



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEGETAL

Trabajo de graduación

Efecto de la aplicación *in vitro* de colchicina sobre caracteres morfológicos y citológicos en plantas de quequisque (*Xanthosoma violaceum* Schott) Cv. Nueva Guinea

AUTORA

Br. Tania Vanessa Guatemala Ortega

ASESOR

Dr. Guillermo Reyes Castro

Managua, Nicaragua

Julio, 2015



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEGETAL

Trabajo de graduación

Efecto de la aplicación *in vitro* de colchicina sobre caracteres morfológicos y citológicos en plantas de quequisque (*Xanthosoma violaceum* Schott) Cv. Nueva Guinea

AUTORA

Br. Tania Vanessa Guatemala Ortega

ASESOR

Dr. Guillermo Reyes Castro

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

Managua, Nicaragua
Julio, 2015

ÍNDICE DE CONTENIDOS

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
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. Ubicación del estudio	4
3.2. Diseño metodológico	4
3.3. Manejo del ensayo	4
3.4. Variables evaluadas	
3.4.1. Morfológicas	5
3.4.2. Citológicas	6
3.5. Análisis estadístico	6
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. Variables morfológicas	7
4.2. Variables citológicas	13
V. CONCLUSIONES	16
VI. RECOMENDACIONES	17
VII. LITERATURA CITADA	18
VIII. ANEXOS	22

DEDICATORIA

A Dios por todas sus bendiciones, mis padres Jorge Guatemala Herrera y María Ortega Robleto, mis hermanos Jorge y Juan Guatemala Ortega, a mi abuelita Margarita Herrera Siles.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por permitir nuestra existencia, tener las capacidades físicas y mentales para poder realizar lo que me proponga, por todo lo que ha puesto en mi camino que me ha servido mucho y hasta el momento sé que ha sido para bien y permitido ser la persona que ahora soy.

A mis padres y familia por ser tan responsables y darme todo hasta lo que no merezco.

Al Lic. Allan Henry Báez, gracias por su amistad, paciencia y apoyo incondicional siempre.

A mi asesor Dr. Guillermo Reyes Castro por sus múltiples explicaciones, paciencia, el tiempo invertido en el desarrollo de este trabajo y sus gestiones para que este estudio fuese posible.

Al MSc. Hugo René Rodríguez González por su valioso apoyo.

Al personal de los laboratorios de Cultivo de tejidos vegetales, Fisiología Vegetal y Microbiología de la Universidad Nacional Agraria, principalmente al MSc. Isaías Sánchez Gómez, Dr. Ulises Blandón, MSc. Ena Rivers Carcache, MSc. Rosario García Loáisiga y MSc. Marbell Aguilar por invertir parte de su tiempo en apoyarme, gracias por sus colaboraciones.

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		PÁGINA
1	Promedios y categorías estadísticas de altura evaluadas en tres fechas a plantas <i>in vitro</i> tratadas con colchicina.	7
2	Promedios y categorías estadísticas de las variables número, largo y ancho de hojas de plantas <i>in vitro</i> tratadas a concentraciones de colchicina evaluadas en invernadero a los 23 y 53 ddt.	9
3	Promedios y categorías estadísticas de las variables citológicas evaluadas en plantas en invernadero a los 53 ddt.	13

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Proceso de aplicación <i>in vitro</i> de colchicina y la evaluación de caracteres en plantas de quequisque cv. Nueva Guinea.	5
2	Aspecto de las plantas <i>in vitro</i> creciendo en medios de cultivo con las concentraciones: a = 0, b = 6.25, c = 12.5, d = 18.75, e = 25 mg ^l ⁻¹ de colchicina a los 35 dds.	8
3	Plantas tratadas con las concentraciones de colchicina: a=0, b=6.25, c=12.5, d=18.75, e=25 mg ^l ⁻¹ evaluadas a los 53 ddt.	10
4	Efecto de las concentraciones de colchicina sobre el ancho y largo de hoja a los 23 ddt.	11
5	Cloroplastos en células oclusivas del estoma en hojas de plantas tratadas a las concentraciones a=0, b=6.25, c=12.5, d=18.75, e=25 mg ^l ⁻¹ de colchicina evaluadas a los 53 ddt.	14
6	Número de estomas por cm ² , largo de estomas y cloroplastos por estoma en plantas expuestas a las concentraciones de colchicina.	15

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO		PÁGINA
1	Composición del medio nutritivo Murashige y Skoog (MS, 1962).	22
2	Plantas <i>in vitro</i> de quequisque tratadas con las concentraciones a=0, b=6.25, c=12.5, d=18.75, e=25 mg ^l ⁻¹ de colchicina en un medio MS + 0.5 mg ^l ⁻¹ para inducir enraizamiento.	23
3	Plantas en invernadero a los 15 días después del trasplante tratadas <i>in vitro</i> a las concentraciones a=0, b=6.25, c=12.5, d=18.75, e=25 mg ^l ⁻¹ de colchicina.	24
4	Cloroplastos en células oclusivas del estoma de plantas tratadas <i>in vitro</i> a las concentraciones a=0, b=6.25, c=12.5, d=18.75, e=25 mg ^l ⁻¹ de colchicina evaluadas a los 53 ddt.	25

RESUMEN

La poliploidía es un mecanismo evolutivo en algunos grupos de animales y vegetales que les confiere ventajas adaptativas al medio donde se desarrollan; mayor vigor, tamaño y características deseables para el hombre. La manipulación de la ploidía es utilizada en el fitomejoramiento para producir cultivares mejorados. La colchicina es ampliamente aplicada en la inducción de poliploides. Indicadores morfológicos y citológicos son utilizados como métodos indirectos para proyectar poliploidías en plantas. El quequisque (*Xanthosoma violaceum* Schott) mundialmente es atacado por el Mal seco (*Pythium myriotylum*), que reduce hasta en 100% los rendimientos. No existen cultivares diploides resistentes a la enfermedad. A plantas del cultivar Nueva Guinea se aplicó *in vitro* 0.0, 6.25, 12.5, 18.75 y 25 mg l⁻¹ de colchicina (tratamientos testigo, 1, 2, 3 y 4 respectivamente) por 40 días. En invernadero se evaluó la altura de planta, número, largo y ancho de hojas. Se cortó 1 cm² del ápice, parte media y base de las hojas para evaluar con micrómetro la densidad y tamaño de estomas en la hoja y el número de cloroplastos. 23 días después del trasplante (ddt) los tratamientos registraron plantas estadísticamente diferentes en altura, largo y ancho de hojas. A los 53 ddt las plantas no registraron diferencias estadísticas entre los tratamientos en las variables morfológicas pero si en las variables citológicas. Las concentraciones de colchicina 18.75 y 25 mg l⁻¹ indujeron disminuciones en la altura de planta, largo y ancho de hojas. Las concentraciones 6.25 y 12.5 mg l⁻¹ resultaron en menor número de estomas por cm², mayor tamaño de estomas y concentración de cloroplastos en estos.

Palabras claves: Colchicina, *Xanthosoma*, mejora genética, mal seco, estomas, cloroplastos.

ABSTRACT

Polyploidy is an evolutionary mechanism in some groups of animals and plants that gives them adaptive advantages to the environment where they live; greater vigor, size and desirable characteristics for the human being. The ploidy manipulation in plant breeding to produce improved cultivars is used. Colchicine is widely utilized in inducing polyploidy. Morphological and cytological indicators are being used as indirect methods to project polyploidy in plants. Cocoyam (*Xanthosoma violaceum* Schott) is worldwide attacked by root rot disease (RRD) (*Pythium myriotylum*), which reduces up to 100% yields. There are not diploid cultivars resistant to RRD. Different levels of colchicine (0.0, 6.25, 12.5, 18.75 and 25 mg l⁻¹, treatments control, 1, 2, 3 and 4 respectively) were *in vitro* applied for 40 days, to plants of the cultivar Nueva Guinea. At greenhouse, the height of plants, number, length and width of leaves were evaluated. 1 cm² from the apex, middle and base of the leaves of the plants from the treatments, was cut off to evaluate the density and size of stomata and the number of chloroplasts. 23 days after transplanting (DAT) treatments registered plants statistically superior in height, length and width of leaves. At 53 DAT plant recorded statistical differences between treatments only on cytological variables. Colchicine concentrations of 18.75 y 25 mg l⁻¹ induced increases in plant height, length and width of leaves. Concentrations 6.25 y 12.5 mg l⁻¹ resulted in lesser number of stomata per cm², and the longest stomata and higher chloroplast concentration.

Keywords: Colchicine, *Xanthosoma*, root rot, stomatas, chloroplasts.

I. INTRODUCCIÓN

El quequisque (*Xanthosoma violaceum* Schott) es originario de América, su distribución comprende las zonas tropicales de Centro América, Sudamérica y el Caribe, donde se encuentran alrededor de 57 especies (Mayo *et al.*, 1997).

En la década de los ochenta la demanda internacional de quequisque motivó a los agricultores del trópico húmedo Nicaragüense a sembrar áreas destinadas a la exportación. Para iniciar la siembra del cultivo e incrementar las áreas existentes importaron semillas provenientes de Costa Rica, estas semillas no tuvieron inspección fitosanitaria y no pasaron por ninguna norma cuarentenaria, como consecuencia se introdujo el mal seco. Esta enfermedad es la más devastadora del quequisque y puede reducir rendimientos en su totalidad. Causada por el hongo *Pythium myriotylum*, ataca las raíces de la planta y se disemina a través del material de propagación, contaminando los suelos donde persiste por muchos años (Reyes *et al.*, 2013).

En los últimos años la demanda nacional e internacional de quequisque ha aumentado significativamente, contradictoriamente, CETREX (2013) reporta una drástica y continua reducción en las exportaciones. En 2007 se exportaron 13,463.62 t de quequisque y en 2013 alrededor de 320.56 t, una disminución del 97.62 % en volumen de exportación. Reyes y Saavedra (2012) atribuyen las drásticas reducciones en la producción y rendimientos en las áreas anteriormente destinadas para el cultivo, a la contaminación de los suelos con el mal seco. Por esta razón, los agricultores del trópico húmedo han migrado la producción hacia las montañas con suelos vírgenes, trayendo como consecuencia el avance de la frontera agrícola, despales, diseminación de la enfermedad y aumento en los costos de producción.

A nivel mundial se han impulsado estudios de mejora genética en quequisque con la finalidad de obtener cultivares con mayores volúmenes de producción, resistencia a plagas y enfermedades, adaptación a nuevas zonas de cultivo, entre otros. Astudillo (2005) manifiesta que varios autores han investigado la citogenética basados en la manipulación de la poliploidía como técnica de mejora genética de plantas.

Todas las variedades comerciales de *Xanthosoma* hasta la fecha son diploides y altamente susceptibles a la enfermedad. Mayo *et al.*, (1997) reporta que el número cromosómico varía de $2n=22$, 24, 26, 39, 52. Cordero (1986) y García (1990) añaden la existencia de $2n=24$ cromosomas para *Xanthosoma violaceum* y Esnard *et al.*, (1993) reporta $2n=26$ para *Xanthosoma sagittifolium*. Existen poliploides naturales ($4\times$ y $5\times$) que muestran tolerancia a los efectos severos del mal seco, pero estos no producen un tamaño comercial de los cormelos (Sotomayor *et al.*, 1989). La mejora a través de cruces heteroploides entre los diploides y tetraploides no han tenido éxito, probablemente a la incompatibilidad de ploidías (Tambong *et al.*, 1998).

Hassawi y Liang (1991), Poehlman (1987) señalan que la colchicina es el químico más ampliamente aplicado y mejor estudiado que induce poliploides. Dewey (1979) menciona que hacia 1979 alrededor de 150 especies se han duplicado el número cromosómico utilizando colchicina.

La identificación de plantas poliploides se puede realizar con seguridad por métodos citológicos y mediante conteo de cromosomas; estos exigen una gran inversión de trabajo y recursos. Por eso al principio, se utilizan caracteres indirectos (morfológicos) que no proveen un criterio definitivo sobre el grado de poliploidía pero que son suficientemente seguros para las posibilidades del mejoramiento. Sin embargo, la expresión de estos caracteres no significa que haya una poliploidización exitosa o que la falta de dichos criterios sea prueba de ineffectividad del tratamiento (Rodríguez *et al.*, 1981).

Algunos caracteres han sido encontrados más fiables que otros, estos incluyen diámetro del polen, tamaño de semilla, tamaño de estomas y número de cloroplastos en las células guarda u oclusivas del estoma (Standring *et al.*, 1990).

II. OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto de la aplicación *in vitro* de colchicina sobre caracteres morfológicos y citológicos en plantas de quequisque (*Xanthosoma violaceum* Schott) Cv. Nueva Guinea en laboratorio e invernadero.

Específicos

1. Evaluar el efecto de cuatro concentraciones de colchicina sobre el largo, ancho, número de hojas y altura en plantas de quequisque *in vitro* e invernadero.
2. Determinar el número, tamaño de estomas y número de cloroplastos presentes en las células oclusivas de los estomas en plantas tratadas *in vitro* con y sin colchicina.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación y fechas del estudio

La producción *in vitro* de plantas y la aplicación de colchicina se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Universidad Nacional Agraria en el período Febrero-Julio 2012.

3.2. Diseño metodológico

Se utilizaron plantas de quequisque del cultivar Nueva Guinea procedentes de las áreas comerciales de ese municipio.

Las plantas *in vitro* fueron establecidas en tubos de ensayo conteniendo 10 ml del medio MS (Anexo 1) con las concentraciones de colchicina 0.00, 6.25, 12.50, 18.75 y 25.00 mg l⁻¹ según metodología de Esnard *et al.*, (1993) por 40 días. A continuación, se colocaron en el medio de cultivo MS + 0.5 mg l⁻¹ AIA para inducir enraizamiento por 40 días (Anexo 2). Posteriormente fueron trasladadas al invernadero a bandejas conteniendo compost durante 15 días (Anexo 3) y luego trasplantadas a bolsas de polietileno con compost donde permanecieron por 53 días. Se evaluaron 5 plantas por cada tratamiento. La Figura 1 esquematiza el procedimiento realizado.

3.3. Manejo del ensayo

La primera etapa del estudio se realizó en laboratorio, las plantas estuvieron en estas condiciones por 80 días. Posteriormente las plantas fueron trasladadas a invernadero donde se mantuvieron por 68 días (Figura 1).

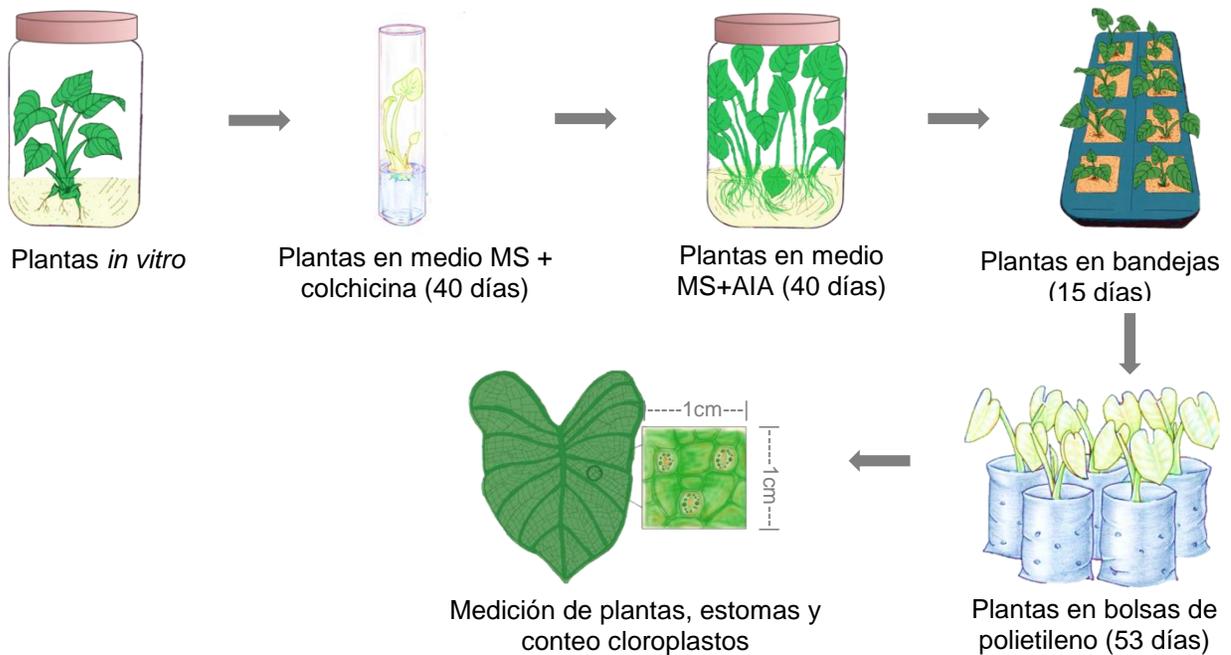


Figura 1. Proceso de aplicación *in vitro* de colchicina y la evaluación de caracteres en plantas de quequisque cv. Nueva Guinea.

3.4. Variables evaluadas

3.4.1. Morfológicas

Se realizó una evaluación de altura a las plantas *in vitro* a los 35 días después de sembradas (dds) en el medio MS con las concentraciones (0.00, 6.25, 12.50, 18.75, 25.00 mg^l⁻¹) de colchicina, esta se efectuó colocando una regla al lado de cada tubo de ensayo.

En invernadero a los 23 y 53 días después del trasplante (ddt) a bolsas de polietileno se evaluó altura de planta, número, largo y ancho de hojas.

- Altura de planta (cm). Medida a partir de la base del pseudotallo hasta la inserción del pecíolo de la hoja de mayor altura en la planta.
- Número de hojas. Hojas verdes totales presentes en la planta.
- Largo de hoja (cm). Desde el punto de inserción del pecíolo de la hoja hasta la punta de la hoja
- Ancho de hoja (cm). Cruzando horizontalmente el punto de inserción del pecíolo de la hoja.

3.4.2. Citológicas

A los 53 ddt se seleccionó al azar una hoja por planta de cada tratamiento, entre las 7:00-9:00 am. Las hojas se cortaron y se llevaron inmediatamente al laboratorio, cada hoja se dividió en tres partes (ápice, medio y base) y se tomó en cada una de estas 1 cm² de superficie. En total se evaluaron 15 muestras por tratamiento las que se sumergieron en una solución de KI-I por 5 minutos. Dicha solución se preparó mezclando 1 g de yoduro de potasio + 1 g de yodo en 100 ml de alcohol al 80% (Huamán, 1995), posteriormente se evaluaron en el microscopio a 100X las siguientes variables.

- Número de estomas por cm². Se realizó el conteo de los estomas presentes en el envés de la hoja con ayuda de un contador manual de células.
- Largo de estoma. Medido verticalmente al ostiolo. Se seleccionaron 20 estomas al azar y se midieron con un micrómetro colocado en el microscopio, para un total de 300 estomas medidos por tratamiento.
- Cloroplastos en células oclusivas del estoma. Los estomas seleccionados para su medición se fotografiaron y posteriormente se realizó el conteo visual de cloroplastos presentes.

3.5. Análisis de los datos

Las pruebas estadísticas paramétricas (Tuckey) se usan cuando la media aritmética y desviación estándar de las muestras tienden a tener una distribución normal, con varianzas similares (homogeneidad) y el tamaño de las muestras es suficiente. En caso que no se cumplan estos requisitos y el tamaño de la muestra sea menor a once casos, el empleo de las pruebas no paramétricas (Test Friedman) está indicado.

Los datos de las variables morfológicas: altura de plantas, número, largo y ancho de hojas, se analizaron estadísticamente con el Test de Friedman α 0.05%.

El análisis estadístico de los datos de las variables citológicas: número de estomas por cm², tamaño del estoma y número de cloroplastos presentes en células oclusivas se realizó mediante el análisis de varianza (ANDEVA) seguido de la prueba de separación de medias de Tukey a un nivel de confianza del 95%.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Variables morfológicas

Stebbins (1971) señala como uno de los efectos inmediatos de la poliploidía en plantas el aumento en el tamaño y masa celular, esto no siempre origina un aumento en el tamaño total de la planta, pues usualmente se restringe a flores y semillas. Rees (1972) describe como otro efecto, la disminución de la velocidad de crecimiento como consecuencia de una mayor duración del ciclo celular, aunque esto no es universal pues algunas especies con distintos niveles de ploidía el ciclo no varía significativamente.

A los 35 días después de la exposición a la colchicina las plantas *in vitro* de los tratamientos testigo, 1 (6.25 mg l⁻¹) y 2 (12.50 mg l⁻¹), registraron alturas estadísticamente superiores al resto de tratamientos. Los tratamientos 1 y 2 a los 23 ddt continuaron siendo estadísticamente superiores, en cambio a los 53 ddt no hubo diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos en la variable altura (Cuadro 1).

Cuadro 1. Promedios y categorías estadísticas de altura evaluadas en tres fechas a plantas *in vitro* tratadas con colchicina.

Tratamientos	Concentración de colchicina (mg l ⁻¹)	Alturas de plantas (cm)		
		<i>In vitro</i> (dds)	Invernadero (ddt)	
		35	23	53
Testigo	0.00	3.7 ab	3.5 b	17.3 a
T1	6.25	4.9 a	3.7 a	19.5 a
T2	12.50	3.8 ab	4.1 a	15.7 a
T3	18.75	3.2 bc	1.5 cd	14.7 a
T4	25.00	1.5 c	1.3 d	11.7 a

Medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente entre sí, categorías estadísticas según prueba de Friedman ($\alpha = 0.05$).

Sánchez y Matos (2012) señalaron que en plantas de *Aloe vera* L tratadas con colchicina al 0.05% y 0.10% durante 48 horas se logró un incremento en la altura de plantas, longitud, ancho y espesor de las hojas y del volumen foliar tanto en plantas tratadas como en hijuelos de estas.

La Figura 2 refleja el aspecto de las plantas *in vitro* a los 35 días después de ser tratadas con colchicina, se observa las diferencias en crecimiento y altura, principalmente el tratamiento 4 (25.00 mg^l⁻¹ de colchicina) que manifestó un bajo desarrollo visible con respecto a los otros tratamientos.

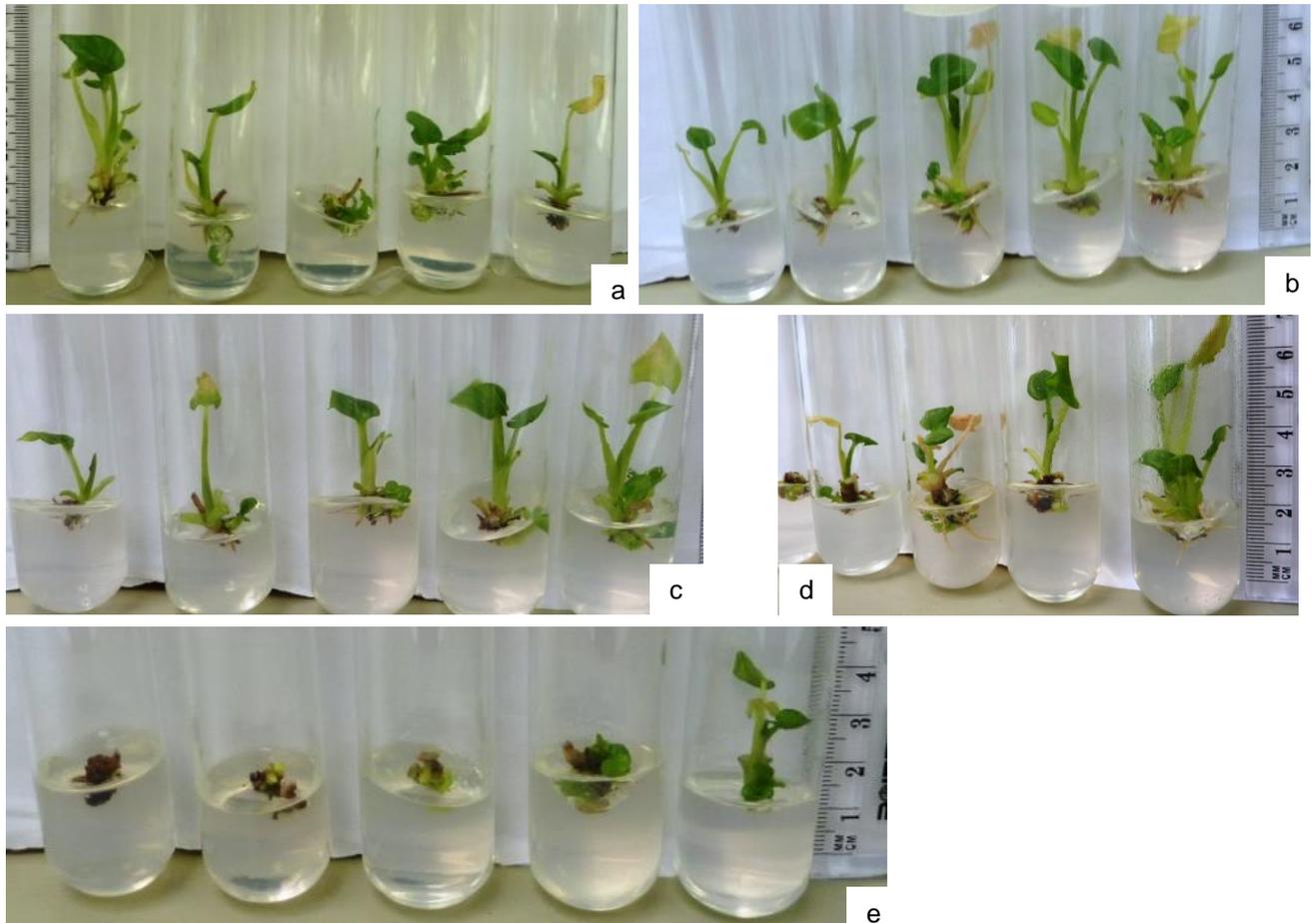


Figura 2. Aspecto de las plantas *in vitro* creciendo en medios de cultivo con las concentraciones: a = Testigo, b = 6.25, c = 12.50, d = 18.75, e = 25.00 mg^l⁻¹ de colchicina a los 35 dds.

Las concentraciones de colchicina no tuvieron influencias estadísticas significativas sobre el número de hojas en las evaluaciones realizadas en invernadero a los 23 y 53 ddt. A los 23 ddt las plantas testigo y de los tratamientos 1 (6.25 mg l⁻¹) y 2 (12.50 mg l⁻¹) resultaron estadísticamente superiores a los tratamientos 3 y 4 en ancho y largo de hojas. Las diferencias estadísticas que registraron los tratamientos a los 23 ddt en las variables morfológicas no persistieron a los 53 ddt, esto puede atribuirse a que la colchicina en las concentraciones o en el tiempo utilizado inducen cambios morfológicos temporales en las plantas y que la única variación entre los tratamientos es la velocidad inicial de crecimiento y no el tamaño final (Cuadro 2).

Cuadro 2. Promedios y categorías estadísticas de las variables número, largo y ancho de hojas de plantas *in vitro* tratadas a concentraciones de colchicina evaluadas en invernadero a los 23 y 53 ddt.

Tratamientos	Concentración de Colchicina (mg l ⁻¹)	Número de hojas		Largo de hojas (cm)		Ancho de hojas (cm)	
		23	53	23	53	23	53
Testigo	0.00	2 a	3 a	3.1 a	9.9 a	2.0 a	6.8 a
T1	6.25	2 a	3 a	2.9 a	9.9 a	1.8 a	7.8 a
T2	12.50	2 a	2 a	3.1 ab	9.6 a	2.2 a	7.6 a
T3	18.75	3 a	3 a	1.9 bc	8.1 a	1.2 bc	6.1 a
T4	25.00	3 a	3 a	1.0 c	5.0 a	0.7 c	5.0 a

Medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente entre sí, categorías estadísticas según prueba de Friedman ($\alpha = 0.05$).

En trabajos con *Aloe vera* L, Molero y Matos (2008) evaluaron y corroboraron la estabilidad de los efectos 4 meses después de la aplicación de colchicina (0.15% por 24 h a 35 °C), verificando en las plantas tratadas un incremento en los valores de las características morfológicas y que presentan mayor vigor. Según Imery y Cequea (2001) con un mayor tiempo de exposición a la colchicina las plantas alcanzan un mayor nivel de ploidía que se transmite en forma vegetativa, a diferencia de los tratamientos con tiempos de exposición cortos donde la probabilidad del efecto directo de la colchicina sobre las células meristemáticas se reduce debido a la poca acción en las capas superficiales y contacto con las células de la interfase en la que la colchicina no ejerce ninguna actividad antimitótica.

La Figura 3 ilustra las plantas por tratamiento a los 53 ddt las cuales no registraron diferencias estadísticas significativas.

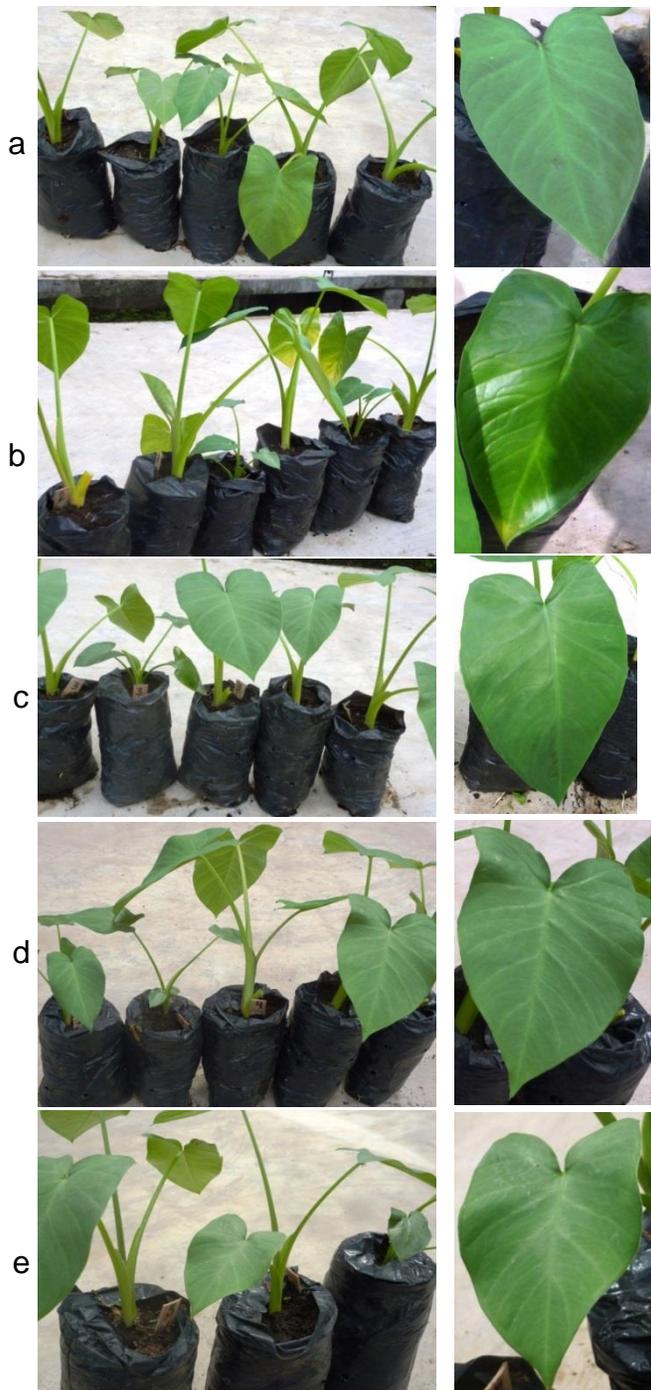


Figura 3. Plantas tratadas con las concentraciones de colchicina: a=Testigo, b=6.25, c=12.50, d=18.75, e=25.00 mg l^{-1} evaluadas a los 53 ddt .

La Figura 4 muestra el efecto de las concentraciones de colchicina sobre las variables morfológicas ancho y largo de hoja a los 23 ddt. Hubo una tendencia al aumento paralelo entre los valores de las variables y las concentraciones entre 6.25 y 12.50 mg l^{-1} de colchicina. Sin embargo, a concentraciones mayores a 12.50 mg l^{-1} el comportamiento es inverso; descendieron los valores de las variables conforme aumentaban las concentraciones de colchicina.

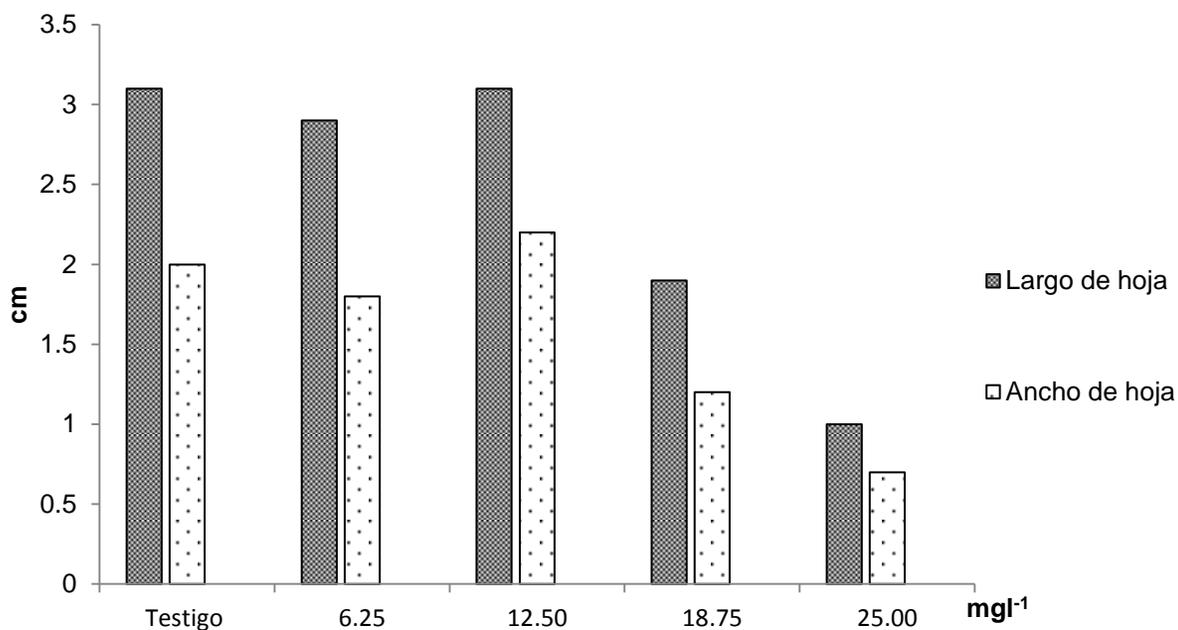


Figura 4. Efecto de las concentraciones de colchicina sobre el ancho y largo de hoja a los 23 ddt.

Rodríguez *et al.*, (1981) refieren que un aumento en los valores morfológicos está relacionado con un aumento favorable en el grado de ploidía. Sin embargo, las poliploidizaciones por encima del grado de $4n$ (tetraploides) no producen en muchos casos ningún resultado sino que conducen a retardamientos del crecimiento y del desarrollo. El grado óptimo de ploidía depende de la especie.

Existen estudios anteriores de Esnard *et al.*, (1993), Tambong *et al.*, (1998) y Doungous *et al.*, (2011) sobre el uso de colchicina como inductor de tetraploidía en *Xanthosoma sagittifolium* ($2n=26$). Sin embargo, estos no precisan datos de los efectos de la colchicina a diferentes concentraciones, tiempos y tipos de exposición, temperatura etc. sobre los caracteres morfológicos y citológicos, tampoco se encontró información previa de la especie utilizada en este estudio [*Xanthosoma violaceum* ($2n=24$)].

Esnard *et al.*, (1993) utilizaron concentraciones de 12.5, 25 y 50 mg l^{-1} de colchicina incorporados en el medio de cultivo durante 8 días, estos produjeron diploides ($2n=26$), tetraploides ($2n=52$) y aneuploides ($2n-2= 24$) respectivamente. Los diploides produjeron en promedio una hoja y 4 retoños más por planta que las tetraploides, mientras que la altura de plantas aumentó aproximadamente a la misma velocidad entre los tratamientos.

En cambio, Tambong *et al.*, (1998) utilizaron concentraciones de 1.25 mM (498 mg l^{-1}) y 2.5 mM (997.5 mg l^{-1}) de colchicina en un medio B5 durante 2, 4 y 8 días y manifestaron que el tiempo de exposición no afecta la duplicación cromosómica. Doungous *et al.*, (2011) utilizaron 0.05% de colchicina por 3 y 7 días, a los 3 días las plantas no exhibieron aumento en el número de cromosomas mientras que a los 7 días se produjeron 30% tetraploides y 60% mixoploides y que un aumento en la concentración de colchicina no indujo plantas tetraploides.

Para Ganapathi y kargi (1990) y Namdeo (2007), además de la concentración y el tiempo de exposición, hay otros factores exógenos como la etapa del cultivo y la temperatura que influyen en la efectividad de la colchicina. Al aumentar la temperatura se activa el trabajo del protoplasma lo que produce una elevación en la velocidad de crecimiento y en la tasa de división celular, producto de la aceleración de los procesos metabólicos en la planta. Tambong *et al.*, (1998) menciona como otro factor el tipo de exposición, cuando los tejidos meristemáticos están completamente sumergidos en un medio con colchicina el transporte a las células en división activa del meristemo es alta y consistente, a diferencia de otras plantas en el que el meristemo crece lejos del medio o en el suelo.

4.2 Variables citológicas

Una de las consecuencias más típicas de la poliploidización es el aumento del volumen de las células. Medidas comparativas del volumen de las células entre especies diploides y otras tratadas con colchicina se pueden realizar más fácilmente mediante las células epidérmicas, los estomas y los granos de polen. En muchos casos se presentan también cambios en el número de cloroplastos en los estomas, a consecuencia de la alteración del número de genomas, con lo cual el mayor grado de poliploidía produce también el mayor número de cloroplastos (Rodríguez *et al.*, 1981).

Las plantas sometidas a los tratamientos registraron diferencias estadísticas significativas en el número de estomas por cm², largo de estomas y número de cloroplastos en células oclusivas del estoma. El número de estomas por cm² registró 4 categorías estadísticas. Las plantas testigos mostraron mayor número de estomas pero estos fueron más cortos. Las plantas de los tratamientos 1 (6.25 mg l⁻¹) y 2 (12.50 mg l⁻¹) obtuvieron el menor número de estomas por cm² aunque más largos y presentaron una mayor cantidad de cloroplastos en las células oclusivas del estoma (Cuadro 3).

Cuadro 3. Promedios y categorías estadísticas de las variables citológicas evaluadas en plantas en invernadero a los 53 ddt.

Tratamientos	Concentración de Colchicina (mg l ⁻¹)	Promedios y categorías estadísticas		
		Número de estomas por cm ²	Largo estomas (μm)	Número de cloroplastos por estoma
Testigo	0.00	1009 a	19.90 c	14 b
T1	6.25	683 d	21.13 a	24 a
T2	12.50	686 d	20.75 ab	24 a
T3	18.75	729 c	20.49 b	14 b
T4	25.00	801 b	20.45 b	14 b

Medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente entre sí, según prueba de separación de medias Tuckey ($\alpha = 0.05$).

* $\mu\text{m} = 1 \times 10^{-4} \text{ cm}$

La Figura 5 ilustra el efecto de la colchicina sobre la cantidad de cloroplastos en las células oclusivas del estoma, la mayor concentración se registró en los tratamientos 2 y 3 (6.25 y 12.50 mg l^{-1}) (Ver también Anexo 4).

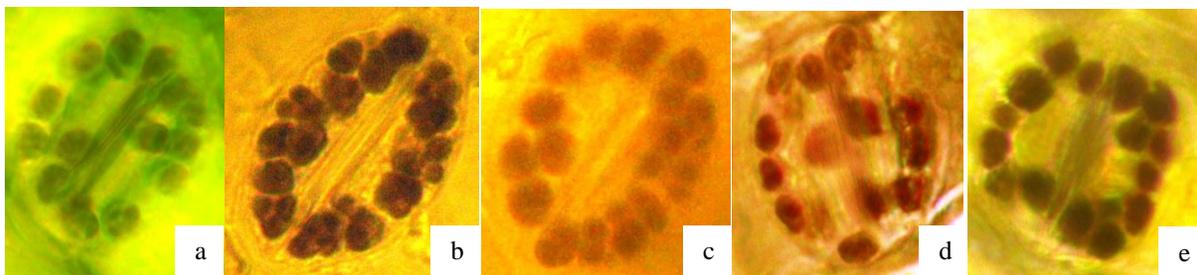


Figura 5. Cloroplastos en células oclusivas del estoma en hojas de plantas tratadas a las concentraciones a=Testigo, b=6.25, c=12.50, d=18.75, e=25.00 mg l^{-1} de colchicina evaluadas a los 53 ddt.

Las concentraciones de colchicina entre 6.25 y 12.50 mg l^{-1} (tratamiento 1 y 2) inducen una disminución en la cantidad de estomas por cm^2 y un aumento en el tamaño y número de estomas. Prevalece el comportamiento ocurrido en las variables morfológicas, utilizando concentraciones superiores a 12.50 mg l^{-1} de colchicina ocurre un comportamiento inverso. El largo de estomas tiene una relación inversamente proporcional con el número de estomas por cm^2 ; a mayor longitud del estoma menor concentración de ellos por cm^2 . En cambio, el largo de estomas y número de cloroplastos en células oclusivas presentan una relación directamente proporcional, a mayor longitud del estoma mayor número de cloroplastos en estos (Figura 6).

Los cloroplastos son los organelos donde se realiza el proceso de fotosíntesis, por tanto a mayor número de estos es probable que haya una mayor actividad fotosintética en la planta sintetizando mayor contenido de materia orgánica (Gordillo *et al.*, 2008). La disminución en la densidad estomática lleva a un incremento en la resistencia estomática, lo cual reduce la transpiración que puede ser una ventaja en ambientes áridos (Takur, 1990).

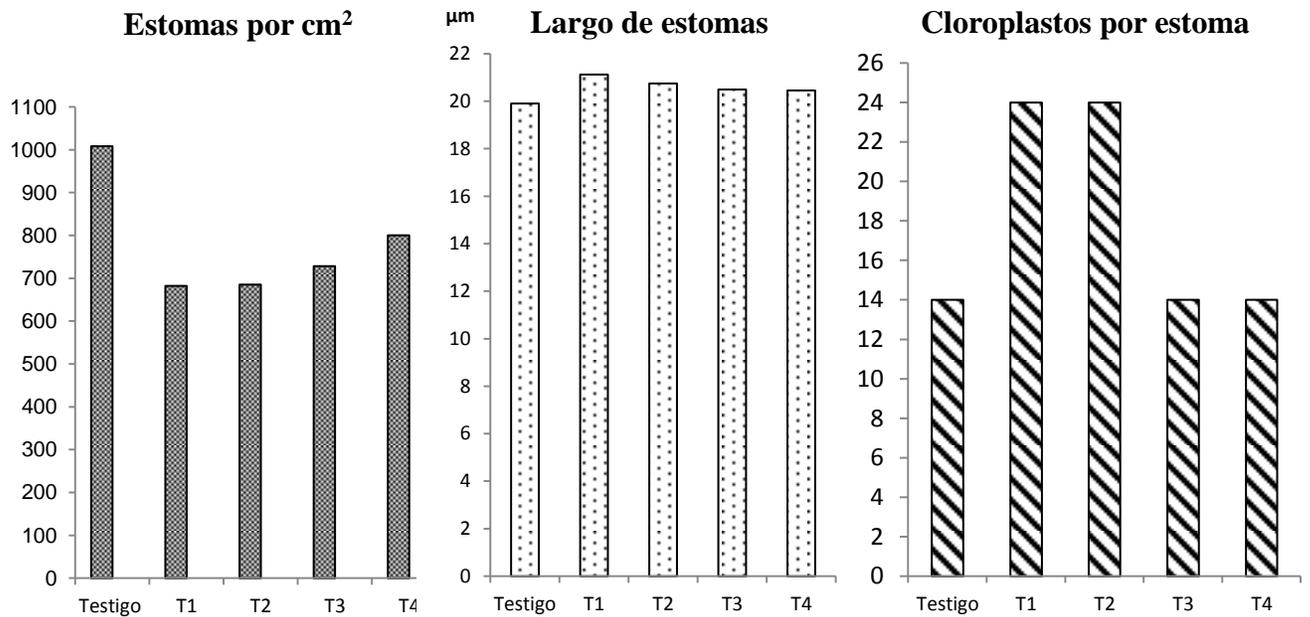


Figura 6. Número de estomas por cm², largo de estomas (μm) y número de cloroplastos por estoma en plantas expuestas a las concentraciones de colchicina.

Tambong *et al.*, (1998) observaron coeficientes de correlación positivos y significativos entre el número de cromosomas y el tamaño del estoma (las longitudes del poro y longitudes de las células oclusivas), que indica que los aumentos en estos parámetros pueden estar directamente relacionados con el aumento de la ploidía.

Standring *et al.*, (1990) plantean que usar las variaciones en el número de cloroplastos de las células oclusivas del estoma es una manera segura de predecir el nivel de ploidía en algunos diferentes géneros. Los cloroplastos pueden ser contados en cualquier tejido verde pero es preferible en las células oclusivas por su facilidad de preparación y medir bien su inherente falta de endopoliploidía en sus células. Las plantas diploides tienen estomas más densos y de diámetro más pequeño que las plantas tetraploides (Frandsen, 1967)

Existe poca información de las especies en que han sido utilizados los parámetros de conteo de estomas y cloroplastos como indicador de ploidía. Standring *et al.*, (1990) reportaron evaluaciones de este tipo en solanáceas (*Solanum muricatum*, *Solanum caripense*). Huamán (1995), reporta estudios de conteo de cloroplastos en células oclusivas de los estomas en *Solanum tuberosum*, mostrando una escala con el aumento paralelo entre el nivel de ploidía y el número de cloroplastos en células oclusivas (2n=7-8, 3n=9-11, 4n=12-14, 5n=15-16).

V. CONCLUSIONES

- El uso de colchicina indujo cambios morfológicos temporales en plantas a los 35 días después de la siembra *in vitro* y a los 23 días después del trasplante a invernadero. Las concentraciones de colchicina 18.75 y 25.00 mg l⁻¹ indujeron disminuciones en los valores de las variables morfológicas altura de planta, largo y ancho de hojas. Las plantas a los 53 después del trasplante a invernadero no registraron en las variables morfológicas diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos.
- Se verificó cambios citológicos en las plantas evaluadas a los 53 días después del trasplante a invernadero. Las concentraciones 6.25 y 12.50 mg l⁻¹ de colchicina promueven una disminución del número de estomas por cm² pero un aumento en el largo del estoma y en el número de cloroplastos en las células oclusivas.

VI. RECOMENDACIONES

- Incluir a próximos estudios de inducción de poliploidía con el objetivo de mejora genética del quequisque, el conteo de cromosomas y perfiles de citometría de flujo, para conocer el tipo de ploidía alcanzado con la exposición de las plantas a las concentraciones de colchicina obtenidas en este estudio.
- Evaluar en condiciones de campo las plantas generadas de los estudios (morfología y rendimiento) y su comportamiento con respecto a plagas y enfermedades.

VII. LITERATURA CITADA

- Astudillo Castillo, LD. 2005. Inducción de poliploidía en plantas del género *Leucocoryne* (en línea). Tesis Ing. Agr. Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. Quillota, CL. 52 p. Consultado 23 de Febrero 2015. Disponible en http://ucv.altavoz.net/prontus_unidacad/site/artic/20061206/asocfile/20061206142710/astudillo_luis.pdf
- Centro de Trámites de las Exportaciones (CETREX). 2013. Exportaciones autorizadas malanga y quequisque. Período 2007-2013. NI.
- Cordero, M. 1986. Origen, distribución y clasificación botánica de la Yautía. La Herradura. Santiago de los Caballeros, DO. 90 p.
- Dewey, DR. 1979. Some applications and misapplications of induced polyploidy to plant breeding. Polyploidy. Ed. Lewis WH. New York, US. Plenum Press. p 445-470.
- Doungous, Oumar; Eyango Sama, Anne; Adiobo, Amayana; Zok, Simon. 2011. Determination of ploidy level by flow cytometry and autopolyploid induction in cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) (en línea). African Journal of Biotechnology 10(73): 16491-16494. Consultado 23 de Febrero 2015. Disponible en <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/97682/86987>
- Esnard, J; Ferwerda, F; Rivera Amador, E; Hepperly, P.R. 1993. Induction of tetraploidy in the tanager cultivar 'Inglesa' (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). Plant Breeding 111(4): 335-338
- Frandsen, N.O. 1967. Haploidproduktion aus einem kartoffelzuchtmaterial mit intensiver wildareingrenzung. Max-Planck- Institut für züchtungsforschung. Köln-Vogelsang. Berlin. Springer-Verlag. Genetica Breeding Research 37(3): 120-134.

- Ganapathi, B; Kargi, F. 1990. Recent advances in indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* (Periwinkle). *Journal of Experimental Botany* 41(3): 259–267.
- García, M. 1990. Generalidades sobre el cultivo de la malanga *Xanthosoma*. Villa Clara, CU. INIVIT. 6 p.
- Gordillo Delgado, F. Zárate Rincon, F. Mejia Morales, C. Rivera Puentes, L. Ariza Calderón, H. 2008. *Revista Colombiana de Física*. 40(1):186-189.
- Hassawi, SD; Liang, GH. 1991. Antimitotic Agents: Effects of doubled haploid production in wheat. *Crop Science* 31(3): 723–726.
- Huamán, Z. 1995. Técnicas citológicas para determinar el número cromosómico y la fertilidad de las papas (en línea). Centro internacional de la papa (CIP). Lima, PE. 18 p. (Guía de investigación 10). Consultado 23 de Febrero 2015. Disponible en <http://cipotato.org/wp-content/uploads/publication%20files/research%20guides/ResGuide47719.pdf>
- Imery, J; Cequea H. 2001. Colchicine-induced autotetraploid in *Aloe vera* L (en línea). *Cytologia* 66(4) 409-413. Consultado 23 de Febrero 2015. Disponible en <http://joseimerypublicacion1.blogspot.com/2008/08/colchicine-induced-autotetraploid-in.html>
- Mathias, R; Röbbelen G. 1991. Effective diploidization of microspore-derived haploids of rape (*Brassica napus* L.) by in vitro colchicine treatment. *Plant Breeding* 106: 82–84.
- Mayo, SJ; Bogner, J; Boyce, PC. 1997. The genera of Araceae (en línea). London, GB. Royal Botanic Garden, Kew. Consultado 23 de Febrero 2015. Disponible en <http://cate-araceae.myspecies.info/sites/cate-araceae.myspecies.info/files/Mayo%20et%20al%201997%20ARACEAE.pdf>

- Molero Paredes, T; Matos Acurero, A. 2008. Efectos de la inducción artificial de la poliploidía en plantas de *Aloe vera* (L.) (en línea). Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas 42 (1): 111–133. Consultado 23 de Febrero 2015. Disponible en <http://produccioncientificaluz.org/index.php/boletin/article/viewFile/112/112>
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 15:473-497.
- Namdeo, AG. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A Review (en línea). *Pharmacognosy Reviews* 1(1): 69–79. Consultado 23 de Febrero 2015. Disponible en http://download.bioon.com.cn/upload/month_0905/20090515_90c8232e42612b53e82fZszPlSsmvj5H.attach.pdf
- 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.
- Rees, H. 1972. DNA in higher plants. *Brookhaven symposia in biology*. 23:394-418
- Reyes Castro, G.; Corea Narváez, HG; Guatemala Ortega, TV. 2013. Guía del manejo agronómico del quequisque en Nicaragua. Managua, NI. Propemce . 24 p.
- Reyes Castro, G; Saavedra Montano, D. 2012. Prospección tecnológica para el manejo de mal seco en quequisque (en línea). Managua, NI. Consultado 23 de Febrero 2015. Disponible en <http://www.renida.net.ni/renida/funica/REH01-SA112.pdf>
- Rodríguez Fuentes, C; Perez Ponce, J; Fuchs, A. 1981. *Genética y mejoramiento de las plantas*. La Habana, CU. Ed. Pueblo y educación. 442 p.

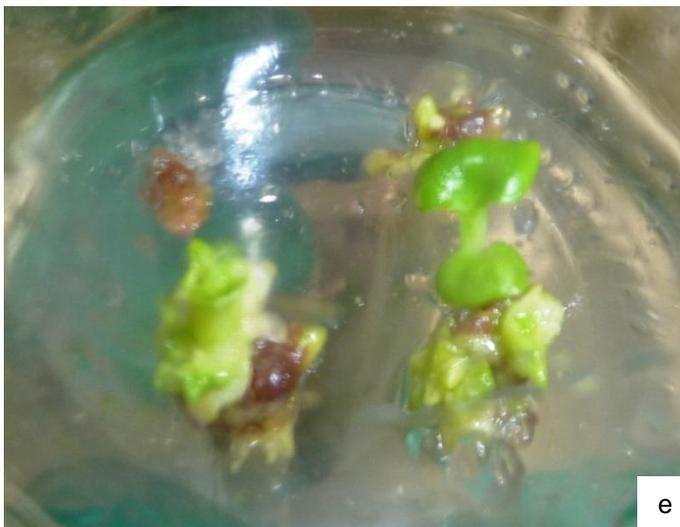
- Sánchez, A; Matos Acurero, A. 2012. Efectos del uso de la colchicina como inductor de poliploidía en plantas de zábila (*Aloe vera* L.) *in vivo* (en línea). Revista de la universidad del Zulia 3(6): 119-139 Consultado 23 de Febrero 2015. Disponible en <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/12685-13004-1-PB.pdf>
- Sotomayor Ríos, A; Schertz K.F; Rivera Amador, E. 1989. Chromosome number and cytological observations of selected *Xanthosomas* and their possible importance in breeding for dry root-rot resistance. Proceedings Caribbean Food Crops Society. 25th meeting. Pointe-à-Pitre, GP. 25: 630-639
- Standring, LS; Pringle, GJ; Murray, BG. 1990. The control of chloroplast number in *solanum muricatum* Ait. and *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. and its value as an indicator of poliploidy (en línea). Euphytica 47: 71-77. Consultado 23 de Febrero 2015. Disponible en <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00040366>
- Stebbins, GL. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. London, GB. Ed. Edward Arnold Ltda. 216p
- Takur, P. 1990. Different physiological response of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) cultivars to drought. Acta Physiologiae Plantarum 12: 175-182.
- Tambong, JT; Sapra, VT; Garton, S. 1998. *In vitro* induction of tetraploids in colchicine-treated cocoyam plantlets (en línea). Euphytica 104: 191–197. Consultado 23 de Febrero 2015. Disponible en <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1018609020397>

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Composición del medio nutritivo Murashige y Skoog (MS, 1962).

Macroelementos	mg l⁻¹
NH ₄ NO ₃	1,650.00
KNO ₃	1,900.00
CaCl ₂ .2H ₂ O	440.00
MgSO ₄ .7H ₂ O	370.00
KH ₂ PO ₄	170.00
Microelementos	mg l⁻¹
MnSO ₄ . H ₂ O	22.30
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8.60
H ₃ BO ₃	6.20
KI	0.83
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.02
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.02
Vitaminas	mg l⁻¹
Tiamina HCl	0.10
Myo-inositol	100.00
Azúcar	g l⁻¹
Sacarosa	30.00

Anexo 2. Plantas *in vitro* de quequisque tratadas con las concentraciones a=Testigo, b=6.25, c=12.5, d=18.75, e=25 mg^l⁻¹ de colchicina en un medio MS + 0.5 mg^l⁻¹ para inducir enraizamiento.



Anexo 3. Plantas en invernadero a los 15 días después del trasplante tratadas *in vitro* a las concentraciones a=Testigo, b=6.25, c=12.5, d=18.75, e=25 mg^l⁻¹ de colchicina



Anexo 4. Cloroplastos en células oclusivas del estoma de plantas tratadas *in vitro* a las concentraciones a=Testigo, b=6.25, c=12.5, d=18.75, e=25 mg^l⁻¹ de colchicina evaluadas a los 53 ddt.

