanera, J. A., & Bueno, M. A. (2007). Antimitotic agents increase the production of doubled-haploid embryos from cork oak anther culture. *Journal of Plant Physiology*, 164(12), 1595–1604. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.11.012>
- Pirkoohi, M., Keyvanloo, M., & Hasanpoor, M. (2011). Colchicine-induced ploidy in mint by seed treatment. *International Journal of Agriculture and Crop Science (IJACS)*, 3(4), 102–104.
- Ponce, C. (1977). *Determinación del cariotipo en cinco líneas de cañihua (Chenopodium pallidicaule Aellen)* [Tesis]. Universidad Nacional del Altiplano.

- Price, H. (1976). Evolution of DNA content in higher plants. *Bot Rev*, 42, 27–52.
- Qin, X., & Rotino, G. (1995). *Chloroplast number in guard cells as ploidy indicator of in vitro-grown androgenic pepper plantlets*.
- Rao, S., Kang, X., Li, J., & Chen, J. (2019a). Induction, identification and characterization of tetraploidy in *Lycium ruthenicum*; *Breeding Science*, 69(1), 160–168. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.18144>
- Rao, S., Kang, X., Li, J., & Chen, J. (2019b). Induction, identification and characterization of tetraploidy in *Lycium ruthenicum*. *Breeding Science*, 69(1), 160–168. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.18144>
- Renny-Byfield, S., & Wendel, J. F. (2014). Doubling down on genomes: Polyploidy and crop plants. *American Journal of Botany*, 101(10), 1711–1725. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400119>
- Repo-Carrasco, R., Espinoza, C., & Jacobsen, S. E. (2003). Nutritional value and use of the andean crops quinoa (*Chenopodium quinoa*) and kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). *Food Reviews International*, 19(1–2), 179–189. <https://doi.org/10.1081/FRI-120018884>
- Riccardi, C., & Nicoletti, I. (2006a). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols*, 1(3), 1458–1461. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.238>
- Riccardi, C., & Nicoletti, I. (2006b). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols*, 1(3), 1458–1461. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.238>
- Rice, A., Šmarda, P., Novosolov, M., Drori, M., Glick, L., Sabath, N., Meiri, S., Belmaker, J., & Mayrose, I. (2019). The global biogeography of polyploid plants. *Nature Ecology and Evolution*, 3(2), 265–273. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0787-9>
- Rodríguez, C., Nohra, C., & Bueno, M. (2006). *ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD CITOGENÉTICA DE *Physalis peruviana* L. (Solanaceae)*. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=319028579006>

- Rodriguez, J. P., Jacobsen, S.-E., Andreasen, C., & Sørensen, M. (2020). *Cañahua (Chenopodium pallidicaule): A Promising New Crop for Arid Areas. January 2021*, 221–243. https://doi.org/10.1007/978-3-319-90472-6_9
- Granos Andinos, (2010).
- Roughani, A., Miri, M., Kashi, K., & Khiabani, B. N. (2017). Increasing the ploidy level in spinach (*Spinacia oleracea* L.) using mitotic inhibitors. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 18(4), 124–130. <https://www.researchgate.net/publication/315080307>
- Sakhanokho, H. F., Rajasekaran, K., Kelley, R. Y., & Islam-Faridi, N. (2009). Induced Polyploidy in Diploid Ornamental Ginger (*Hedychium muluense* R. M. Smith) Using Colchicine and Oryzalin. *HortScience*, 44(7), 1809–1814. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.44.7.1809>
- Salehi, M., Salehi, H., & Ashiri, F. (2008). *Effect of different ethanol concentrations on seed germination of three turfgrass genera Evaluation of Ground Cover Plants Performance in Iranian Landscape View project Drought and salt stress View project*. <https://www.researchgate.net/publication/292126215>
- Sanders, H. (2021). Polyploidy and Pollen Grain Size: Is There a Correlation? In *Graduate Review* (Vol. 1). <https://openspaces.unk.edu/grad-review> Available at: <https://openspaces.unk.edu/grad-review/vol1/iss1/15>
- Sanders, H., & Hull, J. W. (1970). *Dimethyl Sulfoxide as an Adjuvant of Colchicine in the Treatment of Rubus Seeds and Shoot Apices*.
- Sattler, M. C., Carvalho, C. R., & Clarindo, W. R. (2016a). The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*, 243(2), 281–296. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2450-x>
- Sattler, M. C., Carvalho, C. R., & Clarindo, W. R. (2016b). The polyploidy and its key role in plant breeding. In *Planta* (Vol. 243, Issue 2, pp. 281–296). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2450-x>
- Sessions, S. K. (2013). Genome Size. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (pp. 301–305). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00639-2>

- Shapiro, H. M. (2003). *Practical Flow Cytometry*. Wiley.
<https://doi.org/10.1002/0471722731>
- Sheltzer, J. M., Torres, E. M., Dunham, M. J., & Amon, A. (2012). Transcriptional consequences of aneuploidy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(31), 12644–12649. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209227109>
- Sliwinska, E. (2018). Flow cytometry - A modern method for exploring genome size and nuclear DNA synthesis in horticultural and medicinal plant species. In *Folia Horticulturae* (Vol. 30, Issue 1, pp. 103–128). De Gruyter Open Ltd.
<https://doi.org/10.2478/fhort-2018-0011>
- Sliwinska, E., Loureiro, J., Leitch, I. J., Šmarda, P., Bainard, J., Bureš, P., Chumová, Z., Horová, L., Koutecký, P., Lučanová, M., Trávníček, P., & Galbraith, D. W. (2021). Application-based guidelines for best practices in plant flow cytometry. *Cytometry Part A*. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24499>
- Soltis, D. E., Soltis, P. S., Bennett, M. D., & Leitch, I. J. (2003). Evolution of genome size in the angiosperms. *American Journal of Botany*, *90*(11), 1596–1603.
<https://doi.org/10.3732/ajb.90.11.1596>
- Speckmann, G. J., Post, J., & Dijkstra, H. (1965). The length of stomata as an indicator for polyploidy in rye-grasses. *Euphytica*, *14*(3), 225–230.
<https://doi.org/10.1007/BF00149503>
- Spehar, C. R., & de Barros Santos, R. L. (2002). Quinoa BRS Piabiru: alternativa para diversificar os sistemas de producao de graos. *Pesq. Agropec. Bras*, *37*(1), 889–893.
- Staalsoe, T., Giha, H., Dodoo, D., Theander, T., & Hviid, L. (1999). Detection of antibodies to variant antigens on plasmodium falciparum-infected erythrocytes by flow cytometry. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, *35*.
- Talebi, S. F., Saharkhiz, M. J., Kermani, M. J., Sharafi, Y., & Raouf Fard, F. (2017). Effect of different antimitotic agents on polyploid induction of anise hyssop (*Agastache foeniculum* L.). *Caryologia*, *70*(2), 184–193.
<https://doi.org/10.1080/00087114.2017.1318502>

- Tapia, M., Bonifacio, A., & Rojas, W. (2019). La kañiwa o kañawa (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) grano promisorio de los andes altos. *Fundacion PROINPA*, 1–15. <http://www.indap.gob.cl/docs/default-source/vii-congreso-quinua/ejes-tematicos/recursos-geneticos/kañawa----grano-promisorio-de-los-andes-altos-perú-y-bolivia.pdf?sfvrsn=2>
- Tapia, M. E. (2000). *Cultivos Andinos Subexplotados y su Aporte a la Alimentación*. http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP_FaoRlc/old/prior/segalim/prodalim/p rodveg/cdrom/contenido/libro10/home10.htm
- Tate, J. A., Symonds, V. V., Doust, A. N., Buggs, R. J. A., Mavrodiev, E., Majure, L. C., Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2009). Synthetic polyploids of *Tragopogon miscellus* and *T. mirus* (Asteraceae): 60 Years after Ownbey's discovery. *American Journal of Botany*, 96(5), 979–988. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800299>
- Tavan, M., Mirjalili, M. H., & Karimzadeh, G. (2015). In vitro polyploidy induction: changes in morphological, anatomical and phytochemical characteristics of *Thymus persicus* (Lamiaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 122(3), 573–583. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0789-0>
- Temsch, E. M., Koutecký, P., Urfus, T., Šmarda, P., & Doležel, J. (2021). Reference standards for flow cytometric estimation of absolute nuclear DNA content in plants. In *Cytometry Part A*. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24495>
- Thao, N. T. P., Ureshino, K., Miyajima, I., Ozaki, Y., & Okubo, H. (2003). Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72(1), 19–25. <https://doi.org/10.1023/A:1021292928295>
- Trojak-Goluch, A., Kawka-Lipińska, M., Wielgusz, K., & Praczyk, M. (2021). Polyploidy in industrial crops: Applications and perspectives in plant breeding. In *Agronomy* (Vol. 11, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/agronomy11122574>
- Trojak-Goluch, A., & Skomra, U. (2018). Breeding of triploid common hop cultivars (*Humulus lupulus* L.). *Polish Journal of Agronomy*, 3(10). <https://doi.org/10.26114/pja.iung.357.2018.34.01>

- Urwin, N. A. R., Horsnell, J., & Moon, T. (2007). Generation and characterisation of colchicine-induced autotetraploid *Lavandula angustifolia*. *Euphytica*, *156*(1–2), 257–266. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9373-y>
- van de Peer, Y., Ashman, T. L., Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2021). Polyploidy: an evolutionary and ecological force in stressful times. In *Plant Cell* (Vol. 33, Issue 1, pp. 11–26). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/plcell/koaa015>
- van de Peer, Y., Mizrachi, E., & Marchal, K. (2017). The evolutionary significance of polyploidy. *Nature Reviews Genetics*, *18*(7), 411–424. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.26>
- van Leeuwen, P. P., Punt, W., & Hoen, P. (1958). The Northwest European Pollen Flora, 43. In *Nair*. Van Zinderen Bakker.
- van Vianen, P. H., van Engen, A., van der Kaay, H. J., Reinders, P. P., Tanke, H. J., Mons, B., van der Keur, M., & Thaithong, S. (1990). Automated Flow Cytometric Analysis of Drug Susceptibility of Malaria Parasites. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *43*(6), 602–607. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1990.43.602>
- Vargas, A., Elzinga, D. B., Rojas-Beltran, J. A., Bonifacio, A., Geary, B., Stevens, M. R., Jellen, E. N., & Maughan, P. J. (2011). Development and use of microsatellite markers for genetic diversity analysis of cañahua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen). *Genetic Resources and Crop Evolution*, *58*(5), 727–739. <https://doi.org/10.1007/s10722-010-9615-z>
- Vazques Medina, S. (2014). *Psidium cattleianum* Sabine y *Acca sellowiana* (Berg.) Burret (Myrtaceae): caracterización cromosómica y cariotípica en poblaciones silvestres y genotipos seleccionados en programas nacinoales de mejoramiento.
- Vrána, J., Cápál, P., Bednářová, M., & Doležel, J. (2014). Flow cytometry in plant research: A success story. *Plant Cell Monographs*, *22*, 395–430. https://doi.org/10.1007/978-3-642-41787-0_13
- Vu, G. T. H., Schmutzer, T., Bull, F., Cao, H. X., Fuchs, J., Tran, T. D., Jovtchev, G., Pistrick, K., Stein, N., Pecinka, A., Neumann, P., Novak, P., Macas, J., Dear, P. H., Blattner, F. R., Scholz, U., & Schubert, I. (2015). Comparative Genome Analysis Reveals Divergent Genome Size Evolution in a Carnivorous Plant Genus. *The Plant Genome*, *8*(3). <https://doi.org/10.3835/plantgenome2015.04.0021>

- Wang, P., Chen, R., Fang, R., Wu, L., & Zhu, Z. (1989). *Study of identification of ploidy in pollen plants and wheat using guard cells.*
- Watrous, S., & Wimber, D. (1988). Artificial induction of polyploidy in *Paphiopedilum Lindleyana*, 3.
- Wimber, D., & Van-Cott, A. (1966). Artificially induced polyploidy in Cymbidiums. In L. de Garmo (Ed.), *Fifth World Orchid Conference.*
- Wu, J., Sang, Y., Zhou, Q., & Zhang, P. (2020). Colchicine in vitro tetraploid induction of *Populus hopeiensis* from leaf blades. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 141(2), 339–349. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01790-w>
- Zhang, J., Nagai, C., Yu, Q., Pan, Y. B., Ayala-Silva, T., Schnell, R. J., Comstock, J. C., Arumuganathan, A. K., & Ming, R. (2012). Genome size variation in three *Saccharum* species. *Euphytica*, 185(3), 511–519. <https://doi.org/10.1007/s10681-012-0664-6>
- Zhang, Y. S., Chen, J. J., Cao, Y. M., Duan, J. X., & Cai, X. D. (2020). Induction of tetraploids in ‘Red Flash’ caladium using colchicine and oryzalin: Morphological, cytological, photosynthetic and chilling tolerance analysis. *Scientia Horticulturae*, 272. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109524>