



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

Trabajo de Tesis

Efecto de la aplicación *in vitro* de colchicina sobre la morfología y citología en dos especies de quequisque (*Xanthosoma* spp.)

AUTOR

Br. Celin Uriel Amador Cuadra

ASESORES

Ing. Agr. Heedy Guadalupe Corea

Ing. Agr. Rosario García Loáisiga

PhD. Guillermo Reyes Castro

Managua, Nicaragua

Noviembre 2019



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

Trabajo de Tesis

Efecto de la aplicación *in vitro* de colchicina sobre la morfología y citología en dos especies de quequisque (*Xanthosoma* spp.)

AUTOR

Br. Celin Uriel Amador Cuadra

ASESORES

Ing. Agr. Heeidy Guadalupe Corea

Ing. Agr. Rosario García Loáisiga

PhD. Guillermo Reyes Castro

Presentado a la consideración del honorable tribunal examinador
Como requisito para optar al título de
Ingeniero Agrónomo

Managua, Nicaragua

Noviembre 2019

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable tribunal examinador designado por la decanatura en la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria como requisito parcial para optar al título de: Ingeniería agronómica

Miembros del Tribunal Examinador

Presidente

Secretario

Vocal

Lugar y fecha (día/mes/año) _____

ÍNDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE ANEXOS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1. General	3
2.2. Específicos	3
III. MATERIALES Y MÉTODOS	4
3.1. Descripción del lugar	4
3.2. Inducción con colchicina	4
3.3. Aclimatización	4
3.4. Variables evaluadas	5
3.4.1. Variables morfológicas <i>in vitro</i>	5
3.4.2. Variables morfológicas en invernadero	5
3.4.3. Evaluación de variables citológicas	5
3.5. Diseño experimental	7
3.6. Análisis estadístico	7
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8
4.1. Variables morfológicas <i>in vitro</i>	8
4.2. Variables morfológicas en invernadero	12
4.3. Variables citológicas	15
V. CONCLUSIONES	19
VI. RECOMENDACIONES	20
VII. BIBLIOGRAFÍA	21
VIII. ANEXOS	26

DEDICATORIA

A Dios primeramente por la vida y salud que me regala cada día, por la sabiduría, el entendimiento y por todas sus bendiciones, guiando mis pasos en el buen camino y permitirme cumplir mi sueño de ser un profesional.

A mi padre José Lino Amador por brindarme su apoyo en cada momento, por sus consejos y por todo el sacrificio que ha hecho para verme crecer como persona y como profesional. A mi madre Daniela del Socorro Cuadra por su apoyo incondicional.

A mis hermanos Jesner Amador y Danelia Amador, a mi abuelita Natalia Cuadra por todos sus consejos, sus enseñanzas cristianas, por cuidarme y orientarme en el camino del bien.

Br. Celin Uriel Amador Cuadra

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por permitirme despertar con salud cada día y bendecirme grandemente, por darme el entendimiento para lograr lo que me proponga, por iluminar mi camino y ayudarme a ser mejor persona cada día, por cada experiencia vivida que me ha hecho lo que soy hasta ahora.

A mis padres y demás familia por todo el apoyo tanto moral como económico, que me ha servido para poder llegar hasta donde estoy.

A mis asesores PhD. Guillermo Reyes Castro, Ing. Heeidy Corea Narváez y la Ing. Rosario García Loáisiga por sus múltiples explicaciones y dedicación en el desarrollo de este trabajo.

Al personal del laboratorio de microbiología, principalmente al Ing. Eliezer Lanuza por invertir parte de su tiempo para orientarme. A todos los docentes de la universidad que contribuyeron en toda mi formación profesional, por sus enseñanzas y sus consejos.

Agradezco grandemente a Alejandro López, Beyner Acevedo, Solange Padilla, Rebeca Rivas y Justo Aguilar por haber sido buenos compañeros y amigos durante toda la carrera y haberse convertido en mi familia todos estos años de estudio.

Por último agradezco a la Universidad Nacional Agraria por abrirme sus puertas y permitirme ser parte de ella, por convertirse en mi segunda casa, por toda la ayuda y oportunidades que me brindó que me ayudaron a culminar mi carrera.

Br. Celin Uriel Amador Cuadra

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		PÁGINA
1.	Dosis de inducción de colchicina empleadas en cada tratamiento	4
2.	Medias y categorías estadísticas según Tukey de variables morfológicas evaluadas a los 23, 36 y 78 ddi en vitroplantas del genotipo lila tratadas durante 10 días con cuatro dosis de colchicina	9
3.	Medias y categorías estadísticas según Tukey de variables morfológicas evaluadas a los 23, 36 y 78 ddi en vitroplantas del genotipo blanco tratadas durante 10 días con cuatro dosis de colchicina	10
4.	Análisis de varianza por genotipo, tratamiento e interacción genotipo-tratamiento en las variables altura de planta, número de hojas, raíces y brotes a los 78 ddi	11
5.	Medias y categorías estadísticas según Tukey de variables morfológicas evaluadas a los 72 ddt en invernadero en plantas del genotipo lila tratadas con cuatro dosis de colchicina	12
6.	Medias y categorías estadísticas según Tukey de variables morfológicas evaluadas a los 72 ddt en invernadero en plantas del genotipo blanco tratadas con cuatro dosis de colchicina	13
7.	Análisis de varianza por genotipo, tratamiento e interacción genotipo-tratamiento en las variables altura de planta, número de hojas, área foliar y diá. de pseudotallo a los 72 ddt	13
8.	Medias y categorías estadísticas según Tukey de variables citológicas evaluadas a los 110 ddt en genotipo lila	16
9.	Medias y categorías estadísticas según Tukey de variables citológicas evaluadas a los 116 ddt en genotipo blanco	17

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1.	División de las hojas para la evaluación de variables citológicas.	6
2.	Proceso de preparación de muestras para evaluación de variables citológicas.	6
3.	Vitroplantas con crecimiento lento y presencia de necrosis de los tratamientos T20, T40 y T60 evaluadas a los 23 ddi.	12
4.	Apariencia morfológica 72 ddt de algunas plantas del genotipo lila de los tratamientos T0, T40 y T60.	14
5.	Porcentaje de sobrevivencia <i>in vitro</i> (78 ddi) y en invernadero (72 ddt) de plantas de los tratamientos T0, T10, T20, T40 y T60 en a. genotipo lila, b. genotipo blanco.	14
6.	Largo de estomas y número de cloroplastos por estoma de los tratamientos T0, T10, T20, T40 y T60.	16
7.	Largo de estomas y número de cloroplastos por estoma de los tratamientos T0, T10, T20, T40 y T60.	17

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO		PÁGINA
1.	Vitroplantas del genotipo lila a los 23 ddi de los tratamientos T0, T10, T20, T40 y T60	26
2.	Vitroplantas del genotipo blanco a los 23 ddi de los tratamientos T0, T10, T20, T40 y T60	27
3.	Crecimiento de vitroplantas del genotipo blanco a los 23, 36 y 78 ddi	28
4.	Plantas en invernadero a los 50 ddt en invernadero de a=genotipo lila; b=genotipo blanco	28
5.	Hojas del genotipo lila utilizadas para la evaluación de las variables citológicas de los tratamientos T0, T10, T20, T40 y T60	29
6.	Hojas del genotipo blanco utilizadas para la evaluación de las variables citológicas de los tratamientos T0, T10, T20, T40 y T60	30

RESUMEN

En Nicaragua no existen genotipos de quequisque (*Xanthosoma* spp.) tolerantes al mal seco. Se evaluó el efecto *in vitro* de colchicina en cambios morfológicos y citológicos en dos genotipos de quequisque para generar variantes genéticas resistentes a la enfermedad. 100 vitroplantas de quequisque lila (QL) y 100 de quequisque blanco (QB) se establecieron por 10 días en medio MS con 0, 10, 20, 40 y 60 mg l⁻¹ de colchicina (T0, T10, T20, T40 y T60). Se evaluaron *in vitro* altura de planta (cm), número de hojas, raíces y brotes a los 23, 36 y 78 días después de la inducción (ddi). A los 103 ddi las vitroplantas se establecieron en invernadero. Se evaluaron variables morfológicas y citológicas (número y largo de estomas y número de cloroplastos por estomas). Las vitroplantas desarrolladas en T0 y T10 resultaron significativamente superiores en altura de planta, número de hojas y raíces en ambos genotipos en las tres evaluaciones. En QL T20 también registró un número de hojas significativamente superior en las tres evaluaciones. En QL T40 y T60 indujeron el número de brotes estadísticamente superiores en las tres evaluaciones. En QB T60 indujo mayor número de brotes a los 23 y 36 ddi, a los 78 ddi no hubo diferencias entre tratamientos. En el invernadero las plantas de QL tratadas en T0 y T10 fueron estadísticamente superiores altura de planta, número de hojas y diámetro de pseudotallo. Las plantas de T0 fueron superiores en área foliar. En QB las plantas de T0, T10 y T20 fueron superiores en altura. En ambos genotipos las plantas de T0 fueron superiores en número de estomas por cm² y los tratamientos con colchicina fueron superiores a T0 en número de cloroplastos por estoma y largo de estomas.

Palabras clave: Mejora genética, inducción de poliploidía, mutación química

ABSTRACT

In Nicaragua there are no cocoyam (*Xanthosoma* spp.) genotypes tolerant to root rot disease. The *in vitro* effect of colchicine on morphological and cytological changes in two cocoyam genotypes to generate disease-resistant genetic variants was evaluated. 100 Lila cocoyam (LC) and 100 White cocoyam (WC) vitroplants were established for 10 days in the MS medium with 0.0, 10, 20, 40 and 60 mg l⁻¹ colchicine (T0, T10, T20, T40 and T60). Plant height (cm), leaves roots and number of buds were *in vitro* evaluated at 23, 36 and 78 days after induction (dai). At 103 dai the vitroplants were established in the greenhouse. Morphological and cytological variables (number and length of stomata and number of chloroplasts per stomata) were evaluated. The vitroplants of T0 and T10 were significantly higher in plant height, number of leaves and roots in both genotypes in the three evaluations. In LC T20 it also registered a significantly higher leaves number of sheets in the three evaluations. In LC T40 and T60 they induced the number of statistically higher outbreaks in the three evaluations. In WC T60 induced a higher bud number at 23 and 36 ddi, at 78 ddi there were no differences between treatments. At the greenhouse, LC plants T0 and T10 were statistically higher in plant height, leaves number and pseudostem diameter. T0 plants were superior in leaf area. In WC plants of T0, T10 and T20 were statically higher in plant height. In both genotypes, T0 plants were superior in stomata number per cm² and colchicine treatments were higher than T0 in chloroplasts number per stomata and stomata length.

Keywords: Genetic breeding, polyploidy induction, chemical mutation

I. INTRODUCCIÓN

El quequisque es una planta herbácea perteneciente a la familia aráceas y al género *Xanthosoma*; dentro de este género se encuentran las especies *X. violaceum* y *X. sagittifolium*. Esta planta es originaria de la zona tropical y subtropical de América, probablemente de las Antillas donde existe el mayor número de especies. Según Wheelock (1998) es uno de los primeros cultivos de Nicaragua, durante el siglo XVII era consumido extensivamente por los grupos étnicos de la Costa Caribe.

El quequisque es uno de los cultivos más importantes en Nicaragua, donde un 60% de la producción se destina al mercado internacional y 40% al mercado nacional (El Nuevo Diario, 2012). Sin embargo los volúmenes de producción y áreas de siembra siguen decreciendo debido a las pérdidas de producción causadas por la enfermedad mal seco, causando la sustitución del cultivo del quequisque por el cultivo de café (Castellón, 2017). Según el Banco Central de Nicaragua, en el 2016 se sembraron 4,916 ha⁻¹ a nivel nacional, lo que refleja una reducción de área en comparación a las 5,950 ha⁻¹ registradas en el año 2011 por el CENAGRO (2011).

Saavedra y Reyes (2012) atribuyen las reducciones del rendimiento a la contaminación de los suelos por *Pythium myriotylum* causante del “Mal Seco”, y según encuesta realizada a productores de Nueva Guinea, el 55% consideró que el problema más importante es el mal seco, seguido de la calidad de la semilla, lo que ha llevado a obtener bajos rendimientos y reducción de áreas sembradas a nivel nacional. Pacumbaba *et al.*, (1992) señalan que esta enfermedad puede causar pérdidas de hasta un 90% de la producción.

Según Acebedo y Navarro (2010) en Nicaragua no existen genotipos de quequisque resistentes al mal seco, por lo que se han desarrollado investigaciones orientadas a la obtención de plantas resistentes a la enfermedad mediante el mejoramiento genético. Peng *et al.*, (2008) indican que la inducción de poliploidía se ha utilizado a menudo para desarrollar nuevos cultivares. Astudillo (2005) manifiesta que varios autores han investigado la citogenética basados en la manipulación de la poliploidía como técnica de mejora genética de plantas.

La colchicina es un alcaloide extraído de las semillas y bulbos del cólquico (*Colchicum autumnale*). Es un polvo de aspecto blanco cristalino a amarillo claro, inodora, muy tóxica y cancerígena. Hassawi *et al.*, (1991) y Poehlman (1987) señalan que la colchicina es el químico

más ampliamente aplicado y mejor estudiado que induce poliploides. El descubrimiento de su acción poliploidizante fue hecho en 1937 por Blakeslee y Avery quienes, trabajando sobre *Datura* (solanáceas), demostraron que es posible la obtención de poliploides en gran escala, abriendo de este modo un amplio campo para la mejora de los cultivos. Dewey (1979) menciona que cerca de 150 especies se habían duplicado con éxito el número cromosómico utilizando colchicina.

Se han desarrollado diversas investigaciones con aplicación de colchicina en diferentes cultivos obteniendo poliploides con cambios morfológicos y citológicos significativos. De acuerdo con Pierce (2006) el efecto más inmediato y universal de la poliploidía en plantas es un aumento en el tamaño y masa celular. Según Alcántar (2014) las plantas poliploides pueden tener una capacidad fisiológica superior (por ejemplo, mayor resistencia a patógenos) que sus contrapartes diploides. Ramírez *et al.*, (2013) refiere que los poliploides toleran mejor los ambientes más secos que el diploide debido a cambios en su fisiología que resultan del incremento en el tamaño celular.

Oumar *et al.*, (2011) y Tambong *et al.*, (1998) desarrollaron investigaciones en *X. sagittifolium* para determinar los niveles de ploidía inducidos con colchicina y obtuvieron plantas poliploides. Guatemala (2015) inició los estudios en Nicaragua, evaluando el efecto de la colchicina sobre características morfológicas y citológicas en *X. violaceum*.

El presente trabajo se realizó con la finalidad de evaluar el efecto de la aplicación *in vitro* de colchicina en la inducción de cambios morfológicos y citológicos en dos especies de quequisque y generar nuevas variantes genéticas resistentes a la enfermedad mediante la obtención de poliploides y que puedan seguir siendo estudiadas como posibles plantas resistentes a mal seco.

II. OBJETIVOS

2.1. General

Evaluar el efecto de la aplicación *in vitro* de colchicina sobre la morfología y citología en dos especies de quequisque (*Xanthosoma* spp.)

2.2. Específicos

- Determinar el efecto de diferentes dosis de colchicina sobre la morfología de *X. violaceum* y *X. sagittifolium* a nivel *in vitro* y en invernadero.
- Evaluar el efecto de diferentes dosis de colchicina sobre la citología de *X. violaceum* y *X. sagittifolium*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Descripción del lugar

El estudio se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Universidad Nacional Agraria, ubicada en el km 12 ½ panamericana norte, Managua.

3.2. Inducción con colchicina

Se estableció el esquema de reproducción *in vitro* en plantas de quequisque lila (*X. violaceum*) y quequisque blanco (*X. sagittifolium*). Se utilizaron 100 vitroplantas de cada genotipo (blanco y lila) y se realizó la inducción empleando colchicina, cada tratamiento estuvo compuesto por 20 vitroplantas. Los tratamientos y dosis empleadas de colchicina se determinaron a partir de los estudios realizados por Guatemala (2015), Tambong *et al.*, (1998) y Oumar *et al.*, (2011) utilizando valores intermedios (Cuadro 1).

Cuadro 1. Dosis de inducción de colchicina empleadas en cada tratamiento

Tratamientos	Dosis de inducción (mg l ⁻¹ de colchicina)
T0 (Testigo)	0
T10	10
T20	20
T40	40
T60	60

Las vitroplantas fueron inducidas por 10 días en el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con las respectivas dosis de colchicina, luego fueron transferidas a un nuevo medio MS simple sin reguladores de crecimiento por 36 días. Finalmente se trasladaron a un medio de enraizamiento MS + 1 mg l⁻¹ AIA (Ácido Indol Acético) para el desarrollo de raíces y producción de plantas independientes, donde pasaron un período de 67 días en el cuarto de crecimiento.

3.3. Aclimatización

A los 103 días después de la inducción, cuando las vitroplantas alcanzaron su desarrollo con suficientes raíces se establecieron en invernadero en bolsas de polietileno utilizando una mezcla

de tierra con sustrato inerte kekkila® en proporción 2:1. El riego se realizó de forma manual tres veces por semana para evitar la pérdida de plantas por déficit de agua.

3.4. Variables evaluadas

3.4.1. Variables morfológicas *in vitro*

Las variables evaluadas a los 23, 36 y 78 días después de la inducción (ddi) fueron:

- Altura de planta (cm). Medida a partir de la base del pseudotallo hasta la inserción del pecíolo de la hoja de mayor altura.
- Número de hojas. Conteo de hojas verdes totales presentes en la planta. Aquí se tomó en cuenta anomalías como deformaciones en las hojas.
- Número de raíces. Se realizó conteo de raíces principales o primarias
- Número de brotes. Se contabilizaron los brotes que crecieron a partir de la planta principal

3.4.2. Variables morfológicas en invernadero

Las variables evaluadas en la fase de aclimatización a los 72 días después del trasplante (ddt) fueron:

- Altura de la planta (cm).
- Número de hojas.
- Área foliar. Se midió el largo de la hoja (LH, desde el punto de inserción del pecíolo de la hoja hasta la punta de la misma) y ancho de la hoja (AH, desde la parte más ancha de la hoja). Se utilizó la fórmula: $(LH*AH)*0.923$ que es el factor de corrección propuesto por Agueguia (1993).
- Diámetro del pseudotallo (cm). Se midió de forma horizontal con un vernier en la base de la planta.
- Porcentaje de sobrevivencia. Se contaron las plantas a los 78 ddi *in vitro* y a los 72 ddt en invernadero y se determinó la sobrevivencia a partir de las 20 vitroplantas establecidas inicialmente.

3.4.3. Evaluación de variables citológicas

La evaluación se realizó en el laboratorio de microbiología de la Universidad Nacional Agraria, las variables se evaluaron a los 110 ddt para el genotipo lila y a los 116 ddt para genotipo blanco.

Se evaluaron las siguientes variables:

- Número de estomas por cm^2 . Se realizó conteo de los estomas presentes en el haz de la hoja empleando un contador manual de células.
- Largo de estomas (μm). Medido verticalmente al ostiolo. Se seleccionaron 3 estomas al azar y se midieron con un micrómetro colocado en el microscopio. El valor medido se multiplicó por el factor de corrección (6.8) que se calculó cuando se calibró el microscopio.
- Número de cloroplastos por estomas. Se seleccionaron 4 estomas al azar por cada cm^2 y se realizó el conteo visual de cloroplastos en las células oclusivas del estoma.

Se cortaron al azar cinco hojas por tratamiento (1 hoja por planta) y se llevaron al laboratorio entre las 7:00-9:00 am. La hoja se dividió en tres secciones: base, medio y ápice (Figura 1), tomando en cada sección 1 cm^2 de hoja (15 muestras por tratamiento). Estas muestras se sumergieron por 15 minutos en yoduro de potasio (KI). Luego se colocaron en porta-objetos y se ubicaron en ambiente oscuro. Se realizó el conteo visual y medición en microscopio en un lente objetivo de 20X (Figura 2).

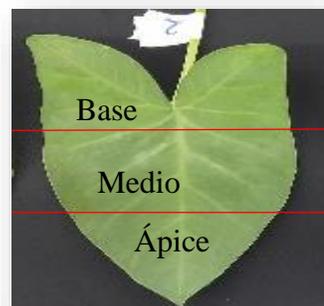


Figura 1. División de las hojas para la evaluación de variables citológicas.

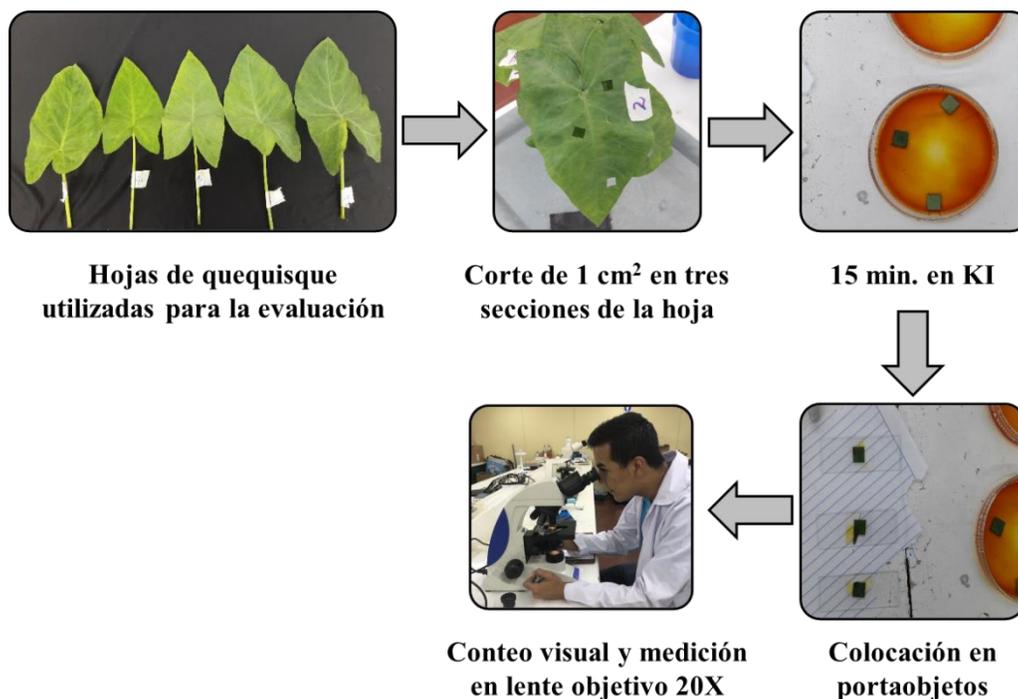


Figura 2. Proceso de preparación de muestras para evaluación de variables citológicas.

Calibración del microscopio: Para medir el largo de los estomas se realizó la calibración de microscopio utilizando la metodología de Gutiérrez (2012), haciendo uso de un micrómetro objetivo y un micrómetro ocular, se hizo coincidir las escalas de ambos micrómetros para contabilizar cuantas escalas del ocular coincidían con las del objetivo y obtener el factor de corrección para conocer el largo de los estomas. La fórmula de calibración es:

$$\text{Valor micrométrico} = \frac{\text{División del micrómetro objetivo en micras}}{\text{División del micrométrico}} \times 1000$$

3.5. Diseño experimental

Se realizó un diseño completamente al azar (DCA) con dos factores: cinco dosis y dos genotipos, con 20 observaciones por tratamiento.

El modelo aditivo lineal utilizado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Y_{ijk} = La k-ésima observación del i-ésimo tratamiento

μ = Estima a la media poblacional

α_i = Efecto del i-ésimo nivel de las dosis de colchicina

β_j = Efecto debido al j-ésimo nivel de los genotipos

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto de interacción entre dosis y genotipos

ε_{ijk} = Efecto aleatorio de variación

3.6. Análisis estadístico

Las variables morfológicas *in vitro*, en invernadero y citológicas se analizaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) con una separación de medias de Tukey al 95% de confianza en el programa estadístico InfoStat (versión 2018e).

Para las variables discretas (número de hojas, raíces y brotes) se realizó transformación de los datos en las tres evaluaciones *in vitro* utilizando $\sqrt{+0.5}$ con el objetivo de homogenizar los datos analizados.

La sobrevivencia *in vitro* y en invernadero se calculó matemáticamente y se representó con gráficas porcentuales diseñadas con el programa Microsoft Excel 2016.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Variables morfológicas *in vitro*

En el genotipo lila hubo diferencias significativas entre los tratamientos en todas las variables en las tres evaluaciones. Los tratamientos T0 y T10 registraron plantas estadísticamente superiores en altura de planta y número de raíces a los demás tratamientos en las tres evaluaciones y el tratamiento T20 fue superior en altura en la tercera evaluación. Los tratamientos T0, T10 y T20 fueron estadísticamente superiores a los demás tratamientos en número de hojas en las tres evaluaciones y el tratamiento T60 fue superior en la tercera evaluación (Cuadro 2).

Para la variable número de brotes los tratamientos T40 y T60 fueron estadísticamente superiores en las tres evaluaciones (Cuadro 2).

Cuadro 2. Medias y categorías estadísticas según Tukey de variables morfológicas evaluadas a los 23, 36 y 78 ddi en vitroplantas del genotipo lila tratadas durante 10 días con cuatro dosis de colchicina

Tratamientos	Altura de planta (cm)			Número de hojas			Número de raíces			Número de brotes		
	23	36	78	23	36	78	23	36	78	23	36	78
T0	4.45 a	4.50 a	9.02 a	3.26 a	4.16 a	4.32 a	4.16 a	4.63 a	8.16 a	0.00 b	0.00 b	0.05 c
T10	5.42 a	5.47 a	9.43 a	3.39 a	4.17 a	4.28 a	4.06 a	4.28 a	8.72 a	0.00 b	0.06 b	0.06 c
T20	2.69 b	3.11 b	8.53 a	2.57 a	3.29 a	3.64 a	0.64 b	1.43 b	6.29 ab	0.14 b	0.21 b	0.93 b
T40	1.34 c	1.44 c	6.13 b	0.92 b	1.15 b	2.70 b	0.23 b	0.23 c	6.30 ab	0.54 ab	2.00 a	2.30 a
T60	1.06 c	1.13 c	5.75 b	1.27 b	1.80 b	3.75 a	0.00 b	0.00 c	4.88 b	0.67 a	1.27 a	1.63 ab
P-valor	***	***	***	***	***	***	***	***	***	**	***	***
CV	33.74	41.31	25.50	17.98	16.89	6.75	29.10	28.45	14.36	65.88	59.62	39.41

NS: No Significativo; *, ** y *** existe significancia para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001 respectivamente.

En el genotipo blanco los tratamientos registraron diferencias significativas en las variables altura de planta, número de hojas y número de raíces en las tres evaluaciones. En altura de planta y número de hojas los tratamientos T0 y T10 fueron estadísticamente superiores a los demás tratamientos en las tres evaluaciones (Cuadro 3).

En número de raíces los tratamientos T0 y T10 fueron estadísticamente superiores a los demás tratamientos en la primera y segunda evaluación. En la tercera evaluación el tratamiento T10 fue estadísticamente superior. Para la variable número de brotes, el tratamiento T60 fue estadísticamente superior en la primera y segunda evaluación. En la tercera evaluación no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Medias y categorías estadísticas según Tukey de variables morfológicas evaluadas a los 23, 36 y 78 ddi en vitroplantas del genotipo blanco tratadas durante 10 días con cuatro dosis de colchicina

Tratamientos	Altura de planta (cm)			Número de hojas			Número de raíces			Número de brotes		
	23	36	78	23	36	78	23	36	78	23	36	78
T0	5.65 a	6.02 a	10.43 a	3.65 a	4.68 a	4.74 a	5.3 a	5.37 a	6.84 ab	0.10 b	0.53 b	0.74 a
T10	5.12 a	6.38 a	10.76 a	3.29 a	4.31 a	4.50 a	4.35 a	4.63 a	8.44 a	0.35 b	0.69 b	1.00 a
T20	1.62 b	2.56 b	6.65 b	1.60 b	2.33 b	3.5 ab	0.20 b	2.00 b	7.75 ab	0.73 ab	0.78 b	1.00 a
T40	0.67 b	1.23 b	5.43 b	0.83 b	1.00 c	2.33 b	0.00 b	0.00 b	3.33 b	0.25 b	0.86 b	1.67 a
T60	0.83 b	1.08 b	5.70 b	0.78 b	0.83 c	2.75 b	0.33 b	0.33 b	4.00 ab	1.67 a	1.67 a	2.00 a
P-valor	***	***	***	***	***	***	***	***	*	**	*	NS
CV	61.33	46.12	17.92	28.67	11.52	12.57	38.18	30.44	19.45	67.42	43.96	45.47

NS: No Significativo; *, ** y *** existe significancia para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001 respectivamente.

Los genotipos blanco y lila no presentaron diferencias significativas en altura de planta, número de hojas y número de raíces, sin embargo, para número de brotes, el genotipo blanco fue superior. Los tratamientos registraron diferencias significativas en todas las variables; T0 y T10 resultaron superiores en altura de planta, número de hojas y número de raíces, mientras que T40 y T60 resultaron superiores en número de brotes. En la interacción Gen*Trat las variables número de hojas y número de raíces no presentaron diferencias significativas, pero sí hubo diferencias estadísticas significativas en altura de planta y número de brotes, donde el genotipo blanco registró mayores alturas en los tratamientos T0 y T10. En número de brotes, el genotipo lila fue superior en T40 seguido del genotipo blanco en T60 (Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis de varianza por genotipo, tratamiento e interacción genotipo-tratamiento en las variables altura de planta, número de hojas, raíces y brotes a los 78 ddi

	Altura de planta	Número de hojas	Número de raíces	Número de brotes
Genotipo	NS	NS	NS	*
Tratamiento	***	***	***	***
Gen*Trat	*	NS	NS	**
CV	22.27	9.65	16.60	42.97

NS: No Significativo; *, ** y *** existe significancia para $P < 0.05$, 0.01 y 0.001 respectivamente.

Ambos genotipos mostraron la misma tendencia en el crecimiento (altura de planta, número de hojas y raíces), relacionado directamente con la dosis de colchicina empleada en cada tratamiento. Guatemala (2015) señala que en *X. violaceum* las plantas de los tratamientos testigo, 6.25 y 12.5 mg l⁻¹ de colchicina presentaron las mejores alturas, lo que indica que a menor concentración las plantas presentaron mayor crecimiento tal como se muestra en este estudio con la dosis T10 que se comportaron similar al tratamiento T0 registrando mayores alturas y número de hojas. Caballero (2016) registra menores alturas a mayor concentración y tiempo de exposición con colchicina en *P. peruviana*.

Salazar *et al.*, (2018) señalan que plantas de *K. daigremontiana* tratadas con colchicina durante 24 h de exposición registraron mayor número de hojas, y superior altura durante 48 h de exposición en el tratamiento de menor concentración (0,025%).

Algunas vitroplantas de los tratamientos T40 y T60 evaluadas a los 23 ddi presentaron crecimiento anormal, hojas deformes y engrosadas con presencia de clorosis y presentaron mayor número de brotes en el genotipo lila y en genotipo blanco en T60. Vitroplantas de T20, T40 y T60 presentaron necrosis en ambos genotipos, que se atribuye a la toxicidad de la colchicina en altas concentraciones, influyendo directamente en la mortalidad de las mismas (Figura 3). Molero *et al.*, (2018) evaluando vitroplantas de *Aloe vera* (L), registró que a mayor concentración y tiempo de exposición a colchicina (0.15% por 72 h) la emisión de brotes fue anormal (superior), tallos y hojas engrosadas en forma de rosetas apiñadas, con tejido necrótico presente lo que atribuyeron a un efecto de la duplicación cromosómica o que la dosis de colchicina fue nociva o tóxica para las plantas.



Figura 3. Vitroplantas con crecimiento lento y presencia de necrosis de los tratamientos T20, T40 y T60 evaluadas a los 23 ddi.

De igual manera, Cavalcanti (2011) induciendo poliploidía en *Heliconia bihai*, observó alteraciones en la forma de las hojas, un retraso en su crecimiento cuando se emplearon dosis mayores a 0,1% de colchicina, refiriendo que la mortalidad y el desarrollo lento de los explantes están relacionados con la toxicidad de la colchicina, produciendo perturbaciones fisiológicas en la célula.

4.2. Variables morfológicas en invernadero

El genotipo lila registró diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos en todas las variables. El tratamiento T0 fue estadísticamente superior en las variables altura de planta, número de hojas, área foliar y diámetro de pseudotallo. T10 mostró comportamiento estadístico superior en las variables altura, número de hojas y diámetro de pseudotallo (Cuadro 5)

Cuadro 5. Medias y categorías estadísticas según Tukey de variables morfológicas evaluadas a los 72 ddt en invernadero en plantas del genotipo lila tratadas con cuatro dosis de colchicina

Tratamientos	Altura de planta (cm)	Número de hojas	Área foliar (cm ²)	Diámetro de pseudotallo (cm)
T0	29.45 a	3.53 a	165.03 a	0.98 a
T10	23.56 ab	3.41 ab	108.65 b	0.85 ab
T20	16.54 c	2.78 c	85.64 b	0.79 ab
T40	13.01 c	2.90 bc	63.21 b	0.71 b
T60	18.91 bc	3.13 abc	78.02 b	0.84 ab
P-valor	***	**	***	**
CV	24.21	15.34	41.45	19.65

NS: No Significativo; *, ** y *** existe significancia para P<0.05, 0.01 y 0.001 respectivamente.

En el genotipo blanco, los tratamientos T0, T10 y T20 fueron estadísticamente superior a los demás tratamientos en la variable altura de planta. En las variables número de hojas, área foliar y diámetro de pseudotallo no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 6).

Cuadro 6. Medias y categorías estadísticas según Tukey de variables morfológicas evaluadas a los 72 ddt en invernadero en plantas del genotipo blanco tratadas con cuatro dosis de colchicina

Tratamientos	Altura de planta (cm)	Número de hojas	Área foliar (cm ²)	Diámetro de pseudotallo (cm)
T0	25.83 a	3.00 a	160.05 a	0.86 a
T10	25.44 a	2.92 a	145.64 a	0.75 a
T20	21.60 a	2.57 a	127.98 a	0.81 a
T40	10.87 b	2.67 a	76.58 a	0.70 a
T60	19.55 ab	3.50 a	107.55 a	0.80 a
P-valor	***	NS	NS	NS
CV	21.62	20.73	34.77	18.62

NS: No Significativo; *, ** y *** existe significancia para P<0.05, 0.01 y 0.001 respectivamente.

En invernadero, los genotipos blanco y lila no presentaron diferencias significativas en las variables altura de planta, número de hojas y diámetro de pseudotallo, sin embargo para el área foliar, el genotipo blanco fue superior. En los tratamientos hubo diferencias significativas en todas las variables, siendo los tratamientos T0 y T10 superiores en altura de planta y área foliar, mientras que en número de hojas y diámetro de pseudotallo los tratamientos T0 y T60 fueron superiores. En la interacción Gen*Trat no hubo diferencias significativas en ninguna de las variables (Cuadro 7).

Cuadro 7. Análisis de varianza por genotipo, tratamiento e interacción genotipo-tratamiento en las variables altura de planta, número de hojas, área foliar y diá. de pseudotallo a los 72 ddt

	Altura de planta	Número de hojas	Área foliar	Diámetro de pseudotallo
Genotipo	NS	NS	*	NS
Tratamiento	***	**	***	**
Gen. * Trat.	NS	NS	NS	NS
CV	23.06	17.54	38.19	19.27

NS: No Significativo; *, ** y *** existe significancia para P<0.05, 0.01 y 0.001 respectivamente.

Se observó que algunas plantas del genotipo lila de los tratamientos T40 y T60 presentaron enanismo, hojas ásperas de color verde intenso con mal formaciones y algunas con presencia de clorosis, que pueden ser efectos del incremento cromosómico y que son muy diferentes a las plantas testigo de T0 (Figura 4).



Figura 4. Apariencia morfológica 72 ddt de algunas plantas del genotipo lila de los tratamientos T0, T40 y T60.

La sobrevivencia *in vitro* a los 78 ddi para el genotipo lila se registró entre 40-95% y a los 72 ddt en invernadero entre 75-40%. Para el genotipo blanco, 78 ddi *in vitro* registró un 20-95% y a los 72 ddt en invernadero un 10-95%. Los tratamientos T0 y T10 tuvieron mayor sobrevivencia en ambos genotipos (Figura 5).

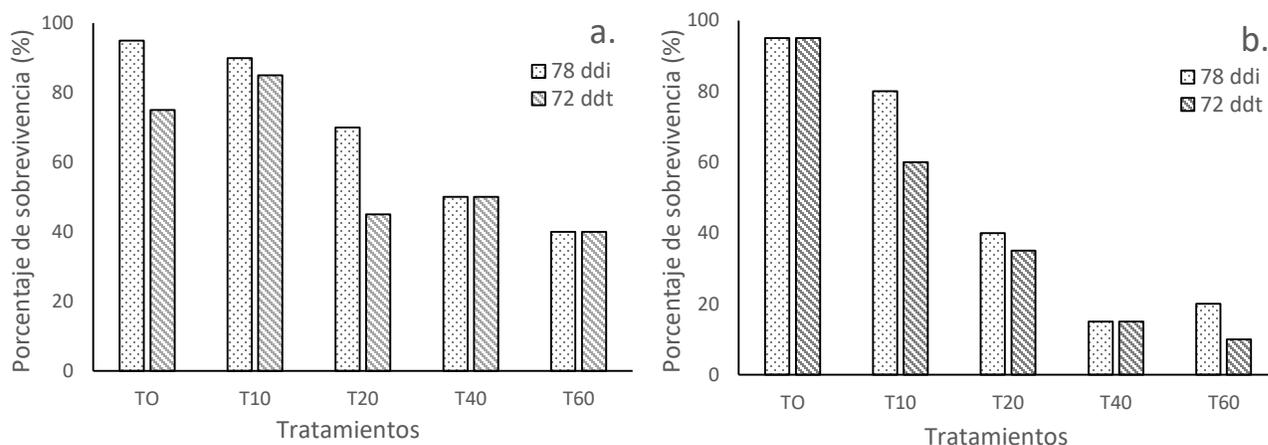


Figura 5. Porcentaje de sobrevivencia *in vitro* (78 ddi) y en invernadero (72 ddt) de plantas de los tratamientos T0, T10, T20, T40 y T60 en a. genotipo lila, b. genotipo blanco

Las dosis de colchicina empleadas en T20, T40 y T60 tuvieron un efecto directo en la mortalidad de las plantas, a medida que aumentó la dosis, también aumentó la mortalidad de las plantas en cada tratamiento. La relación que existe entre la concentración de colchicina y la supervivencia

del explante ha sido reportada por otros autores. Zhang *et al.*, (2007) encontraron que durante el proceso de inducción de tetraploides en *Anthurium andraeanum*, la supervivencia de las yemas tratadas con colchicina fue afectada por la concentración y el tiempo del tratamiento, de tal manera que a mayor concentración y tiempo de exposición, la sobrevivencia de las yemas fue menor.

Henny *et al.*, (2009) trataron híbridos del género *Dieffenbachia* con diferentes concentraciones de colchicina y encontraron que la sobrevivencia de las yemas tratadas decreció a nivel *ex vitro* a medida que aumentaba la concentración del químico.

Según Barrera (2010) un efecto de la colchicina es la generación de quimeras, que consisten en una mezcla de tejido con número normal y duplicado de cromosomas. Marzougui *et al.*, (2011) y Barboza (2015), indican que plantas con un óptimo nivel de poliploidía, pueden presentar anomalías como enanismo, follaje arrugado y plantas débiles.

Guatemala (2015) evaluó altura de planta en *X. violaceum* a los 23 ddt en invernadero, registró que los tratamientos con las menores concentraciones (6.25 y 12.5 mg l⁻¹) presentaron mayores alturas. En este estudio las plantas del genotipo lila tratadas con T0 y T10 registraron las mayores alturas y en el genotipo blanco T10 y T20 registraron las mayores alturas al igual que T0 o testigo.

En el número de hojas evaluadas a los 23 ddt en invernadero por Guatemala (2015), señala que no hubo diferencias entre los tratamientos, coincidiendo en esta investigación con el genotipo blanco y diferente al genotipo lila donde si hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos en el número de hojas.

Hannweg *et al.*, (2016) plantean que la ventaja más importante de la poliploidía inducida es que las plantas producidas tienden a tener superior rendimiento y caracteres morfológicos como altura, tamaño de hojas y raíz. De acuerdo con Urwin, (2014) también incrementa la biomasa, la capacidad fotosintética, el tamaño de los frutos y semillas.

4.3. Variables citológicas

El genotipo lila registró 5 categorías estadísticas en el número de estomas por cm². El tratamiento T0 fue estadísticamente superior registrando mayor número de estomas por cm². En

el número de cloroplastos por estoma y largo de estomas se registraron 2 categorías, donde T0 fue estadísticamente inferior a los demás tratamientos en ambas variables (Cuadro 8).

Los tratamientos con colchicina registraron mayor número de cloroplastos y fueron más largos en comparación a T0, también se puede observar que a medida que aumentó la dosis de colchicina aumentó el número de estomas por cm² en los tratamientos (Cuadro 8, Figura 6).

Cuadro 8. Medias y categorías estadísticas según Tukey de variables citológicas evaluadas a los 110 ddt en genotipo lila

Tratamientos	Número de estomas por cm ²	Número de cloroplastos por estoma	Largo de estomas (µm)
T0	1637.4 a	15.47 b	38.76 b
T10	952.07 e	18.20 a	55.03 a
T20	1131.47 d	18.27 a	55.03 a
T40	1235.73 c	18.67 a	54.85 a
T60	1486.27 b	18.13 a	55.13 a
P-valor	***	***	***
CV	4.81	7.56	3.59

NS: No Significativo; *, ** y *** existe significancia para P<0.05, 0.01 y 0.001 respectivamente.

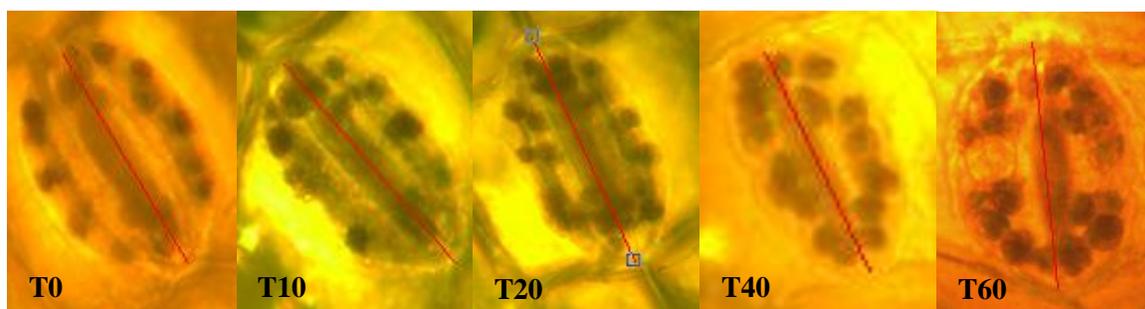


Figura 6. Largo de estomas y número de cloroplastos por estoma de los tratamientos T0, T10, T20, T40 y T60.

En el genotipo blanco, T0 fue estadísticamente superior en número de estomas por cm². En cloroplastos por estoma y largo de estomas, los tratamientos con colchicina fueron estadísticamente superiores a T0 y a medida que aumentó la dosis de colchicina, aumentó el número de estomas por cm² en los tratamientos (Cuadro 9, Figura 7).

Cuadro 9. Medias y categorías estadísticas según Tukey de variables citológicas evaluadas a los 116 ddt en genotipo blanco

Tratamientos	Número de estomas por cm ²	Número de Cloroplastos por estoma	Largo de estomas (μm)
T0	1520.93 a	15.27 b	39.58 b
T10	893.13 d	18.20 a	55.03 a
T20	1010.80 c	18.07 a	54.90 a
T40	1305.50 b	18.50 a	55.42 a
T60	1379.00 b	18.17 a	54.17 a
P-valor	***	***	***
CV	5.62	7.49	3.94

NS: No Significativo; *, ** y *** existe significancia para P<0.05, 0.01 y 0.001 respectivamente.

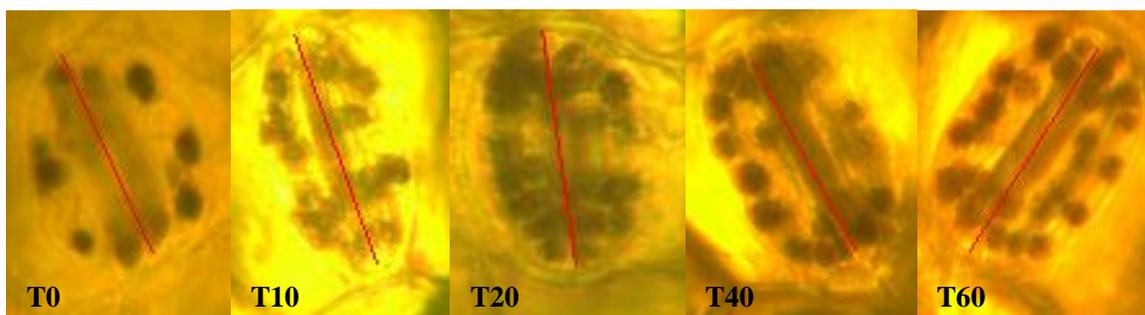


Figura 7. Largo de estomas y número de cloroplastos por estoma de los tratamientos T0, T10, T20, T40 y T60.

Las variables número de estomas por cm², número de cloroplastos y largo de estomas tuvieron un comportamiento similar en el genotipo lila y el genotipo blanco, siendo diferentes los tratamientos donde se empleó colchicina en comparación a T0.

Sadat *et al.*, (2017) indican que los estomas más largos los presentaron plantas tetraploides inducidas con colchicina en plantas de *Trachyspermum ammi* L.), mientras que las plantas testigo (diploides) presentaron mayor densidad de estomas. Salazar *et al.*, (2018) señalan que plantas de *K. daigremontiana* expuestas a 0.025 y 0.10% de colchicina por 24 y 48 h de exposición tuvieron estomas más grandes y mayor número de cloroplastos en comparación al testigo. Estos resultados coinciden con los encontrados en este estudio donde se presentaron mayor largo de estomas y mayor número de cloroplastos por estomas en las plantas tratadas con colchicina.

Guatemala (2015) evaluando variables citológicas en plantas de *X. violaceum* tratadas con colchicina, registró mayor número de estomas pero menor longitud de los mismos en las plantas testigo que las plantas tratadas con colchicina, lo que permite concluir que el tamaño y el número de estomas son inversamente proporcionales. Los tratamientos con las dosis más bajas de colchicina (6.25 y 12.5 mg l⁻¹) registraron mayor número de cloroplastos.

Gantait *et al.*, (2011) mencionan que la inducción de ploidía generalmente conduce a una menor densidad estomática, probablemente a estomas más grandes en plantas tetraploides. Estas mismas observaciones han sido reportadas por estudios de inducción de ploidía (Xu *et al.*, 2016). La densidad estomática puede ser utilizada como un fuerte indicador de ploidía en plantas (Gomes *et al.*, 2014).

Omidbaigi *et al.*, (2010) induciendo poliploidia en *Ocimum basilicum* L. con colchicina, obtuvieron plantas tetraploides con mayor número de cloroplastos en las células guarda del estoma en comparación a las plantas diploides. El conteo de cloroplastos permite distinguir los niveles de ploidía (Huaman, 1995). Ordoñez (2014) señala que un genotipo diploide está en la escala de 6-8 cloroplastos, un triploide de 9-11 y un tetraploide de 12-14 cloroplastos.

La inducción de poliploidía no pudo ser comprobada en este estudio por falta del equipo especializado. Los resultados mostraron cambios morfológicos *in vitro* que contenían colchicina a partir de la dosis T20 con respecto al testigo y cambios citológicos con respecto al testigo a partir de la dosis T10, lo que podría indicar cambios en el nivel de ploidía. Oumar *et al.*, (2011) indican que se podría crear resistencia a mal seco en quequisque induciendo tetraploides tal como se presenta en el quequisque amarillo (tetraploide). Es necesario realizar estudios de seguimiento para determinar los niveles de ploidía de las plantas inducidas con colchicina, su comportamiento en campo y la posible resistencia de las plantas a mal seco.

V. CONCLUSIONES

- A nivel *in vitro*, ambos genotipos presentaron diferencias significativas entre los tratamientos en las variables morfológicas. T0 y T10 obtuvieron plantas con mayor altura, número de hojas y raíces en ambos genotipos. T40 y T60 indujo mayor número de brotes en el genotipo lila y T60 en el genotipo blanco.
- En invernadero T0 y T10 obtuvo plantas mayores en altura, número de hojas, área foliar y diámetro de pseudotallo en el genotipo lila. En el genotipo blanco T0, T10 y T20 obtuvieron plantas con mayor altura.
- A nivel citológico ambos genotipos tuvieron el mismo comportamiento, el número de estomas por cm^2 aumenta a mayor dosis de colchicina y en número de cloroplastos por estoma y largo de estomas los tratamientos con colchicina fueron superiores en comparación a T0.

VI. RECOMENDACIONES

- Dar seguimiento a las plantas tratadas con colchicina y determinar los niveles de ploidía de cada tratamiento a través de citometría de flujo y conteo de cromosomas para determinar si se obtuvieron nuevas variantes genéticas.
- Evaluar el comportamiento de las plantas en condiciones de campo para determinar su tolerancia a plagas, enfermedades y sus características fisiológicas y productivas.
- Realizar estudios aplicando colchicina a un mayor número de plantas para incrementar las probabilidades de encontrar variantes genéticas que podrían ser resistentes al mal seco.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Acebedo RJ y Navarro, ER. 2010. Efecto del mal seco (*Pythium myriotylum* Drechs) en campo y sombreadero sobre la agromorfología de 15 accesiones de quequisque (*Xanthosoma* spp) desarrollo de síntomas y detección microbiológica (en línea). Tesis Ing. Protec. Agríc. Forest. Managua, Nicaragua, Universidad Nacional Agraria. Consultado 25 Mar. 2019. Disponible en <http://repositorio.una.edu.ni/2120/1/tnh20a174.pdf>
- Agueguia, A. 1993. Non-Destructive estimation of leaf area in cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* [L.] Schott). 138-141.
- Alcántar, J. 2014. La poliploidía y su importancia evolutiva. *Temas de Ciencia y Tecnología*. 18(54):235-238.
- Astudillo, L. 2005. Inducción de poliploidía en plantas del género *Leucocoryne* (en línea). Tesis Ing. Agr. Valparaíso, Chile, Universidad Católica de Valparaíso. Consultado 10 de May. 2019. Disponible en http://ucv.altavoz.net/prontus_unidacad/site/artic/20061206/asocfile/20061206142710/astudillo_luis.pdf
- Banco Central de Nicaragua. 2017. Plan de Produccion, Consumo y Comercio Ciclo 2017-2018 (en línea). Nicaragua. Consultado 15 May. 2019. Disponible en <https://www.bcn.gob.ni/publicidad/img/landscape/Plan%20de%20Producci%C3%B3n%20Consumo%20y%20Comercio%20Ciclo%202017%202018.pdf>
- Barboza, R. 2015. Guía. Tema 3: Elementos que se utilizan en el mejoramiento (en línea). Consultado 02 de Oct. 2019. Disponible en <https://es.scribd.com/document/282151256/MEjoramiento-Vegetal>
- Barrera, BA. 2010. Desarrollo de un protocolo de duplicación cromosómica en híbridos intergenéricos *Hellanthus annuus* x *Tithonia rotundifolia* (en línea). MSc. Cie. en fito. México, México. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Consultado 01 de Oct. 2019. Disponible en <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/4011/61694%20Barrera%20Romo%2C%20Bricia%20Anayanky.pdf?sequence=4&isAllowed=y>
- Blakeslee, AF y Avery, AG. 1937. Methods of inducing chromosome doubling in plants by treatment with colchicine (en línea). *Journal of Heredity*, Volume 28. Pp 393–411. disponible en <https://academic.oup.com/jhered/article/28/12/393/772592>
- Caballero, D. 2016. Determinación de la concentración y tiempo de exposición de la colchicina para la duplicación del número cromosómico de *Physalis peruviana* l. en condiciones *in vitro* (en línea). Tesis Lic. Biología. Arequipa, Perú, Universidad Nacional San Agustín de Arequipa. Consultado 03 Oct. 2019. Disponible en <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/2376/BIcacadp.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Castellón, L. 2017. Caen las exportaciones de tubérculos (en línea). La prensa. Managua, Nicaragua; Consultado 08 May. 2019. Disponible en <https://www.laprensa.com.ni/2017/02/01/economia/2175641-caen-las-exportaciones-de-tuberculos>

- Cavalcanti, G. 2011. Indução de poliploidia *in vitro* com aplicação de *Heliconia bihai* (en línea). Tesis de MSc Cie. Bio. Pernambuco, Brasil, UFPB. Consultado 04 Oct. 2019. Disponible en https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/2117/1/arquivo7062_1.pdf
- Censo Nacional Agropecuario. 2011. Informe final IV CENAGRO (en línea). Instituto Nacional de Informacion de Desarrollo INIDE. Ministerio Agropecuario y Forestal MAGFOR. Nicaragua. Consultado 15 May. 2019. Disponible en <https://www.inide.gob.ni/Cenagro/INFIVCENAGRO/IVCENAGROINFORME/assets/common/downloads/Informe%20Final%20IV%20CENAGRO.pdf>
- Dewey, R. 1979. Some applications and misapplications of induced poliploidy to plant breeding. Polyploidy. Ed. Lewis WH. New York, US. Plenam Press. 445-470.
- El Nuevo Diario. 2012. Aumentan exportaciones de raíces y tubérculos (en línea). Managua, Nicaragua; Consultado 08 May. 2019. Disponible en <https://www.elnuevodiario.com.ni/economia/248006-aumentan-exportaciones-raices-tuberculos/>
- Gantait, S; Mandal, N; Bhattacharyya, S; Das, PK. 2011. Induction and identification of tetraploids using *in vitro* colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella (en línea). Plant Cell Tissue Organ Cult. 106(3):485-493. Consultado 01 Oct. 2019. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/229198979_Induction_and_identification_of_tetraploids_using_in_vitro_colchicine_treatment_of_Gerbera_jamesonii_Bolus_cv_Sciella
- Gomes, SS; Saldanha, CW; Neves, CS; Trevizani, M; Raposo, N; Notini, M; Santos, M; Campos, J; Otoni, WC; Viccini LF. 2014 Karyotype, genome size, and *in vitro* chromosome doubling of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (en línea). Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 118(1): 45–56. Consultado 06 Oct. 2019. Disponible en <https://www.semanticscholar.org/paper/Karyotype%2C-genome-size%2C-and-in-vitro-chromosome-of-Gomes-Saldanha/3f887788c99ccbf2632a46f613835e7cb1aad6>
- Guatemala, T. 2015. Efecto de la aplicación *in vitro* de colchicina sobre caracteres morfológicos y citológicos en plantas de quequisque (*Xanthosoma violaceum* Schott) Cv. Nueva Guinea (en línea). Tesis Ing. Agrón. Managua, Nicaragua, Universidad Nacional Agraria. Consultado 01 Oct. 2019. Disponible en <http://repositorio.una.edu.ni/3204/1/tnf30g918.pdf>
- Gutierrez, Y. 2012. Módulo práctico técnicas de laboratorio. Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua. 33-35
- Hannweg, K; G, Visser; K, Jager; I, Bertling. 2016. *In vitro* induced polyploidy and its effect on horticultural characteristics, essential oil composition and bioactivity of *Tetradenia riparia*. Revista sudafricana de botánica. 106: 186-191. Consultado 12 Jun. 2019. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629915326065>
- Hassawi, S; Liang, G. 1991. Antimitotic Agents: Effects of doubled haploid production in wheat. Crop Science 31(3): 723–726.

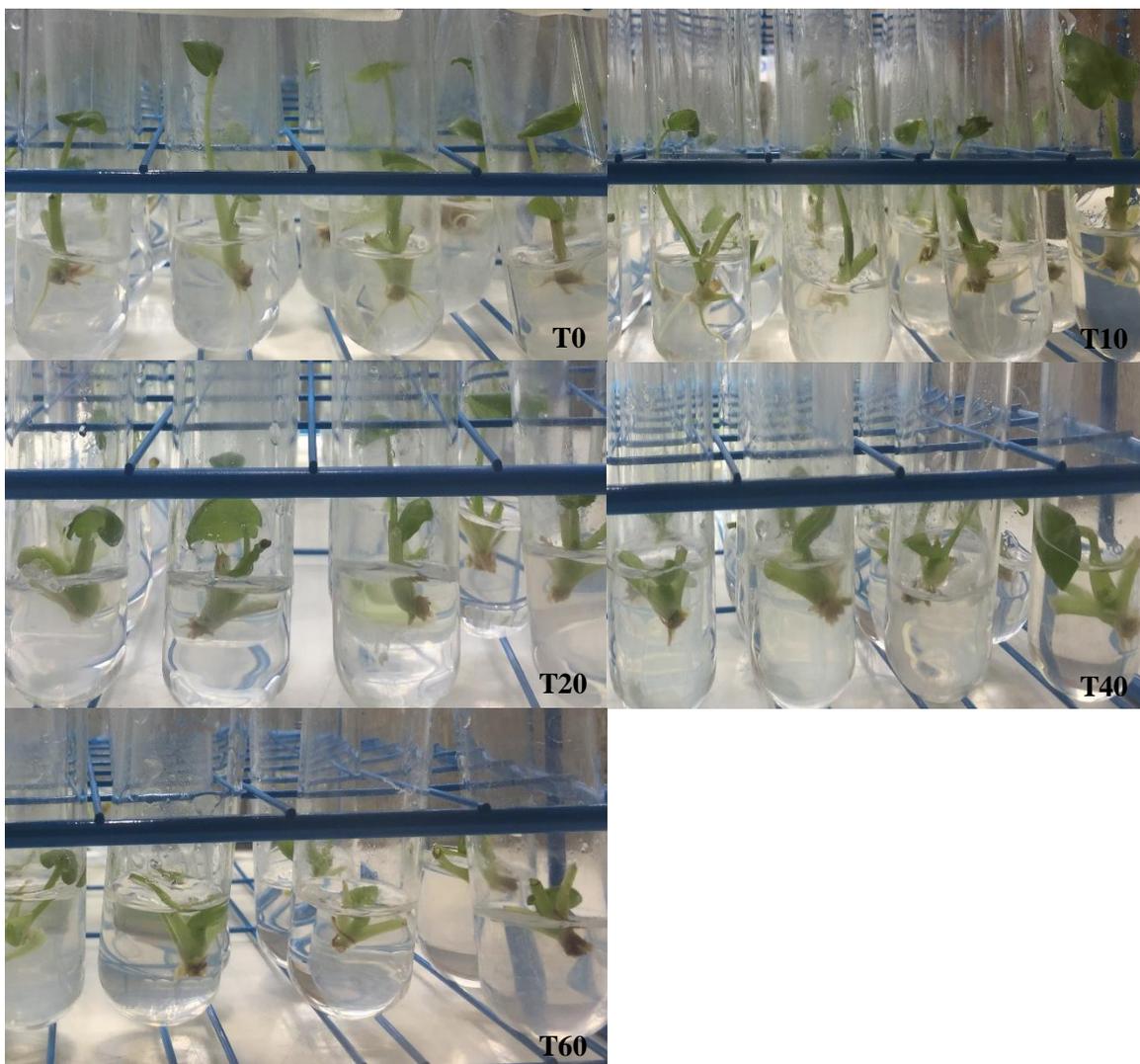
- Henny, R; Holm, J; Chen, J; Scheiber, M. 2009. *In vitro* induction of tetraploids in *Dieffenbachia* ‘Star Bright M-1’ by colchicine (en línea). Hortscience, 44(3):646–650. Consultado 05 Oct. 2019. Disponible en <https://journals.ashs.org/hortsci/view/journals/hortsci/44/3/article-p646.xml>
- Huaman, Z. 1995. Técnicas citológicas para determinar el número de cromosómico y la fertilidad de las papas. Guía de investigación CIP 10. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú. 18 p.
- Marzougui, N; Boubaya, A; Thabti, I; Elfalleh, W; Guasmi, F; Ferchichi, A. 2011. Polyploidy induction of Tunisian *Trigonella foenumgraecum* L (en línea). populations. African Journal of Biotechnology 10(43): 8570-8577. Consultado 03 Oct. 2019. Disponible en <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/95450/84791>
- Molero, T; Narváez, M; Fernández, E. 2018. Inducción de poliploidía con clochicina en vitroplantas de *Aloe vera* (L.) (en línea). Revista Colombiana de Biotecnología. Universidad del Zulia, Maracaibo, Colombia. 10 (1): 97 – 105. Consultado 06 Oct. 2019. Disponible en <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v20n1/0123-3475-biote-20-01-97.pdf>
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant, 15: 473-497. Consultado 05 Oct. 2017. Disponible en http://priede.bf.lu.lv/groz/AuguFiziologijas/Augu_audu_kulturas_MAG/literatura/03_Murashige%20Skoog1962.pdf
- Omidbaigi, R; Mirzaee, M; Hassani, M; Moghadam, M. 2010. Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment (en línea). International Journal of Plant Production. 4: 86-98. Consultado 05 Oct. 2019. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/228469582_Induction_and_identification_of_polyploidy_in_basil_Ocimum_basilicum_L_medicinal_plant_by_colchicine_treatment
- Ordoñez, B. 2014. Conteo de cloroplastos en las células guarda de las estomas (en línea). Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. Consultado 03 Oct. 2019. Disponible en <https://es.scribd.com/document/229438514/Conteo-de-cloroplastos-en-las-celulas-guarda-de-los-estomas>
- Oumar, D; Sama, A; Adiobo, A; Zok, S. 2011. Determination of ploidy level by flow cytometry and autopolyploid induction in cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*). African Journal of Biotechnology. Cameroon. 10 (73): 16491-16494. <https://pdfs.semanticscholar.org/c482/49744d0c74b9342a95fc12567cceed9b97f3.pdf>
- Pacumbaba, RP; Wutoh, JG; Meboka, MM. 1992. Protocol to screen cocoyam accessions for resistance or tolerance to cocoyam root rot disease in Cameroon (en línea). Plant Disease. 76: 768-770. Consultado 03 May. 2019. Disponible en https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1992Articles/PlantDisease76n08_768.pdf

- Peng, H; Zhang, J; Wu, X. 2008. The ploidy effects in plant gene expression: progress, problems and prospects (en línea). *Sci. China Ser. C-Life Sci.* 51 (4): 295-301. Consultado 28 Sept. 2019. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/5484805_The_ploidy_effects_in_plant_gene_expression_Progress_problems_and_prospects
- Pierce, BA. 2006. *Genetics: A Conceptual Approach*. 3rd edition. US. W.H. Freeman. 832 p.
- Poehlman, JM. 1987. *Breeding Field Crops*. 3rd edition. Van Nostrand Reinhold, New York, US. 724 p.
- Ramírez, F; Robledo, V; Foroughbakhch, R; Benavides, A; Alvarado, M. 2013. Viabilidad de Polen, Densidad y Tamaño de Estomas en Autotetraploides y Diploides de *Physalis ixocarpa* (en línea). *Botanical Sciences*. México. 91 (1): 11-18. Consultado 08 Oct. 2019. Disponible en <http://www.scielo.org.mx/pdf/bs/v91n1/v91n1a2.pdf>
- Reyes, G; Corea, HG; Guatemala, T. 2013. Guía de manejo agronómico del quequisque en Nicaragua (en línea). Managua, Nicaragua. Consultado 07 May. 2019. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/303894025_Guia_de_manejo_agronomico_d_e_quequisque_en_Nicaragua
- Saavedra, D; Reyes, G. 2012. Prospección tecnológica para el manejo de mal seco en quequisque (en línea). Managua, Nicaragua. Consultado 23 Abr. 2019. Disponible en http://www.renida.net.ni/cgi-bin/renida1/wxis.exe?IsisScript=cenida.xis&Accion=detalles&PrimerRegistro=000399&base=funica&pub_nac=no
- Sadat, A; Norouzi, M; Karimzadeh, G; Shirkool, K; Niazián, M. 2017. Effect of colchicine-induced polyploidy on morphological characteristics and essential oil composition of ajowan (*Trachyspermum ammi* L.) (en línea). *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 130: 543-551. Consultado 04 Oct. 2019. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/317329224_Effect_of_colchicineinduced_polyploidy_on_morphological_characteristics_and_essential_oil_composition_of_ajowan_Trachyspermum_ammii_L
- Salazar, S; Valderrama, G; Quintero, J. 2018. Efecto de la colchicina sobre la morfología foliar y los estomas de *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H.Perrier (Crassulaceae) (en línea). *Revista colombiana de ciencias hortícolas*. 12 (1): 212-222. Consultado 3 Oct. 2019. Disponible en https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencias_hortícolas/article/view/7059
- Tambong, J; Sapra, V; Garton, S. (1998). *In vitro* induction of tetraploids in colchicine-treated cocoyam plantlets (en línea). *Euphytica*. 104: 191-197. Consultado 12 May. 2019. Disponible en <https://link.springer.com/content/pdf/10.1023/A:1018609020397.pdf>
- Urwin, N. 2014. Generation and characterisation of colchicine-induced polyploid *Lavandula* × *intermedia*. *Euphytica*. 197(3): 331-339. Recuperado de <https://link.springer.com/article/10.1007/s10681-014-1069-5>
- Wheelock, J. 1998. *La comida nicaragüense*. Editorial Hispamer. Impreandes Presencia, S.A. Colombia.

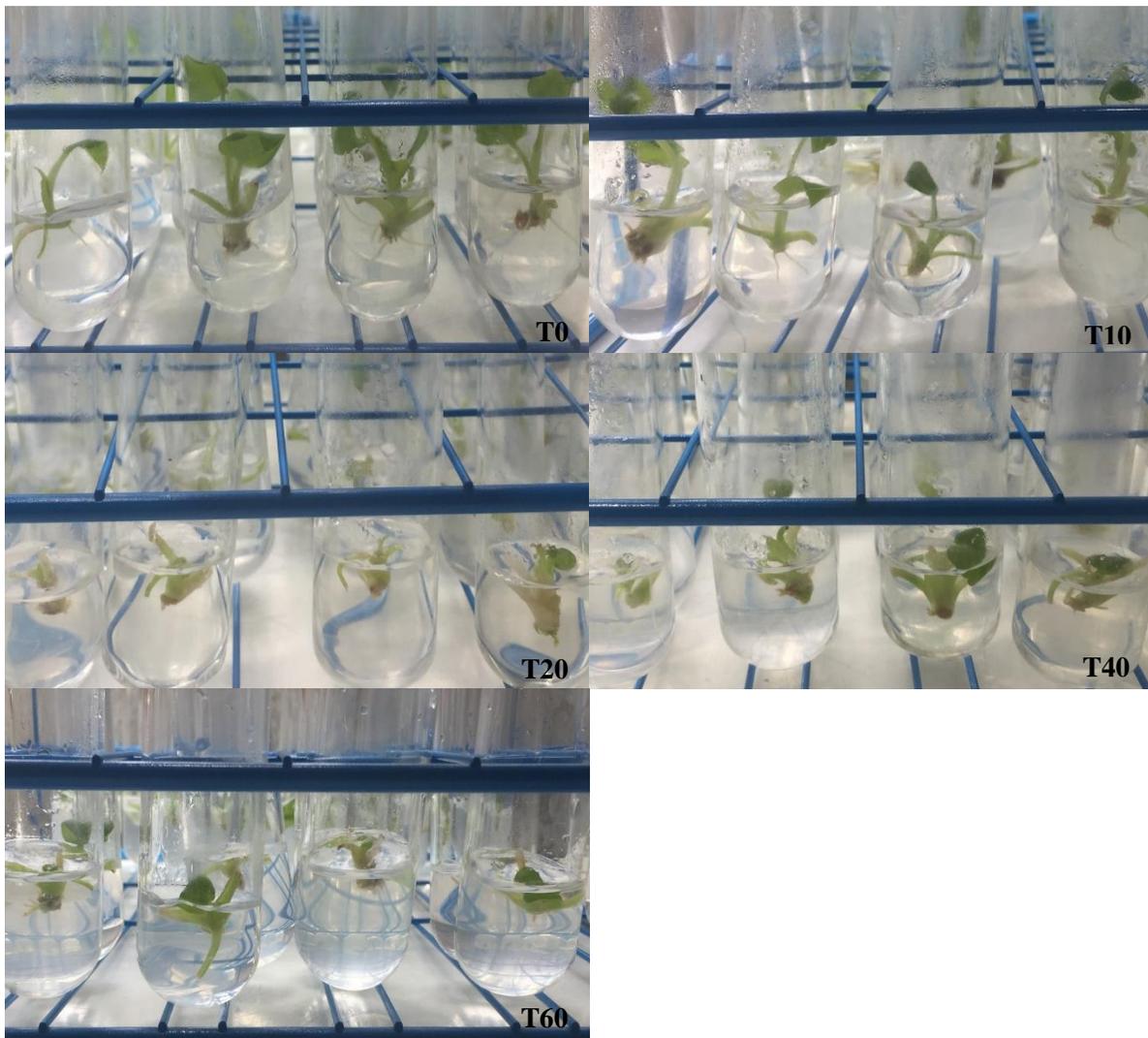
- Xu, C; Huang, Z; Liao, T; Li, Y; Kang, X. 2016. *In vitro* tetraploid plants regeneration from leaf explants of multiple genotypes in *Populus*. Plant Cell Tissue Organ Cult (PCTOC). 125(1):1–9.
- Zhang, Z; Li, Y; Jiang, L; Li, Y; Wang, Z; Xia, Q; Yi, M. 2007. *In vitro* tetraploid induction and its identification in *Anthurium andraeanum*. Acta Horticulturae Sinica. 245-253.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Vitroplantas del genotipo lila a los 23 ddi de los tratamientos T0, T10, T20, T40 y T60



Anexo 2. Vitroplantas del genotipo blanco a los 23 ddi de los tratamientos T0, T10, T20, T40 y T60



Anexo 3. Crecimiento de vitroplantas del genotipo blanco a los 23, 36 y 78 ddi



Anexo 4. Plantas en invernadero a los 50 ddt en invernadero de a=genotipo lila; b=genotipo blanco



Anexo 5. Hojas del genotipo lila utilizadas para la evaluación de las variables citológicas de los tratamientos T0, T10, T20, T40 y T60



Anexo 6. Hojas del genotipo blanco utilizadas para la evaluación de las variables citológicas de los tratamientos T0, T10, T20, T40 y T60

