



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE AGROBOLOGÍA
“PRESIDENTE JUÁREZ”

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ÁREA TEMÁTICA DE FISIOLOGÍA Y GENÉTICA VEGETAL

INDUCCIÓN DE POLIPLOIDÍA EN *Sprekelia formosissima* Herbert

TESIS

Que presenta:

SOFÍA PAULINA HERRERA RANGEL

Para obtener el grado de:
MAESTRA EN CIENCIAS

Directora de tesis:

DRA. MARTHA ELENA PEDRAZA SANTOS

Mayo, 2020. Uruapan, Michoacán



AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su apoyo en la realización de este trabajo de tesis.

A mi asesora de tesis la **Dra. Martha E. Pedraza Santos** por su apoyo en mi trabajo, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, gracias por todas las atenciones brindadas, por compartir su conocimiento académico, mostrarme una visión diferente en el ámbito profesional amando lo que haces y por infundir hábitos en mí que me serán útiles a lo largo de la vida.

A mis asesores la **Dra. Blanca Lara Chávez**, el **Dr. Nicolás Gutiérrez Rangel**, el **Dr. Luciano Morales García**, el **Dr. Isaac Reyes Vera** por siempre estar presente, por sus consejos y atenciones para que este trabajo fuera posible. Siempre es una alegría compartir el tiempo y aprender de ustedes.

A mis buenos amigos **M.C Juan Manuel Gómez**, **Dr. Ulices Santos-Pérez** y **Selene Hernández Muñóz** por apoyarme de manera experimental, dudas metodológicas, revisiones y consejos. Gracias por enseñarme tanto.

A todos los amigos que hice en este tiempo **Ismael, Aurelio, Mary, Paula, Agustín, Churape, Azura, Jair, Pabito, Ivanna, Denni, Salud, Fercho, Vale, Lupita, Yess, Juanita, Adriana, Noel y Joel** gracias por su apoyo, conocimiento, gracias por compartir tantas alegrías, nunca dejen de sorprenderse al experimentar y no pierdan este amor por la vida.

A mis amigos de maestría en especial a **Blanca** por compartir clases, historias, por su ayuda en todo momento. A **Valentín** por su gran amistad y apoyo con el material biológico.

A las personas que siempre me acompañan a cada paso que doy, me alegra coincidir y compartir mi vida con ustedes.

DEDICATORIAS

A lo más importante de mi vida a mi familia.

*A mi **madre** Alejandra.*

*A mi **padre** Luis.*

*A mis **hermanas** Bárbara, Ángeles y Corina.*

INDICE GENERAL

CONTENIDO	Página
INDICE GENERAL.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE CUADROS.....	x
ÍNDICE DE CUADROS DEL APENDICE.....	xi
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
CAPÍTULO I.....	3
I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
CAPÍTULO II.....	6
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
2.1 <i>Sprekelia formosissima</i> con potencial comercial.....	6
2.2 Características de <i>Sprekelia formosissima</i>	7
2.3 Clasificación botánica.....	8
2.4 Propagación <i>in vitro</i> de <i>Sprekelia formosissima</i>	8
2.5 Agentes mutágenicos.....	8
2.6 Poliploidía.....	9
2.7 Inducción de poliploidía <i>in vitro</i> por medio de agentes químicos en plantas de ornato.....	11
2.8 Inducción de poliploidía <i>in vivo</i> por medio de agentes químicos en plantas de ornato.....	12

CONTENIDO	Página
2.9 Ploidía en <i>Sprekelia formosissima</i>	13
2.10 Métodos de detección de poliploides.....	14
2.11 Efecto de la solución nutritiva y tidiázuron sobre el desarrollo de plantas...	15
CAPÍTULO III.....	17
III. Inducción de poliploidía en <i>Sprekelia formosissima</i>	17
RESUMEN.....	17
3.1 INTRODUCCIÓN.....	19
3.1.1 Objetivos.....	20
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.2.1 Origen del material vegetal.....	22
3.2.2 Inducción de poliploidía <i>in vitro</i>	22
3.2.2.1 Desinfección de semillas.....	22
3.2.2.2 Exposición de semillas al agente antimitótico.....	23
3.2.3 Inducción de poliploidía <i>in vivo</i>	25
3.2.3.1 Germinación de semillas.....	25
3.2.3.2 Exposición de plántulas al agente antimitótico.....	25
3.2.3.3 Germinación en semillas de <i>Sprekelia formosissima</i> almacenadas...	27
3.2.3.4 Determinación de la viabilidad en semillas de <i>Sprekelia formosissima</i>	27
3.3 RESULTADOS.....	29
3.3.1 Presencia de <i>S. formosissima</i> en los sitios de colecta de material vegetal.....	29

CONTENIDO	Página
3.3.2 Inducción de poliploidía <i>in vitro</i>	30
3.3.2.1 Desinfección de semillas.....	30
3.3.2.2 Efectos de la aplicación de colchicina en semillas de <i>S. formosissima</i>	31
3.3.3 Inducción de poliploidía <i>in vivo</i>	35
3.3.3.1 Germinación de semillas.....	35
3.3.3.2 Exposición de plántulas al agente antimitótico.....	35
3.3.4 Determinación de la germinación en semillas almacenadas <i>Sprekelia formosissima</i>	39
3.3.5 Determinación de la viabilidad en semillas de <i>Sprekelia formosissima</i> ...	40
3.4 DISCUSIÓN.....	41
3.5 CONCLUSIONES.....	46
3.6 BIBLIOGRAFÍA.....	47
CAPÍTULO IV.....	52
IV. Soluciones nutritivas y citocininas para el desarrollo de plantas de <i>Sprekelia formosissima</i>	52
RESUMEN.....	52
4.1 INTRODUCCIÓN.....	53
4.1.1 Objetivos.....	54
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
4.2.1 Influencia de la solución nutritiva y tiazuron sobre el desarrollo de plantas de <i>Sprekelia formosissima</i>	55

CONTENIDO	Página
4.2.2 Efecto de tiazuron en cortes de <i>Sprekelia formosissima</i> en invernadero.	56
4.2.3 Análisis estadístico.....	57
4.3 RESULTADOS.....	58
4.3.1 Efecto de la solución nutritiva y tiazuron sobre el desarrollo de plantas de <i>Sprekelia formosissima</i>	58
4.3.2 Efecto del tiazuron en tipos de cortes de bulbos de <i>Sprekelia formosissima</i> en invernadero.....	60
4.4 DISCUSIÓN.....	63
4.5 CONCLUSIONES.....	66
4.6 BIBLIOGRAFÍA.....	67
CAPÍTULO V.....	71
V. DISCUSIÓN GENERAL.....	71
CAPÍTULO VI.....	74
VI. CONCLUSIÓN GENERAL.....	74
CAPÍTULO VII.....	75
VII BIBLIOGRAFÍA GENERAL.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras	Página
1	Establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Sprekelia formosissima</i> . A) Desinfección de las semillas con hipoclorito de sodio. B) Eliminación de la testa. C y D) Siembra de semillas en medio Murashige y Skoog..... 23
2	Semillas <i>Sprekelia formosissima</i> expuestas a colchicina. A) Semillas tratadas con diferentes dosis de colchicina. B) Eliminación de la testa antes de su cultivo..... 24
3	Aspectos de la inducción de ploidía en plántulas de <i>Sprelekia formosissima</i> . A) Inmersión de raíces y bulbos en colchicina B) Cultivo de plántulas en turba Sphagnum..... 26
4	Semillas de <i>Sprekelia formosissima</i> sometidas a la prueba de 2, 3, 5 trifeniltetrazolio. v: viable, nv: no viable, pv: potencialmente viable... 28
5	<i>Sprekelia formosissima</i> recolecta en campo: A) Brote; B) Flor madura; C) Flor con variación de color; D) Estructuras sexuales; E) Polinización; F) Fruto inmaduro; G) Fruto maduro; H) Semillas; I) Población de <i>Sprekelia formosissima</i> 29
6	Contaminación en semillas de <i>Sprekelia formosissima</i> desinfestadas con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio..... 30
7	contaminación de semillas de <i>Sprekelia formosissima in vitro</i> . A) semillas libres de agentes contaminantes. B) Estructuras del hongo <i>Dichobotrys</i> sp. c: conidia, m: micelio y cf: conidióforos..... 31
8	Germinación de semillas de <i>Sprekelia formosissima</i> expuestas a colchicina. A) 12, 24 y 48 h. B) 2, 4 y 8 h..... 32

Figuras		Página
9	Altura de plántulas de <i>Sprekelia formosissima</i> generadas de semillas expuestas a colchicina. A) Primer ensayo. B) Segundo ensayo.	34
10	Plántulas de <i>Sprekelia formosissima</i> . A) Plántula generada de una semilla expuesta a colchicina. B) Plántula generada a partir de una semilla no tratada.....	34
11	Germinación de semillas de <i>Sprekelia formosissima</i> en invernadero. A) Semillas recién cosechadas. B) Plántulas cultivadas en charolas....	35
12	Plántulas de <i>Sprekelia formosissima</i> . A) Amarillamiento y pérdida de hojas posterior al tratamiento con colchicina. B) Brotación de hojas siete meses después de la aplicación de colchicina.....	36
13	Supervivencia y altura de plántulas de <i>Sprekelia formosissima</i> tratadas con colchicina. A y B) Influencia del tiempo y concentración de inmersión en la supervivencia. C y D) Influencia del tiempo y concentración en la altura de plántulas.....	37
14	Efecto de la colchicina en el tamaño de estomas en hojas de <i>Sprekelia formosissima</i> . A) Largo de estomas y B) Ancho de estomas.....	38
15	Estomas de <i>Sprekelia formosissima</i> A) Tratamiento 6 h sin colchicina y B) Tratamiento 24 h 0.2 %.....	39
16	Plántulas de <i>Sprekelia formosissima</i> . A) Plántula generada de una semilla expuesta a colchicina 0.2 % durante 12 h. B) Plántula generada a partir de una semilla no tratada.....	39
17	Germinación <i>in vitro</i> de las semillas almacenadas de <i>Sprekelia formosissima</i>	40
18	Viabilidad de semillas de <i>Sprekelia formosissima</i> almacenadas después de la recolecta. A) Semilla viables, B) Semillas no viables y C) Semillas potencialmente viables.....	40
19	Bulbos de <i>Sprekelia formosissima</i> A) Corte de bulbos B) Forma de cortes 1) bulbos completos 2) corte transversal 3) corte longitudinal y 4) corte longitudinal-transversal.....	56

20	Efecto de la solución Steiner y TDZ. A) Verdor (Lectura SPAD). B) Ancho de hojas en plantas de <i>Sprekelia formosissima</i>	59
21	Efecto en el número de brotes de <i>Sprekelia formosissima</i> A) Tipo de corte y B) Concentración de TDZ	61
22	<i>Sprekelia formosissima</i> . A-D) Diferentes tipos de cortes sin TDZ. E-H) Diferentes tipos de cortes con TDZ. bi: bulbo inicial, hbi: hoja bulbo inicial, si: sección inicial, hsi: hoja sección inicial, bn: bulbo nuevo, hbn: hoja bulbo nuevo, db: disco basal, mpb: mayor producción de bulbos.....	61
23	Número de hojas en secciones de bulbo de <i>Sprekelia formosissima</i> . A) Efecto del tipo de corte y B) Efecto de la dosis de TDZ.	62
24	Número de hojas en secciones de bulbo de <i>Sprekelia formosissima</i> . Efecto del TDZ en el tamaño de raíz de <i>Sprekelia formosissima</i>	62

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Cuadros medios del análisis de varianza para el efecto de la dosis y tiempo de exposición de colchicina en la germinación <i>in vitro</i> de <i>Sprekelia formosissima</i>	31
2	Cuadros medios del análisis de varianza para el efecto de la exposición a colchicina en la altura de plántulas de <i>Sprekelia formosissima</i>	33
3	Cuadros medios del análisis de varianza para el efecto de la exposición en colchicina en la supervivencia y altura de plántulas de <i>Sprekelia formosissima</i>	36
4	Cuadros medios del análisis de varianza para el efecto de la exposición de colchicina en el tamaño de estomas de plántulas de <i>Sprekelia formosissima</i>	38
5	Fertilizantes comerciales usados para preparar la solución nutritiva Steiner a diferentes concentraciones de sales totales.....	55
6	Cuadros medios del análisis de varianza para el efecto de la solución Steiner y TDZ en el verdor de <i>Sprekelia formosissima</i>	58
7	Cuadros medios del análisis de varianza para el efecto de tipo de corte y dosis de TDZ en la generación de nuevos brotes y diámetro de nuevos bulbos, número de hoja y tamaño de raíz en <i>Sprekelia formosissima</i>	60

ÍNDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE

Cuadro		Página
1A	Análisis de varianza para evaluar el efecto de la concentración de hipoclorito de sodio en la desinfección de semillas de <i>Sprekelia formosissima</i> germinadas <i>in vitro</i>	86
2A	Análisis de varianza para evaluar el efecto de la dosis y tiempo (12, 24 y 48 h) de exposición en la germinación de <i>Sprekelia formosissima</i> germinadas <i>in vitro</i>	86
3A	Análisis de varianza para evaluar el efecto de la dosis y tiempo (2, 4 y 8 h) de exposición en la germinación de <i>Sprekelia formosissima</i> germinadas <i>in vitro</i>	86
4A	Análisis de varianza para evaluar el efecto de la exposición a colchicina (12, 24 y 48) en la altura de plántulas de <i>Sprekelia formosissima</i> germinadas <i>in vitro</i>	87
5A	Análisis de varianza para evaluar el efecto de la exposición a colchicina (2, 4 y 8) en la altura de plántulas de <i>Sprekelia formosissima</i> germinadas <i>in vitro</i>	87
6A	Análisis de varianza para el efecto de la exposición en colchicina en la supervivencia de <i>Sprekelia formosissima</i> en invernadero...	87
7A	Análisis de varianza para el efecto de la exposición en colchicina en la altura de plántulas de <i>Sprekelia formosissima</i> en invernadero.....	88
8A	Análisis de varianza para el efecto de la exposición de colchicina en el ancho de estomas de plántulas de <i>Sprekelia formosissima</i>	88

Cuadro		Página
9A	Análisis de varianza para el efecto de la exposición de colchicina en el largo de estomas de plántulas de <i>Sprekelia formosissima</i> ...	88
10A	Análisis de varianza para evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento en la germinación de semillas de <i>Sprekelia formosissimas</i> germinadas <i>in vitro</i>	89
11A	Análisis de varianza para evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento en semillas viabiles de <i>Sprekelia formosissimas</i> germinadas <i>in vitro</i>	89
12A	Análisis de varianza para evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento en semillas no viabiles de <i>Sprekelia formosissimas</i> germinadas <i>in vitro</i>	89
13A	Análisis de varianza para evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento en semillas potencialmente viabiles de <i>Sprekelia formosissimas</i> germinadas <i>in vitro</i>	90
14A	Análisis de varianza para el efecto de la solución Steiner y TDZ en el verdor de hojas de <i>Sprekelia formosissima</i>	90
15A	Análisis de varianza para el efecto de la solución Steiner y TDZ en el ancho de hojas de <i>Sprekelia formosissima</i>	90
16A	Análisis de varianza para el efecto de tipo de corte y dosis de TDZ en la generación de nuevos brotes de <i>Sprekelia formosissima</i>	91

17A	Análisis de varianza para el efecto de tipo de corte y dosis de TDZ en el diámetro de nuevos brotes de <i>Sprekelia formosissima</i>	91
18A	Análisis de varianza para el efecto de tipo de corte y dosis de TDZ en la generación de hojas en bulbos nuevos de <i>Sprekelia formosissima</i>	91
19A	Análisis de varianza para el efecto del tipo de corte y TDZ en el tamaño de raíces en bulbos de <i>Sprekelia formosissima</i>	92

RESUMEN

En México, muchas especies nativas cumplen requisitos imprescindibles en la selección de plantas de ornato. Un ejemplo es *Sprekelia formosissima*, planta nativa con estructura floral típica de monocotiledónea sus pétalos y sépalos se ordenada en múltiplos de tres, formando una hermosa flor roja. La obtención de variedades de *S. formosissima* se podrían lograr por medio de inducción de poliploides. En este estudio se evaluó la desinfección de las semillas de *S. formosissima* para su cultivo *in vitro*, se obtuvieron semillas libres de contaminación con 30 y 35 % de hipoclorito de sodio. Una vez desarrollado este protocolo se realizó un experimento para evaluar los cambios morfogénicos de las plántulas obtenidas de semillas de *S. formosissima* expuestas a colchicina (0, 0.1, 0.2 y 0.3 %) durante 12, 24 y 48 horas y un segundo experimento con las mismas concentraciones y una reducción de 2, 4 y 8 horas. De acuerdo al elevado porcentaje de mortalidad en el primer experimento y a los cambios presentes en el tamaño de las plantas del segundo experimento la mejor dosis para la producir cambios morfológicos en las plántulas *in vitro* fue 0.3 % con un tiempo de exposición de 2 horas. En invernadero se sumergieron bulbillos de plántulas de *S. formosissima* en colchicina en concentraciones de 0.1 y 0.2 % durante 6, 12, 24 y 48 h. Los cambios en la reducción en tamaños de plantas y aumento en el tamaño de los estomas indican que la dosis 0.2 % y tiempo de 24 horas son las eficiente para producir cambios morfológicos en plántulas *in vivo*. Para conocer los requerimientos de esta planta se evaluó la respuesta de plantas adultas a diferentes concentraciones de solución nutritiva (0, 25, 50, 75 y 100 %) en combinación con tiazurón (TDZ) (0, 0.25 y 0.5 mg L⁻¹).

Palabras clave: Desinfección, semillas, *in vitro*, *in vivo*, bulbos, solución nutritiva, TDZ.

ABSTRACT

In Mexico many native species fulfill essential requirements in the selection of ornamental plants. An example is *Sprekelia formosissima*, a native plant with a typical monocot floral structure, its petals and sepals arranged in multiples of three, forming a beautiful red flower. Obtaining varieties of *S. formosissima* could be achieved by induction of polyploids. In this study, the disinfection of *S. formosissima* seeds for in vitro cultivation was evaluated. Seeds free of contamination were obtained with 30 and 35 % sodium hypochlorite. Once this protocol was developed, an experiment was carried out to evaluate the morphogenic changes of the seedlings obtained from *S. formosissima* seeds exposed to colchicine (0.1, 0.2 and 0.3) for 12, 24 and 48 hours and a second experiment with the same concentrations and a reduction of 2, 4 and 8 hours. According to the high mortality rate in the first experiment and the changes in the size of the plants of the second experiment, the best to produce morphological changes in the seedlings *in vitro* was 0.3 % with an exposure time of 2 hours. In the greenhouse, bulbs of *S. formosissima* seedlings were immersed in colchicine in concentrations of 0.1 and 0.2 % for 6, 12, 24 and 48 h. The changes in the reduction in plant sizes and increase in stomatal size indicate that the 0.2 % dose and 24 hour time are the efficient ones to produce morphological changes in seedlings *in vivo*. To know the requirements of this plant, the response of adult plants to different concentrations of nutritive solution (0, 25, 50, 75 and 100 %) in combination with tidiazuron (TDZ) (0, 0.25 and 0.5 mg L⁻¹) was evaluated.

CAPÍTULO 1

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Sprekelia formosissima Herbert. conocida comúnmente como “pata de gallo”, “lirio azteca”, “azcal xochitl” y “mayito” entre otros nombres, es una de las plantas silvestres más bellas de México. La especie pertenece a la familia Amaryllidaceae, posee flores zigomórficas, de gran tamaño (13 cm) y de coloración rojo escarlata. Estas características le confieren un gran potencial para usarse en paisajismo, como planta ornamental, flor de corte o flor en maceta (Bautista-Puga *et al.*, 2011; Rzedowski y Rzedowski, 2005).

En México las plantas de *S. formosissima* se extraen de su hábitat y se comercializan ilegalmente para uso medicinal o para su cultivo en jardines. Estas prácticas son perjudiciales porque se destruyen y pierden numerosos genotipos.

La generación y distribución de variedades comerciales puede disminuir la recolecta de plantas silvestres, aumentar el valor y la aceptación de esta especie en el mercado nacional y constituir una ventaja económica en el mercado de exportación (Hernández-Muñoz *et al.*, 2016). En países europeos como España e Inglaterra, existen empresas que comercializan material vegetativo de *S. formosissima* durante todo el año (Vázquez-García *et al.*, 1998). En México esta especie no se produce a nivel comercial por la falta de variedades estables y homogéneas.

La obtención de variedades de *S. formosissima* puede efectuarse por los métodos de selección, hibridación y mutagénesis. La inducción de mutaciones se logra al someter tejidos a la radiación o aplicarles productos químicos que propicien variaciones genéticas, de las cuales puedan seleccionarse materiales con las características deseadas (Novak y Brunner, 1992). Las mutaciones causan cambios en la estructura del ADN (deleciones, inversiones y translocaciones) o en el número de cromosomas (ploidía) y pueden ocurrir de forma natural y/o artificial (Gutiérrez-Mora *et al.*, 2003).

La poliploidía se induce al exponer a las células y tejidos vegetales al efecto de agentes antimitóticos como la colchicina, para incrementar el tamaño del genoma causado por la

presencia de tres o más juegos de cromosomas dentro de las células somáticas de un organismo (Alcántar, 2014).

La colchicina ha sido utilizada desde 1937 para la duplicación de cromosomas (Geoffriau *et al.*, 1997). En algunas especies, la colchicina puede causar efectos secundarios como esterilidad o crecimiento anormal, o puede inducir la formación de quimeras debido a las divisiones asincrónicas de las células (Wan *et al.*, 1989).

Es común el uso de estas sustancias para detener la metafase, ya que interfiere con la estructura de las fibras del huso mitótico, se une a la tubulina de los microtúbulos e inhibe su formación, lo que provoca que no se desplacen los cromosomas hacia los polos. Como consecuencia, se origina una célula con número de cromosomas doble, esto provoca cambios morfológicos en las especies (Hadlaczky *et al.*, 1983).

Cuando se presentan cambios morfológicos debido a la aplicación de agentes mutagénicos en alguna especie, es importante propagarla masivamente para establecer un banco de germoplasma que pueda satisfacer las demandas del mercado (Fernández *et al.*, 2018).

La reproducción asexual es la más indicada para este fin, debido a la fidelidad genética que brinda, además de ser la única vía de reproducción de algunos poliploides infértiles (Vallejo-Marin, 2014).

En México no se han realizado trabajos que utilicen herramientas biotecnológicas en la reproducción y obtención de variedades de *S. formosissima* a partir de genotipos silvestres, para incrementar la probabilidad de obtener mejores características de interés hortícola como color, forma y tamaño de la flor; como tampoco se cuenta con información suficiente para el manejo agronómico de la especie.

Con base en lo anterior, el objetivo de la presente investigación es inducir poliploidía *in vivo* e *in vitro* en *S. formosissima* y desarrollar innovaciones para el manejo agronómico de la especie.

Finalmente, esta tesis se desarrolló por capítulos, en el capítulo I “Introducción general” se hablan de la importancia de la obtención de variedades de *S. formosissima* y del porqué al realizar experimentos de inducción de poliploidía se deben conocer los métodos de reproducción asexual; en el capítulo II “ Revisión general” se exponen aspectos generales de la planta; en el capítulo III “Inducción de poliploidía en *S. formosissima*” se aborda el tema central de la tesis, se muestran experimentos *in vitro* e *in vivo* que indican las mejores dosis y tiempos de exposición a los agentes antimitóticos; En el capítulo IV “Soluciones nutritivas y citocininas para el desarrollo de plantas de *S. formosissima*” se tratan aspectos del manejo agronomico indicando cuales son las mejores dosis de Soluciones Nutritivas en combinación de TDZ para el mejor desarrollo de *S. formosissima*, también se muestran experimentos de reproducción asexual por medio de cortes en bulbos. Estos experimentos se realizaron con la finalidad de obtener mayor cantidad de material biológico al momento de obtener una variedad; en el capítulo V “Discusión general” se discuten los resultados obtenidos en la investigación; en el capítulo VI “Conclusión general” se hace énfasis en los puntos más importantes encontrados en el desarrollo del trabajo; en el Capítulo VII “Bibliografía” se encuentra la bibliografía consultada.

CAPÍTULO II

II. REVISIÓN DE LITERATURA GENERAL

México es un país privilegiado en cuanto a la variedad de ecosistemas y variación genética de especies (Luna *et al.*, 2011), ocupa el tercer lugar en cuanto al número de plantas vasculares y posee uno de los mayores índices de especies endémicas (Magaña y Villaseñor 2002).

Esta biodiversidad le otorga al país posibilidades para competir en el mercado florícola mundial, con materiales nativos o con cultivos tradicionales (Martínez, 2003), ya que cerca de 4000 especies de plantas ornamentales cultivadas son de origen mexicano (Tejalca y Pérez 2018; Mayett-Moreno *et al.*, 2018).

Algunas plantas hortícolas mexicanas que destacan por su valor estético y económico son el cempasúchil, utilizado en las festividades del día de muertos y ceremonias religiosas; la noche buena, de importancia mundial, considerada símbolo de la navidad; y la dalia, nombrada flor nacional desde 1963 (Trejo-Hernández *et al.*, 2015).

2.1 *Sprekelia formosissima* con potencial comercial

Sprekelia formosissima tiene gran potencial en el mercado hortícola, debido a características estéticas similares a la del tulipán (*Tulipan*), azucena (*Lilium*), amarilis (*Hippeastrum* y (*Amaryllis belladonna*), narcisos (*Narciso*) y crinum (*Crinum x powellii*). Para los consumidores de plantas, características físicas como el color, el olor y el tamaño son más importante a la hora de adquirirlas que el precio (Mayett-Moreno *et al.*, 2018).

En Estados Unidos de América, Chile, Argentina, España, Francia, Grecia, Inglaterra, Polonia, República Checa y Australia, esta especie se comercializa a precios que oscilan entre los \$2.2 y los \$15 USD por bulbo, o de \$6.2 a \$12.97 USD por flor. En México, se comercializa por medio de páginas electrónicas, que la ofrecen en \$0.3 USD por bulbo y \$1.1 USD por flor, así como en pueblos pequeños (Castañeda *et al.*, 2014). Como no se comercializa en viveros, lleva a

suponer que los bulbos que se distribuyen en el país se extraen de su entorno natural (Mayett-Moreno *et al.*, 2018, Castañeda *et al.*, 2014).

A la fecha se tienen registradas cinco variedades de *S. formosissima* en el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS): Anna (SPK – 003 – 240708), Julia (SPK – 004 – 240708), Andrea (SPK - 002 – 240708), Oasis (SPK – 001-240708) y Terciopelo (SPK – 005 – 180213). Las tres primeras variedades fueron gestionadas por la Universidad Popular Autónoma del estado de Puebla A. C. y las dos últimas por la Universidad Autónoma del estado de México, ninguna de estas se comercializa.

La creación de variedades a partir el mejoramiento de plantas silvestres favorece al sector florícola y es una estrategia para conservar la biodiversidad, además con estas especies se pueden embellecer los paisajes urbanos (Mayett-Moreno *et al.*, 2018; Savard *et al.*, 2000).

2.2 Características de *Sprekelia formosissima*

Sprekelia formosissima es una especie herbácea, que se distribuye en todo México y Guatemala (López-Ferrari y Espejo-Serna 2002); en Michoacán forma parte de la composición florística del bosque tropical caducifolio y del matorral xerófilo, se localiza con frecuencia en zonas rocosas y durante el periodo de lluvias (Silva-Sáenz, 2017).

Es una hierba perenne de 20 a 45 cm de altura, tallos de 7 a 25 cm de longitud, de color verde o verde-rojizo, presenta una flor roja de 7.5 a 13 cm de largo por 8.5 a 12.5 cm de ancho, con anteras de 7 a 9 mm.

Las semillas de *Sprekelia formosissima* al igual que las de otras de la familia amarillidacea, están contenidas dentro de una cápsula con 80 unidades en promedio. Poseen un tegumento de color negro, son brillantes, aplanadas y redondeadas, con bordes membranosos (Baeza *et al.*, 2009); su tamaño varía de 9 a 11 mm de largo por 6.5 a 8 mm de ancho (Rzedowski, 2005). Por

tener una pérdida rápida de viabilidad, se les podría clasificar en el grupo de semillas recalcitrantes.

2.3 Clasificación botánica

Algunos autores consideran que *Sprekelia* es un género monotípico, con *S. formosissima* como única especie (Flory 1977, Sánchez 1979, Tapia-Campos *et al.*, 2012); aunque la lista de control mundial de familias de plantas seleccionadas (2011) reconoce dos especies: *S. formosissima* y *S. howardii* Lehmilller, y como sinónimos de *S. formosissima* a otras especies o variedades descritas en la literatura (Rodríguez-Domínguez *et al.*, 2018).

La clasificación taxonómica de *S. formosissima* es la siguiente: Reino: Plantae; Subreino: Tracheophyta; Filo: Magnoliophyta; Clase: Liliopsida; Orden: Asparagales; Familia: Amaryllidaceae; Género: *Sprekelia formosissima* (Conabio, 2018).

2.4 Propagación *in vitro* de *Sprekelia formosissima*

Sprekelia formosissima se puede reproducir *in vitro* si se cultivan por plántulas de 1 cm² de catafila (hojas modificadas) con una porción de disco basal en medio de cultivo MS suplementado con 8.87 µM de benciladenina N6 (BA) y 0.98 µM de ácido indol-3-butírico (IBA). Con este método es posible obtener 96 bulbos a partir de uno, en un período de seis meses (Cázarez, 2010).

2.5 Agentes mutágenicos

La inducción de poliploidía puede darse mediante tratamientos con agentes físicos como choques térmicos, rayos X, rayos gamma o por la exposición de los tejidos de las plantas a productos inductores de la inhibición mitótica (Kokate, 2011).

Algunos de estos agentes químicos son colchicina (Col), etilmetanosulfonato (EMS), azida de sodio (SA), hidrazida maleica (MH) y acridina (Acr) (Prabhukumar *et al.*, 2015).

2.6 Poliploidía

Los peces, los anfibios y cerca del 70 % de las plantas con flores tienen un origen poliploide (Soltis *et al.*, 2015), este proceso activo y continuo es reconocido como una fuerza impulsora importante para la especiación y evolución de las plantas (Alix *et al.*, 2017).

La poliploidía es la combinación de más de dos juegos de cromosomas (Leitch y Bennett 1997) que se originan de la misma especie (autopoliploidía) o especies afines (alopoliploidía) (Pelé *et al.*, 2018). La aloploidía resuelve problemas asociados con el apareamiento de cromosomas que emergen al reunir genomas divergentes (Hegarty *et al.* 2012). Para indicar el número total de conjuntos de cromosomas se utilizan los prefijos tri(3), tetra(4), penta(5), hexa(6), ... y así sucesivamente (Comai, 2005).

Los autotetraploides y triploides frecuentemente son de baja fertilidad, o incluso pueden ser estériles. Esto puede ser una característica deseable en plantas reproducidas clonalmente, ya que reduce la contaminación del medio ambiente por el polen o las fugas de semillas (Dhawan y Lavania, 1996).

Los poliploides pueden ser inducidos por dos mecanismos: la poliploidización mitótica, que se basa en la duplicación de tejidos somáticos, y la poliploidización meiótica, que genera gametos $2n$ (Ramsey y Schemske, 1998). La poliploidización meiótica, en contraste con la mitótica, produce poliploides a través de la fusión de dos gametos (polen u óvulos), uno o ambos con un número doble de cromosomas (Balode 2008).

Durante la meiosis se requiere al menos un cruce entre cromosomas homólogos para obtener gametos bien equilibrados y evitar la formación de aneuploides (Pelé *et al.*, 2018). La poliploidización meiótica tiene un gran potencial y es un método natural para obtener poliploides (Van *et al.*, 1990).

De manera natural, las especies poliploides son más frecuentes en altitudes mayores y en situaciones de más estrés ambiental (Soltis *et al.*, 2015), lo que favorece la adaptabilidad de los

individuos (Allario *et al.*, 2013) y su capacidad de colonizar nuevos nichos ecológicos (Blaine *et al.*, 2016).

En el pasado, la duplicación del genoma completo pudo originar innovaciones clave en características de la flor que facilitan la diversificación y su distribución, así como la invasión de nichos previamente desocupados, en tiempos posteriores (Van *et al.*, 2017). Un poliploide producido artificialmente, mediante la duplicación de cromosomas se conoce como neopoliploide (Comai, 2005).

Debido a que la colchicina es un alcaloide altamente tóxico y mutagénico (Pereira, 2012), se han buscado alternativas como los herbicidas antimitóticos (dinitroanilinas), entre ellas orizalina y trifluralina. Estas sustancias han inducido ploidía en *Paspalum notatum* (Quesenberry *et al.*, 2010). Otra sustancia que se ha utilizado para inducir ploidía ha sido la cafeína en *Hordeum vulgare* (Scagliusi *et al.*, 2009).

Después de la formación de poliploides, estos pasan por periodo (cuello de botella) de inestabilidad. Los poliploides adaptados entran en un proceso evolutivo de diploidización, durante el cual se pierden los genes o se mantienen como duplicados. Estos genes pueden conservar las funciones (sub-funcionalización) o pueden adquirir nuevas (neo-funcionalización) (Comai, 2005).

Los organismos poliploides presentan cambios en la regulación metabólica y estructura del genoma, lo que ocasiona efectos inmediatos sobre el fenotipo y la aptitud del individuo (Otto, 2007).

Muchos cultivos del mundo como el algodón, la colza y el trigo son generalmente poliploides, y a menudo poseen una calidad agronómica y hortícola superior a la de sus contrapartes diploides (Liu *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que la multiplicación genómica aumenta la concentración de metabolitos secundarios (Dhawan y Lavania, 1996) en la hierba cochina (*Cymbopogon flexuosus*) (Ammal

y Gupta, 1996) y la amapola iraní (*Papaver bracteatum*) (Milo *et al.*, 1987). En el caso de diente de león (*Taraxacum kok-saghyz*), se confirmó un aumento del 47.7 % en la concentración de caucho radicular en especies tetraploide (Luo *et al.*, 2018).

Mediante la duplicación cromosómica también se busca la restauración de la fertilidad de híbridos estériles, la generación de variabilidad genética en especies apomícticas (Pereira, 2012), la viabilización de cruces cuando los genotipos presentan ploidías diferentes, la obtención de progenies en menor tiempo (Souza-Kaneshima, 2010) y la resistencia a plagas. Esta última característica se explica porque la poliploidía provoca cambios en los perfiles metabólicos e interacciones con los herbívoros (Van *et al.*, 2017).

2.7 Inducción de poliploidía *in vitro* mediante agentes químicos en plantas de ornato

Se probó la respuesta de plantas de *Aloe vera* (L.) *in vitro* a diferentes concentraciones de colchicina (0, 0.05, 0.10 y 0.15 %) en dos tiempos de exposición (48 y 72 h). Los tratamientos con mejores resultados fueron los de colchicina al 0.10 % durante 48 y 72 h, que indujeron duplicación cromosómica en más del 50 % del tejido utilizado.

Las plantas tratadas con 0.15 % de colchicina durante 48 h produjeron tejido quimérico con alto predominio de células poliploides (91.7 %). A la misma concentración pero con 72 h de exposición, se obtuvieron células poliploides pero con desarrollo anormal y tejido necrótico (Motero *et al.*, 2018).

Semillas de *Trachyspermum ammi* L. se germinaron bajo cinco concentraciones de colchicina (0.025, 0.05, 0.1, 0.2 y 0.5 % (p/v)) en cinco tiempos de exposición (6, 12, 24, 36 y 48 h). Se observó una duplicación exitosa del número de cromosomas en plantas tetraploides; la mayor eficiencia (11.53 %) se obtuvo con la aplicación de colchicina al 0.05 % durante 24 h.

El aumento de cromosomas en *Trachyspermum ammi* incrementan la característica morfológicas de las plantas. En una serie de órganos de individuos tetraploides y diploides, respectivamente, se observaron los siguientes valores: altura, ente 151.0 y 72.7 cm; longitud de

hoja 9.36 y 8.33 cm; diámetro del vástago; 7.63 y 7.2 mm; longitud de inflorescencia, 16.46 y 15.53 cm; longitud del pedúnculo 4.36 y 3.46 mm; longitud de semilla, 2.66 y 2.30 mm; longitud estomática, 12.80 y 9.20 μm ; ancho estomático, 7.20 y 5.90 μm ; y densidad estomática, 15.90 y 25.4 estomas mm^{-2} (Noori, 2017).

Los tiempos de exposición menores requeridos para inducir la duplicación de cromosomas en secciones nodales delgadas se atribuyen a la penetración más eficiente del antimitótico en tejidos meristemáticos. La poliploidía fue acompañada por aumentos de 10 mm aproximadamente en la longitud de entrenudos, una coloración más verde en las hojas y la duplicación del número de pétalos por flor (Kermani, 2003).

2.8 Inducción de poliploidía *in vivo* por medio de agentes químicos en plantas de ornato

Se ha estudiado la inducción de poliploidía variando el tipo de explante, el método de aplicación, la técnica de confirmación, la concentración y el tiempo de exposición (Allum *et al.*, 2007).

En *Lilium* spp. se trataron 280 semillas con 1 g kg^{-1} de colchicina y 215 semillas con 2 g kg^{-1} . También se trataron escamas de bulbo con 0.1, 0.5 y 1 g kg^{-1} de colchicina. Las semillas tratadas con 1 g kg^{-1} de colchicina produjeron 215 plantas, de las cuales 12 eran poliploides. Con 2 g kg^{-1} de colchicina hubo efectos tóxicos, pues únicamente emergieron 14 plantas de las cuales sólo una era poliploide. En las escamas de bulbos, con 1 g kg^{-1} de colchicina se obtuvieron 10 plantas poliploides (Balode, 2008).

Sobre la viabilidad de semillas de cruza híbridas de plantas con diferentes niveles de ploidía, se encontró una viabilidad alta (89 %) en semillas híbridas de una cruce entre un diploide y un tetraploide, y un 39 % en promedio en el caso de cruces recíprocas. Se ha registrado viabilidad baja de semillas en híbridos provenientes de plantas tetraploides (26 %) y entre triploides con tetraploides (7 %) (Balode, 2008).

Raíces de *Aloe vera* (L.) se sumergieron en soluciones de colchicina al 0 %, 0.05 % y 0.10 % durante dos tiempos de exposición (24 y 48 h), los tratamientos fueron aplicados *in vivo* y en condiciones de oscuridad. El tratamiento con 0.10% de colchicina y 48 h de exposición indujo

incrementos significativos en altura de las plantas y longitud de hojas (5 cm aproximadamente), en el volumen foliar (10.42 cm^3) y en la inducción de células aneuploides (56 %) (Matos, 2014).

El tratamiento de semillas de con los tratamientos óptimos para la inducción de poliploidía en *Dendranthema indicum* var. *aromaticum* fueron 0.1 mg L^{-1} de colchicina durante 24 h en semillas (14.5 %) y 0.1 mg L^{-1} de colchicina durante 7 d (40 %) en ápices. Se obtuvieron siete plantas tetraploides, que desarrollaron hojas más grandes y gruesas, con mayor diámetro de flor y pubescencia en la epidermis, aunque la altura de planta disminuyó (He, 2016).

En *Bauhinia acuminata* Linn se obtuvieron tetraploides a partir de semillas tratadas con colchicina al 0.05, 0.1, 0.25, 0.50 %. Las plantas obtenidas aumentaron su altura y el tamaño de la hoja. El tratamiento óptimo para inducir poliploides fue 0.1% de colchicina por tres días consecutivos (Basumatari y Das, 2017).

Plántulas de *Kalanchoe daigremontiana* se sometieron a concentraciones de 0.025 y 0.1 % (p/v) de colchicina en dos tiempos de exposición (24 y 48 h) en cámaras oscuras. Los mejores tratamientos fueron los de colchicina al 0.025 % durante 24 y 48 h, que incrementaron significativamente variables morfológicas foliares y estomáticas (Salazar *et al.*, 2018).

2.9 Ploidía en *Sprekelia formosissima*

El contenido de ADN de *Sprekelia formosissima* es de $180 + 12 \text{ pg ADN/celular}$ y está entre los más altos en las angiospermas (Price *et al.*, 1972), presenta un número de cromosomas básico de $x=30$.

Un estudio en tres poblaciones de esta especie en el estado de Jalisco mostró diferentes niveles de ploidia de manera natural ($2n = 2x = 60$, $2n = 4x = 120$, y $2n = 5x = 150$), estos niveles se relacionan con el tamaño de las estructuras morfológicas. Se considera que las flores más grandes y atractivas están presentes en plantas pentaploides, sin embargo, en condiciones de invernadero, plantas con este nivel de ploidia no produjeron semillas (Rodríguez-Domínguez *et al.*, 2018).

2.10 Métodos de detección de poliploides

Una estrategia de detección temprana de poliploides se basa en la morfología atípica de las estructuras foliares, como flores más grandes, tallos y raíces más gruesos, hojas verde oscuras, mayor relación ancho-largo de las hojas (Lavania *et al.*, 2012), polen más grande (Dewitte *et al.*, 2009) y mayor número de cloroplastos por estoma, en organismos tetraploides y diploides (Chakraborti *et al.*, 1998).

Los cloroplastos son organelos donde se realiza la fotosíntesis, por tanto, a mayor número de estos es probable que haya una mayor actividad fotosintética en la planta y mayor cantidad de materia seca (Gordillo *et al.*, 2008).

La morfología de los estomas es determinante para controlar la pérdida de agua, lo que posibilita la adaptación de muchas especies vegetales a condiciones ambientales muy diversas (Hetherington y Woodward, 2003).

En algunas especies, el aumento en el tamaño cromosómico se relaciona con un aumento en el tamaño de los estomas y una disminución en la densidad estomática [*Trifolium pratense*, *Trifolium repens* (Evans, 1955), *Medicago sativa* (Speckmann *et al.*, 1965) *Acacia mearnsii* (Beck *et al.* 2003), *Dendranthema indicum* var. *Aromaticum* (He, 2016), *Bauhinia acuminata* (Basumatari y Das, 2017) y *Taraxacum kok-saghyz* (Luo *et al.*, 2018)] Por lo contrario, en *Lolium multiflorum* y *Coffea* (Mishra, 1997) tienen estomas con diferente longitud para un mismo nivel de ploidía (Speckmann *et al.*, 1965).

La detección de poliploides contando cromosomas y comparándolos con el tamaño del polen, el tamaño de la semilla y la morfología de la hoja, podría ser subjetiva y propensa al error humano (Luo *et al.*, 2018). Sin embargo, estos protocolos sencillos brindan información preliminar sobre el citotipo de los individuos, que en el caso de especies forestales es un dato fundamental para los procesos de restauración ecológica y de reforestación, que se pueden correlacionar posteriormente con información genética y molecular (Caiza *et al.*, 2018).

La citometría se ha convertido en el método más eficaz y preciso para detectar cambios en el nivel de ploidía (Doležel *et al.*, 1989), pero se necesita de un equipamiento especial.

El uso de parafina y el corte de secciones finas de la punta de la raíz para la observación de cromosomas bajo el microscopio óptico dio buenos resultados a los primeros citólogos, hasta la aparición de la técnica del aplastado de puntas de raíz conocido como “squash” para el conteo de cromosomas en células somáticas (Valladolid y Gonzáles, 2004).

2.11 Efecto de la solución nutritiva y el tidiazuron sobre el desarrollo de plantas

Las geofitas presentan un periodo de dormancia en la temporada de sequía y poseen bulbos como órganos de almacenamiento (Damián-domínguez *et al.*, 2009). Su fenología y eventos específicos como la floración están determinadas por varios factores ambientales como la temperatura, el fotoperiodo, la precipitación y el estado nutrimental (Vallejo 2017).

La demanda nutrimental es la cantidad de nutrimentos que producen efectos significativos benéficos en las características morfológicas y fisiológicas de las plantas (Nicola y Basoccu, 1994).

Las principales características que influyen en el desarrollo de los cultivos y sus productos de importancia económica son: la relación mutua entre los aniones y cationes, la concentración de nutrimentos, el pH y la relación $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ (Lara, 1999).

El tidiazurón ha sido suplementado en proporciones de 7 mg L^{-1} en el medio MS para la elongación de los brotes (1,37 cm) en el cultivo *in vitro* de *Dendrobium aqueum* (Parthibhan *et al.*, 2015). Explantes nodales de *Pluchea lanceolata* inoculados *in vitro* en un medio MS suplementado con $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ de tidiazurón, tuvieron alta tasa de multiplicación de los brotes (9.7 ± 3.49) en el 95.8 % de los explantes (Kher *et al.*, 2014). El tidiazuron en dosis del 25 y 50 ppm indujo un incremento en el diámetro del fruto de *Persea americana* Mill. (60,1 y 61,0 mm) en comparación con el control (55,6 mm) (Vivar y Álvarez, 2015).

El efecto de tiazuron se ha estudiado en plantas bulbosas. La micropropagación *in vitro* de *Urginea maritima* a partir de explantes de una escama de bulbo y en escamas dobles, cultivados en el medio MS, con 0,55 mg L⁻¹ de tiazuron y una exposición a la luz de 16 h, provocaron la regeneración de los explantes de los bulbos. En escamas simples produjeron de 0.90 a 1.33 bulbos, en comparación con las escamas dobles, que produjeron 1.17 bulbos (Aasim *et al.*, 2008).

En la poscosecha de *Iris x hollandica*, la adición de 0.2 a 1 mM de tiazuron por 6 y 24 h prolongó la vida de las flores hasta 1.5 días respecto al control. El tratamiento con TDZ también estimuló el crecimiento del pedicelo y el ovario hasta 2,5 cm; lo que a su vez condujo a una apertura más completa de las flores (Macnish *et al.*, 2010).

En el cultivo *in vitro* de la Amaryllidaceae *Eucrosia stricklandii* se indujeron 2.3 brotes por medio de escamas dobles cultivadas en el medio MS suplementado con 0,54 / 0,45 μM de tiazuron (Colque *et al.*, 2002).

CAPÍTULO III

III. Inducción de poliploidía en *Sprekelia formosissima*

RESUMEN

Sprekelia formosissima es una especie silvestre con gran atractivo visual debido a sus alargados pétalos simétricos de color rojo, sus anteras colgantes y el largo de su vara floral, es muy popular su cultivo en macetas. Debido a que se carece de variedades comerciales las plantas se extraen de su hábitat para su cultivo, lo que provoca una pérdida de genotipos. La poliploidía es una técnica de mejoramiento, que por medio de la inducción de duplicación de su material genético incrementa la producción y la obtención de nuevas características en las plantas. En esta técnica se puede llevar a cabo en condiciones de invernadero o *in vitro*, usar diferentes agentes químicos y tipos de material biológico. El objetivo de la investigación es la evaluación de los cambios morfogénicos de las plántulas obtenidas de semillas de *S. formosissima* expuestas a colchicina (0, 0.1, 0.2 y 0.3 %) durante 12, 24 y 48 horas y un segundo experimento con las mismas concentraciones y una reducción de 2, 4 y 8 en horas. Las semillas se cultivaron en medio Murashige y Skoog (MS) con sales minerales totales a 100 % con 30 g L⁻¹ de sacarosa. Las variables evaluadas fueron viabilidad de las semillas y germinación a los 8 días después de la siembra (dds) y altura de plántulas obtenidas a los 90 dds. Con los datos obtenidos se efectuó un análisis de varianza ($P \geq 0.05$) y una prueba de Tukey para la comparación de medias. En el primer experimento se presentó el menor porcentaje de germinación debido a la muerte de las semillas inmersas en colchicina, se obtuvo un 4.7 % de germinación en agua por 24 h y 28.6 % de germinación en 0.2 % de colchicina por 12 h. En el segundo experimento el porcentaje de germinación se redujo un 20 % de germinación en el tratamiento testigo, sin embargo, se incrementó la germinación (52.3 %) en 0.3 % de colchicina por 2 h. En ambos experimentos se obtuvieron plántulas con una reducción en tamaño significativamente menor en comparación con las plantas testigo. En condiciones de invernadero se sumergieron los bulbillos de plántulas de *S. formosissima* en colchicina en concentraciones de 0.1 y 0.2 % durante 6, 12, 24 y 48 h. La menor supervivencia 18.44 % se presentó en plántulas en los mayores tiempos de inmersión 48 h. La colchicina aplicada, dependiente de la dosis, redujo la supervivencia y altura de plantas tratadas con colchicina 0.1 y 0.2 % durante 12 a 48 horas. Se obtuvieron diferencias estomáticas.

Para conocer si otros factores como la pérdida de la acelerada de la viabilidad de la semilla de *S. formosissima* influía en la muerte de las semillas de manera independiente al uso de los agentes antimitóticos se realizaron pruebas de germinación y viabilidad mes a mes durante medio año. En el primer mes se presentó el mayor número de semillas viables (97 %) y el mayor porcentaje de germinación (95 %) comparadas con el mes seis en donde se obtuvo un bajo porcentaje de viabilidad (11 %) y de germinación (5 %).

Palabras clave: Colchicina, semillas, bulbos, estomas, altura, *in vitro*, invernadero.

3.1 INTRODUCCIÓN

Sprekelia formosissima Herbert. es una planta silvestre nativa de México que se extrae de su hábitat por la gran belleza en la simetría de sus flores rojas, no se propagan en vivero para su venta porque las variedades registradas en México son pocas, esto provoca una pérdida de genotipos. El desarrollo de nuevas variedades ornamentales por medio de poliploides inducidos, puede generar rasgos morfológicos deseables distintos a los que presentan las plantas silvestres y cultivadas (Manzoor *et al.*, 2019).

Los enfoques de mutagénesis más utilizados para generar cambios incluyen el uso de productos químicos, radiaciones ionizantes e inserción de ADN-T (Shu *et al.*, 2012). Uno de los productos químicos más utilizados es la colchicina, alcaloide que se une a la tubulina y evita que los pares de cromosomas se separen y se muevan al polo opuesto, antes de la citocinesis. Esto da como resultado una célula con dos juegos cromosómicos, fenómeno conocido como poliploidía (Eng y Ho, 2019). Los compuestos químicos se han usado en diversos tipos de explantes, protocormos, callos, raíces y semillas, en cultivos *in vitro* y con menor frecuencia en sistemas *ex vitro* (Yang *et al.*, 2015).

Algunos de los cambios ocasionados por la ploidía se denominan efecto “giga”, porque aumentan el tamaño y el vigor de la planta, de sus flores y de sus estomas (Sattler *et al.*, 2015). Algunas de estas características además de ser valiosas comercialmente en la industria de las plantas, se utilizan como parámetro en la medición de la duplicación cromosómica.

La inducción de poliploidía *in vitro* se ha utilizado en numerosas especies. En plantas de *Dendrobium nobile* de 5 cm de altura sumergidas en colchicina al 0.1 % durante 96 h, se incrementó el número de tetraploides y con esto el tamaño de la flor y el ancho del labelo (Vichiato *et al.*, 2014). En el caso de *Lobularia marítima*, se indujo el acortamiento de los entrenudos con el uso de colchicina al 0.2 % durante 12 horas (Huang *et al.*, 2015). Semillas de *Dendranthema indicum* var. *Aromaticum* tratadas con 0.1 mg L⁻¹ de colchicina durante 7 días produjeron tetraploides con mayor diámetro de la flor, así como del tamaño y grosor de las hojas (He, 2016).

La inducción de poliploidía *ex vitro* se ha usado en especies como el anturio, en donde se obtuvieron tetraploides y mixoploides sumergiendo en colchicina las raíces aéreas de la planta (Chen *et al.*, 2011). Con la aplicación de agentes mutagénicos en ápices de *Stevia rebaudiana* se obtuvieron plantas mixoploides, triploide y tetraploides cuya biomasa y contenido de glucósidos aumentó (Rameshsing *et al.*, 2015). Esta técnica también se ha utilizado en especies como petunia y portulaca (El-Nashar y Ammar, 2016).

Es importante estandarizar los sistemas de inducción de poliploides para cada especie, ya que cuando la colchicina se usa en concentraciones altas puede inducir a la muerte celular. Se sabe que existe una relación inversa entre la concentración de colchicina y la supervivencia de las plantas (Sajjad *et al.*, 2013).

Cuando se experimenta con semillas, es necesario conocer su proceso de pérdida de viabilidad, tanto en condiciones naturales como una vez aplicados los tratamientos. Una de las pruebas más conocidas para evaluar y cuantificar la viabilidad de las semillas es la de cloruro de 2, 3, 5 trifenil tetrazolio (TZ). En este proceso, los iones H⁺ liberados durante la respiración de los tejidos vivos, son transferidos por la enzima, deshidrogenasa del ácido málico, para reducir el TZ a un compuesto rojo estable, no difusible, llamado Trifenil Formazan; de esta forma, los tejidos vivos se tiñen y distinguen de los tejidos no viables, con muy baja o nula respiración (Moratinos *et al.*, 2018). Mediante esta técnica, las semillas se clasifican en viables, no viables y potencialmente viables (Salinas *et al.*, 2001).

Con base en lo expuesto anteriormente, este estudio se llevó a cabo con el propósito de alcanzar los objetivos que se enumeran en el apartado siguiente.

3.1.1 Objetivos

- Establecer semillas de *Sprekelia formosissima* libres de contaminantes, *in vitro*.
- Determinar la dosis de colchicina aplicada en semillas de *Sprekelia formosissima* cultivadas *in vitro*, y el tiempo de exposición más eficientes para inducir poliploides.

- Determinar la dosis de colchicina aplicada en plántulas de *Sprekelia formosissima* cultivadas *in vivo*, y el tiempo de exposición más eficientes para inducir poliploides.
- Evaluar los niveles de ploídia de las plántulas originadas por los tratamientos aplicados, mediante técnicas estomáticas.
- Cuantificar el efecto del tiempo de almacenamiento en la viabilidad de semillas de *Sprekelia formosissima*.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se llevó a cabo en la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en Uruapan, Michoacán.

3.2.1 Origen del material vegetal

El material vegetal utilizado se colectó en San Ángel Zurumucapio, Michoacán, en junio del 2019. Se seleccionaron al azar, plantas con frutos maduros de los cuales se colectaron las semillas, que se transportaron al laboratorio en bolsas de papel.

3.2.2 Inducción de poliploidía *in vitro*

Esta parte de la investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* de la Facultad de Agrobiología.

3.2.2.1 Desinfección de semillas

Se sumergieron 80 semillas de *Sprekelia formosissima* en una solución de Captan 500[®] (1 g L⁻¹) con 15 gotas de microdyn durante 15 min. Después, se desinfectaron submuestras de 20 semillas con hipoclorito de sodio (6 % de ingrediente activo) al 20, 25, 30 y 35 %, durante 20 minutos. Las soluciones de fungicida y desinfectante se mantuvieron en agitación constante para evitar que las semillas flotarán. En la campana de flujo laminar las semillas se enjuagaron tres veces con agua estéril y se secaron con sanitas estériles. Posteriormente, se retiró la testa de las semillas sin maltratar al embrión y se establecieron (Figura 1) en el medio Murashige y Skoog (MS) al 100 % , sin fitohormonas, con sacarosa (30 g L⁻¹), mioinositol (100 mg L⁻¹), tiamina (0.4 mg L⁻¹) y agar (6 g L⁻¹), el pH se ajustó a 5.7.

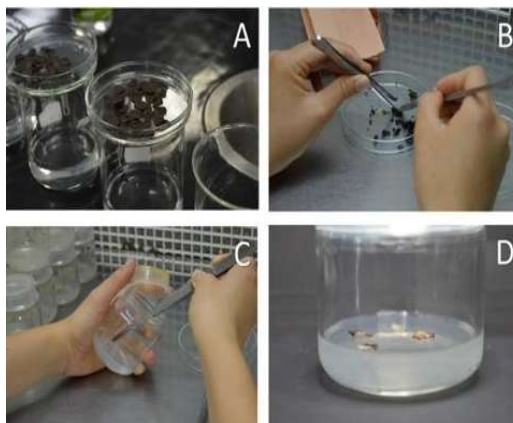


Figura 1. Establecimiento *in vitro* de *Sprekelia formosissima*. A) Desinfección de las semillas con hipoclorito de sodio. B) Eliminación de la testa. C y D) Siembra de semillas en medio Murashige y Skoog.

Los cuatro tratamientos (10, 25, 30 y 35 % de hipoclorito de sodio) se establecieron en un diseño completamente al azar con cinco repeticiones, donde la unidad experimental fue un frasco con cuatro semillas. Quince días después de establecido el experimento se determinó el porcentaje de contaminación de las semillas en cada unidad experimental. Los datos se normalizaron mediante su transformación a raíz cuadrada del porcentaje de contaminación más uno, y se procesaron mediante un análisis de varianza con el procedimiento GLM; para las comparaciones de medias se utilizó la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). El análisis estadístico se realizó con el programa SAS versión 9.0 (SAS Institute, 2002).

En el laboratorio de fitopatología, se aislaron e identificaron los hongos contaminantes. Se utilizaron muestras de micelio de los frascos contaminados; las cuales se cultivaron en cajas Petri con 10 mL de medio papa dextrosa agar (PDA), a temperatura ambiente, durante una semana. El micelio purificado se colocó en portaobjetos con lactofenol, se observó en el microscopio compuesto y se identificó por medio de las claves de Barnett y Hunter (1998).

3.2.2.2 Exposición de semillas al agente antimicrobiano

En un primer ensayo se desinfectaron 273 semillas de *S. formosissima* en Captán® (1 g L⁻¹) con 15 gotas de microdyn durante 15 min y después en hipoclorito de sodio (35 %) por 20 min. Después, las semillas se separaron en 13 submuestras (21 semillas por bolsa) y se trataron con

colchicina (0.1, 0.2 y 0.3 % p/v) o agua estéril durante 12, 24 y 48 h, se consideró un tratamiento control sin tratar.

En un segundo ensayo (Figura 2), se trataron 273 nuevas semillas con las concentraciones de colchicina ya descritas y agua estéril durante 2, 4 y 8 h. Transcurrido el tiempo de cada tratamiento, a las semillas se les retiró la testa, se enjuagaron y se secaron antes de su siembra. El medio de cultivo fue el MS al 100 %.

En ambos ensayos los cultivos se incubaron a 25 °C, con fotoperiodo de 16/8 h de luz y oscuridad, respectivamente; y radiación fotosintéticamente activa de 45 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, proporcionada por lámparas de luz fluorescente blanca de 75 W.

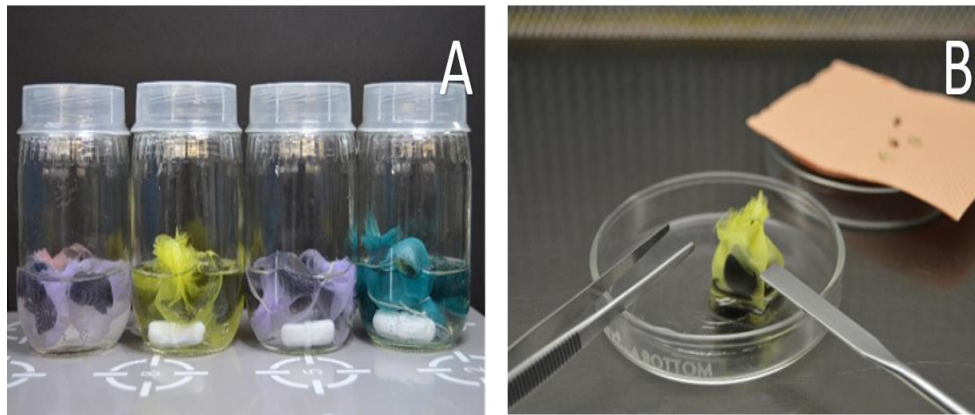


Figura 2. Semillas *Sprekelia formosissima* expuestas a colchicina. A) Semillas tratadas con diferentes dosis de colchicina. B) Eliminación de la testa antes de su cultivo.

Se evaluaron 13 tratamientos, conformados por la combinación de cuatro dosis de colchicina con tres tiempos de exposición (arreglo factorial), más el tratamiento control; en un diseño experimental completamente al azar con siete repeticiones. La unidad experimental se constituyó de un frasco de cultivo.

Ocho días después de la siembra (dds) se evaluó la viabilidad de las semillas y el porcentaje de germinación. Sesenta dds se determinó la altura de las plantas.

La viabilidad se determinó con cloruro de 2, 3, 5-trifeniltetrazolio (TTZ) en una muestra de cinco semillas con cuatro repeticiones de *S. formosissima* de cada tratamiento. Las semillas se trataron con soluciones de sacarosa al 10 % durante un día; y tetrazolio al 1 % por 8 horas en baño maría a 40 °C. Posteriormente se efectuó un triple enjuague, se retiró la testa de las semillas y se observaron en microscopio con aumento de 40x. Finalmente, se determinó el porcentaje de germinación de cada unidad experimental.

Los porcentajes de germinación se normalizaron mediante su transformación a raíz cuadrada del porcentaje de germinación más uno. A los datos se les realizó un análisis de varianza con el procedimiento GLM del programa SAS versión 9.0 (SAS Institute, 2002). Las comparaciones de medias se realizaron con la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

3.2.3 Inducción de poliploidía *in vivo*

Esta parte de la investigación se realizó en el invernadero de plantas ornamentales de la Facultad de Agrobiología

3.2.3.1 Germinación de semillas

Se sembraron semillas en charolas de plástico tipo domo marca Reyma[®] de 22.6 cm de largo, 16 de ancho y 5.9 de profundidad, llenas con turba *Sphagnum* esterilizado. Se establecieron 1,000 semillas en cada una de las 10 charolas utilizadas.

3.2.3.2 Exposición de plántulas al agente antimitótico

En plántulas de *S. formosissima* de cuatro meses de edad y 15 cm de altura, se sumergieron sus raíces y bulbos (Figura 3) en soluciones de colchicina (0, 0.1 y 0.2 % p/v) durante 6, 12, 24 y 48 h. Después, las plántulas se establecieron en charolas de germinación de 50 cavidades en turba *Sphagnum* húmedo. Se colocaron cuatro plántulas completas (con sus bulbos) por cavidad. Una vez establecidas, las plantas se regaron dos veces por semana (Figura 3).

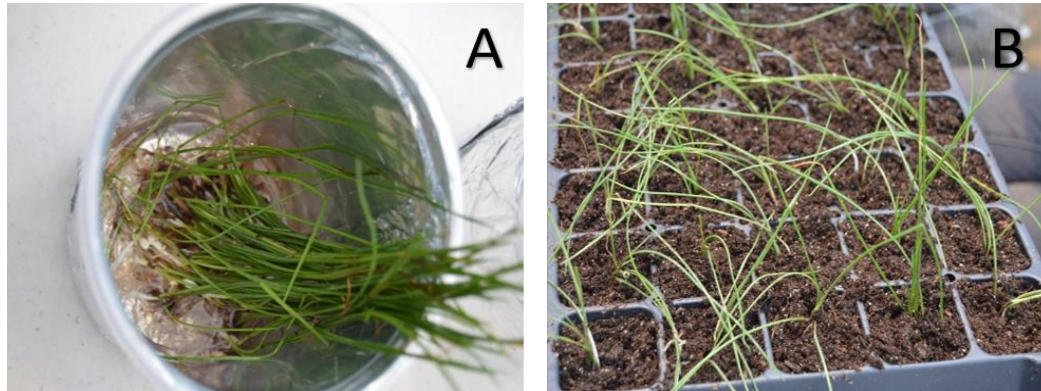


Figura 3. Aspectos de la inducción de ploidía en plántulas de *Sprekelia formosissima*. A) Inmersión de raíces y bulbos en colchicina B) Cultivo de plántulas en turba *Sphagnum*.

El experimento se llevó a cabo en invernadero, a temperatura promedio de 25 °C en el día y 13 °C en la noche; humedad relativa de 60 % y fotoperiodo de 16 h de luz y 8 de oscuridad. Se evaluaron 12 tratamientos originados de la combinación de dos factores de variación (en un arreglo factorial): concentración de colchicina y tiempo de exposición, con cuatro y tres niveles, respectivamente; en un diseño completamente al azar con 50 repeticiones, donde la unidad experimental constó de una cavidad con 4 plántulas. Diez meses después de la aplicación de los tratamientos de colchicina, se determinó el porcentaje de supervivencia. Un año después del trasplante, se determinó la altura de 10 plántulas seleccionadas al azar, con el uso de un vernier.

Un año después de la aplicación de la colchicina, se seleccionaron al azar, tres plantas de cada tratamiento. De cada una de ellas se tomó una hoja al azar, para determinar el tamaño de los estomas del envés de la misma, una vez impresos éstos y colocados en portaobjetos. Para ello, se colocó el envés de las hojas durante algunos minutos sobre un portaobjetos con una gota de cianoacrilato (pegamento kola loka®). Así, de cada tratamiento se tomó la impresión de tres hojas seleccionadas al azar. De cada hoja se midieron 30 estomas con el programa Q-Capture Pro 7 Live Preview Nikon, en un microscopio Nikon Eclipse con aumento de 40x y campo visual del ocular de 4 mm² y 1 mm².

Los datos del ancho y largo de los estomas se sometieron a un análisis de varianza ($P > 0.05$) y una prueba de Tukey para la comparación de medias, con el programa SAS versión 9.0 (Statistical Analysis System, 2002). En este caso, la unidad experimental fue un estoma.

3.2.3.3 Germinación en semillas de *Sprekelia formosissima* almacenadas

Una muestra de 600 semillas de *Sprekelia formosissima* fueron almacenadas a temperatura ambiente en sobres de papel con 100 semillas cada una. Mensualmente, se cultivaba un sobre *in vitro*, para evaluar su porcentaje de germinación. El medio de cultivo utilizado fue el Murashige y Skoog (1962) (MS), sin fitohormonas, con sacarosa (30 g L^{-1}), mioinositol (100 mg L^{-1}), tiamina (0.4 mg L^{-1}) y agar (6 g L^{-1}), con pH ajustado a 5.7

Se utilizaron frascos de vidrio de 100 mL de capacidad con 20 mL de medio de cultivo esterilizado en autoclave durante 15 min a 1.2 kg cm^{-2} de presión y $121 \text{ }^\circ\text{C}$. Estos se incubaron a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, con fotoperiodo de 16/8 h de luz oscuridad, respectivamente, y radiación fotosintéticamente activa de $45 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ proporcionada por lámparas de luz fluorescente blanca de 75 W.

Se evaluó el porcentaje de semillas germinadas, en unidades experimentales compuestas por un frasco con cinco semillas, en un diseño completamente al azar con 20 repeticiones. Se realizó un ANOVA y la prueba de medias con los mismos procedimientos y herramientas ya descritas en apartados anteriores.

3.2.3.4 Determinación de la viabilidad en semillas de *Sprekelia formosissima*

Se determinó la viabilidad inicial con la prueba de cloruro de 2, 3, 5-trifeniltetrazolio, en una submuestra de 20 semillas provenientes de una muestra de 120 semillas *S. formosissima* conservadas a temperatura ambiente. La submuestra se trató con sacarosa (10 %) durante 1 día; y en una solución de tetrazolio (1 %) durante 8 h en baño maría, a $40 \text{ }^\circ\text{C}$; posteriormente, se efectuó un triple enjuague, se retiró la testa de las semillas y se observaron en microscopio con aumento de 40x.

La viabilidad se determinó de manera individual (Figura 4) y se clasificó a las semillas de acuerdo con la coloración del embrión en viables, no viables y potencialmente viables, con base en lo establecido por Moratinos (2018). Esta prueba se efectuó mensualmente y en seis ocasiones para evaluar la pérdida de viabilidad de las semillas en el tiempo. También se evaluó el porcentaje de germinación, utilizando como unidad experimental un frasco con cinco semillas; en un diseño completamente al azar con 20 repeticiones.

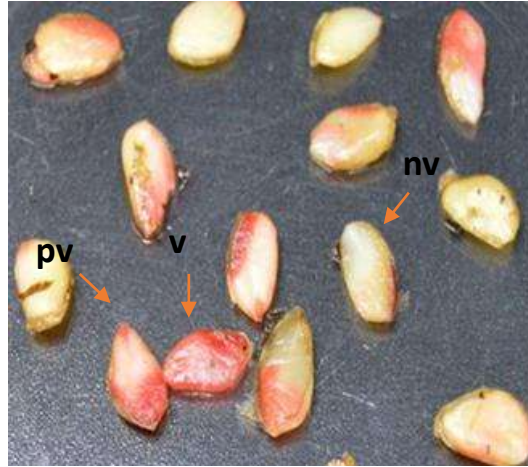


Figura 4. Semillas de *Sprekelia formosissima* sometidas a la prueba de 2, 3, 5 trifeniltetrazolio.
v: viable, nv: no viable, pv: potencialmente viable.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Presencia de *S. formosissima* en los sitios de colecta de material vegetal

En los sitios de colecta (Figura 5) se encontraron poblaciones de *S. formosissima* con densidades de individuos altas, aún en suelos rocosos. Aunque la especie presenta periodos de floración muy cortos, sus flores poseen gran variedad de caracteres morfológicos que pueden estar asociado con una diversidad genética y plasticidad fenotípica de la especie alta, lo que representa un gran potencial para seleccionar materiales con características agronómicas sobresalientes o la generación de genotipos nuevos mediante procesos de mejoramiento.

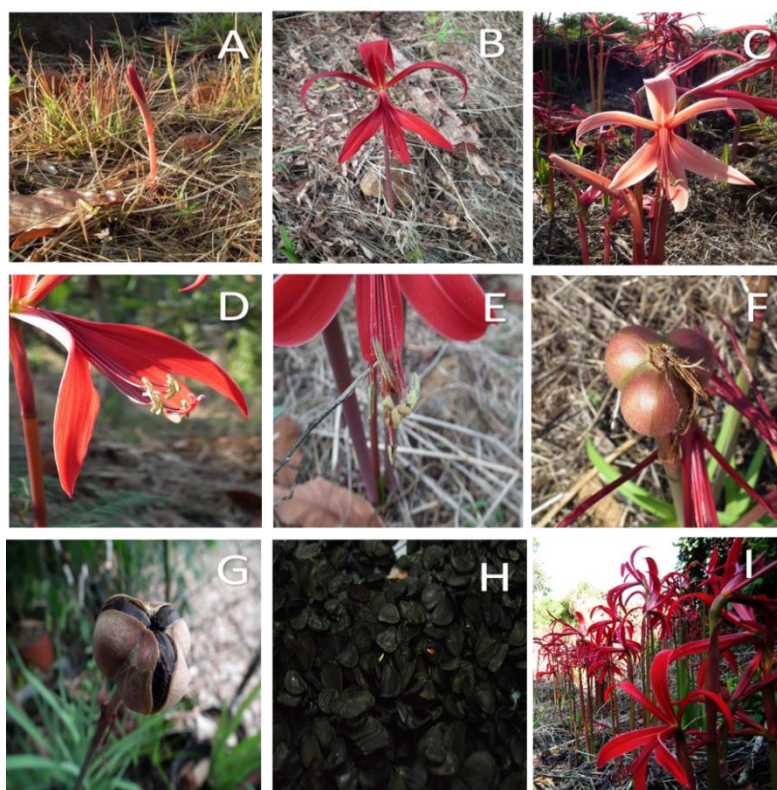


Figura 5. *Sprekelia formosissima* recolecta de campo: A) Brote; B) Flor madura; C) Flor con variación de color; D) Estructuras sexuales; E) Polinización; F) Fruto inmaduro; G) Fruto maduro; H) Semillas; I) Población de *Sprekelia formosissima*.

La modalidad de floración de esta especie es llamada “big bang” o floración masiva, con una alta sincronización en la producción de flores a nivel individual y poblacional, así como periodos de floración anuales muy cortos (Gentry, 1974).

3.3.2 Inducción de poliploidía *in vitro*

3.3.2.1 Desinfección de semillas

El hipoclorito de sodio influyó significativamente en la presencia de contaminantes en las semillas. Con 20 % del producto se observó la contaminación mayor (80 %). Conforme se incrementó la dosis de cloro, la contaminación de las semillas disminuyó hasta alcanzar una asepsia total con 30 y 35 % de hipoclorito de sodio; sin embargo, es importante mencionar que los resultados obtenidos con las tres concentraciones máximas resultaron estadísticamente iguales (Figura 6). Esta contaminación de la semilla fue causada por el hongo *Dichobotrys* sp, cuyo micelio se caracteriza por ser blanco algodonoso, se originó junto a la semilla e invadió el frasco de cultivo a los 15 dds (Figura 7).

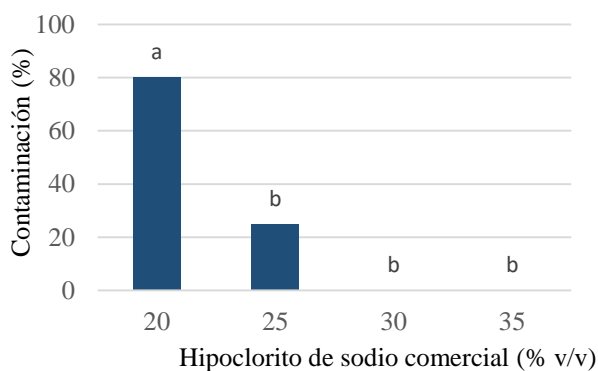


Figura 6. Contaminación en semillas de *Sprekelia formosissima* desinfectadas con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio comercial.

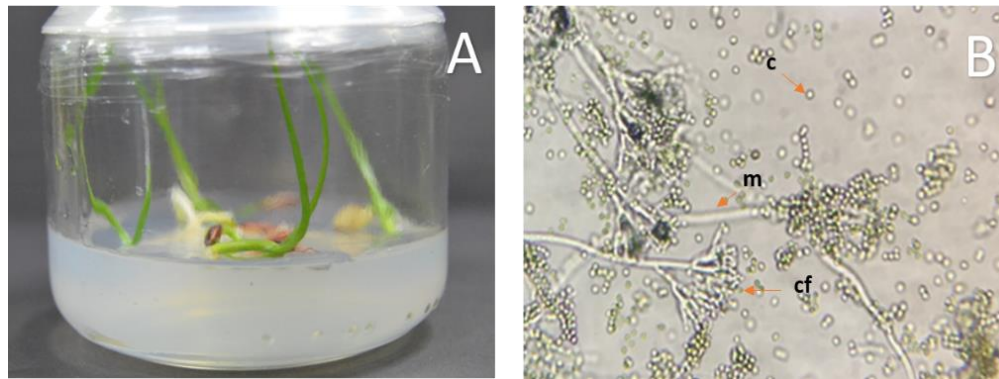


Figura 7. Contaminación de semillas de *Sprekelia formosissima* *in vitro*. A) semillas libres de agentes contaminantes. B) Estructuras del hongo *Dichobotrys* sp. c: conidia, m: micelio y cf: conidióforos.

3.3.2.2 Efectos de la aplicación de colchicina en semillas de *S. formosissima*

Los datos obtenidos en ambos ensayos indican que las semillas de *S. formosissima* son muy sensibles al tiempo de inmersión y a la concentración de colchicina, pero que el efecto no es aditivo sino interactivo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Cuadrados medios de análisis de varianza realizados para evaluar el efecto de la dosis y tiempo de exposición a colchicina en la germinación *in vitro* de *Sprekelia formosissima*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Germinación (%)	
		Primer ensayo	Segundo ensayo
Tiempo de inmersión (T)	3	0.353**	0.163**
Concentración (C)	3	0.008**	0.060**
T*C	9	0.010**	0.049**

Altamente significativo (**) $\leq P 0.05$

En el primer ensayo la totalidad de las semillas del tratamiento testigo germinaron, aunque este proceso no ocurrió en semillas sumergidas en agua o solución de colchicina, (Figura 8 A), el

mayor porcentaje de semillas germinadas (28.6 %) se obtuvo con 0.2 % de colchicina y 12 horas de inmersión, sólo estadísticamente menor que el testigo, que tuvo 100% de germinación.

En el segundo ensayo, la mayor germinación ocurrió (76 %) en semillas sin aplicación de colchicina y cuatro horas de inmersión y en colchicina 0.3 % de colchicina por dos horas de inmersión; que resultaron estadísticamente iguales al testigo (Figura 8 B).

La disminución de la germinación de los testigos posiblemente esté relacionada con la pérdida de viabilidad que tienen las semillas de forma natural, pues entre el primero y el segundo ensayo hubo una diferencia de 30 d. La disminución del periodo de inmersión de uno a otro ensayo, también permitió detectar mayores diferencias entre los tratamientos evaluados (Figura 8 B). Con la pueba de tetrazolio se comprobó que el embrión de las semillas que no germinaron era inviable, lo que demuestra el valor de dicha técnica.

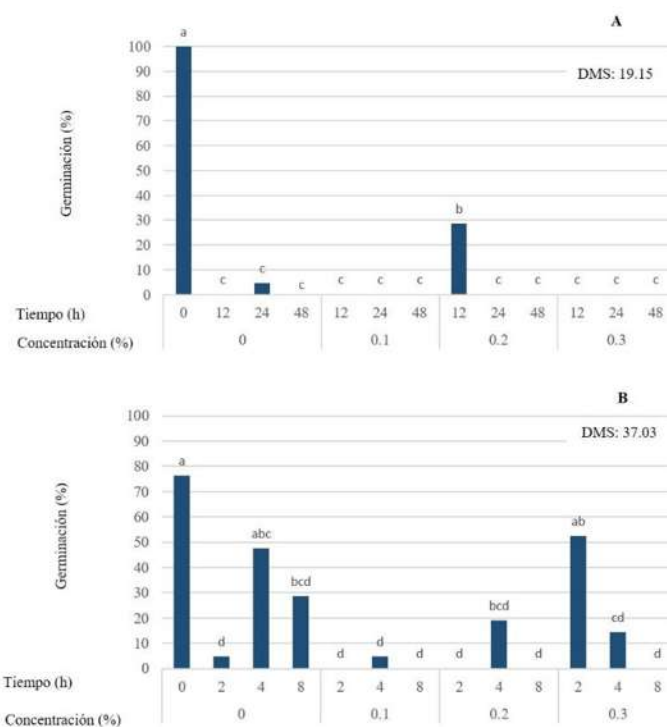


Figura 8. Germinación de semillas de *Sprekelia formosissima* expuestas a colchicina. A) 12, 24 y 48 h. B) 2, 4 y 8 h.

El tiempo de inmersión y la concentración de colchicina, solas o en interacción, también afectaron significativamente la altura de las plántulas en ambos ensayos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto de la exposición a colchicina en la altura de plántulas de *Sprekelia formosissima*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Altura de plántulas (cm)	
		Primer ensayo	Segundo ensayo
Tiempo de inmersión (T)	3	277.85**	157.76**
Concentración (C)	3	49.45**	9.57*
T*C	9	69.84**	7.51*

Significativo (*) y altamente significativo (**) $\leq P 0.05$.

En el primer ensayo, sólo se pudieron medir las plántulas del tratamiento con 0.2 % de colchicina y 12 horas de inmersión, que presentaron anormalidades y altura máxima menor a 1 cm, estadísticamente muy diferentes al control (Figura 9 y10 A).

En el segundo ensayo, sobresalieron los tratamientos sin colchicina con 4 y 8 h de inmersión, y el de 0.3 % de colchicina con 2 h de inmersión, cuya altura fue de alrededor de 2 cm, estadísticamente iguales al resto de combinaciones, pero muy inferiores al tratamiento control, con alrededor de 9 cm de altura (Figura 9 B).

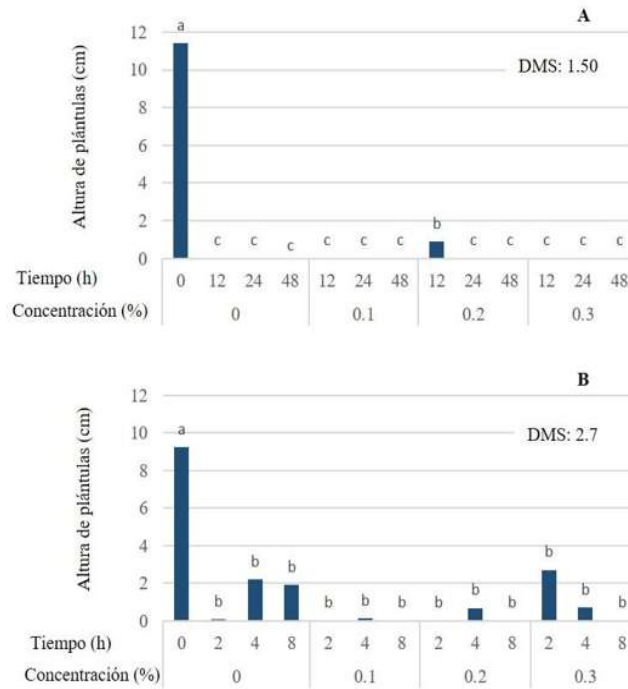


Figura 9. Altura de plántulas de *Sprekelia formosissima* generadas de semillas expuestas a colchicina. A) Primer ensayo. B) Segundo ensayo.

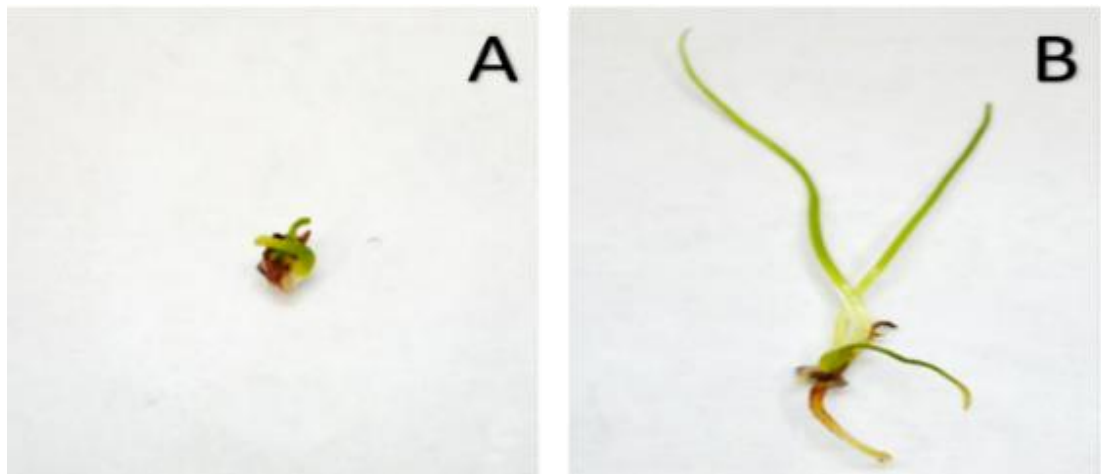


Figura 10. Plántulas de *Sprekelia formosissima*. A) Plántula generada de una semilla expuesta a colchicina. B) Plántula generada a partir de una semilla no tratada.

3.3.3 Inducción de poliploidía *in vivo*

3.3.3.1 Germinación de semillas

El 90 % de las semillas de *S. formosissima* germinaron de manera uniforme 8 dds (Figura 11). A los cuatro meses las plántulas obtuvieron de una a dos hojas de 2 mm de ancho con una altura de 15 cm y un bulbo de coloración café de 1 cm de longitud con 3 raíces aproximadamente.

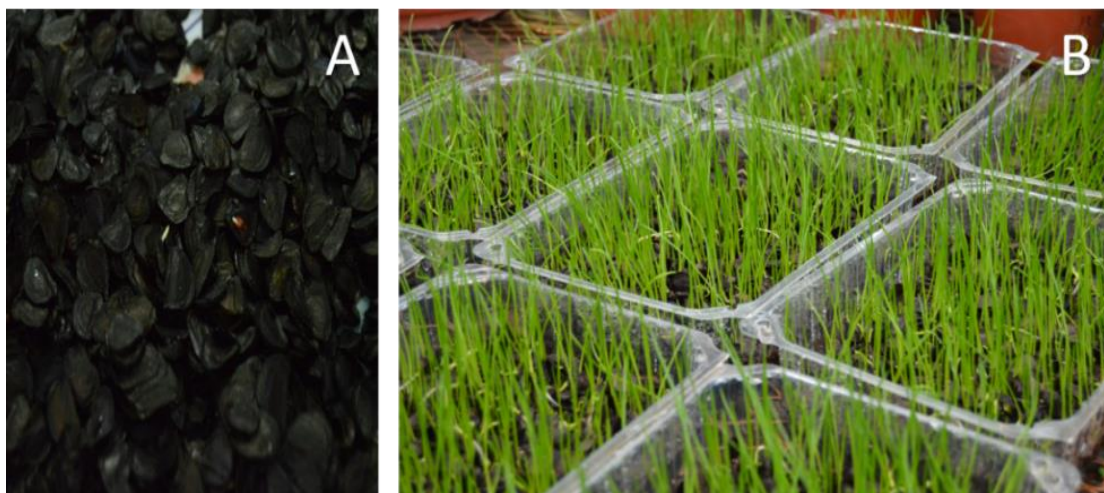


Figura 11. Germinación de semillas de *Sprekelia formosissima* en invernadero. A) Semillas recién cosechadas. B) Plántulas cultivadas en charolas.

3.3.3.2 Efectos del agente antimetabólico en las plántulas

Un mes después de la aplicación de los tratamientos, las hojas se tornaron amarillas y se desprendieron de las plántulas (Figura 12A), en tanto que los microbulbos quedaron en latencia y originaron hojas nuevas siete meses después de haber sido trasplantados (Figura 12 B).

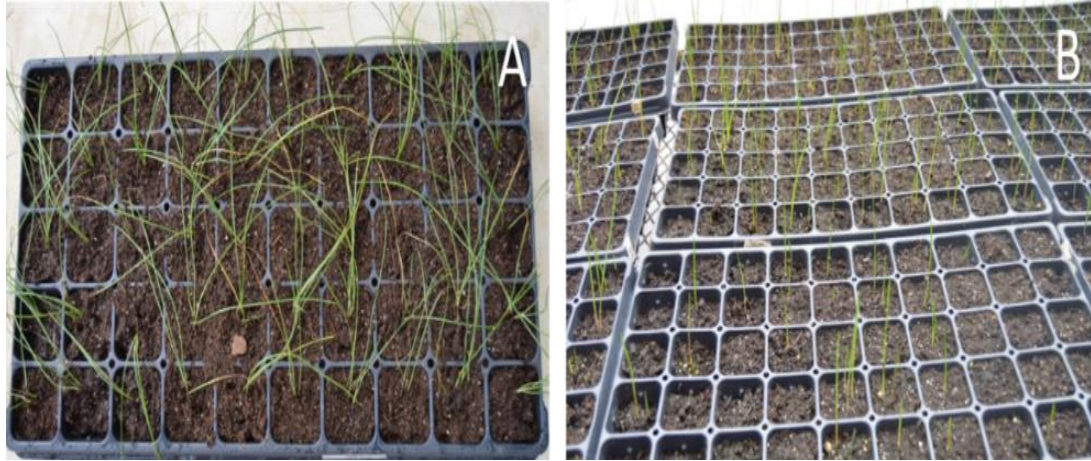


Figura 12. Plántulas de *Sprekelia formosissima* tratadas con colchicina. A) Amarillamiento y pérdida de hojas posterior a la aplicación de los tratamientos. B) Brotación de hojas en bulbos de plántulas tratadas, siete meses después del trasplante.

La colchicina y el tiempo de inmersión afectaron significativamente la supervivencia y la altura de las plántulas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Cuadros medios del análisis de varianza para el efecto de la exposición en colchicina en la supervivencia y altura de plántulas de *Sprekelia formosissima*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Supervivencia (%)	Altura (cm)
Tiempo de inmersión (T)	3	6736.70*	11513.41**
Concentración (C)	2	34100.654**	67562.01**
T*C	6	1900.33 ^{ns}	2004.98 ^{ns}

No significativo (^{ns}), significativo (*) y altamente significativo (**) $\leq P 0.05$.

El porcentaje de supervivencia menor (18.44) se obtuvo en plántulas sumergidas 48 h, estadísticamente distintas a las que estuvieron inmersas por 12 y 24 h (>30%), pero iguales a las sumergidas sólo por 6 h (Figura 13 A). Por efecto de la colchicina, la supervivencia disminuyó significativamente 16.9 y 24.1 % con 0.1 y 0.2 % del agente antimitótico, respectivamente, con relación a las plantas no tratadas, que tuvieron 42 % de sobrevivencia (Figura 13 B).

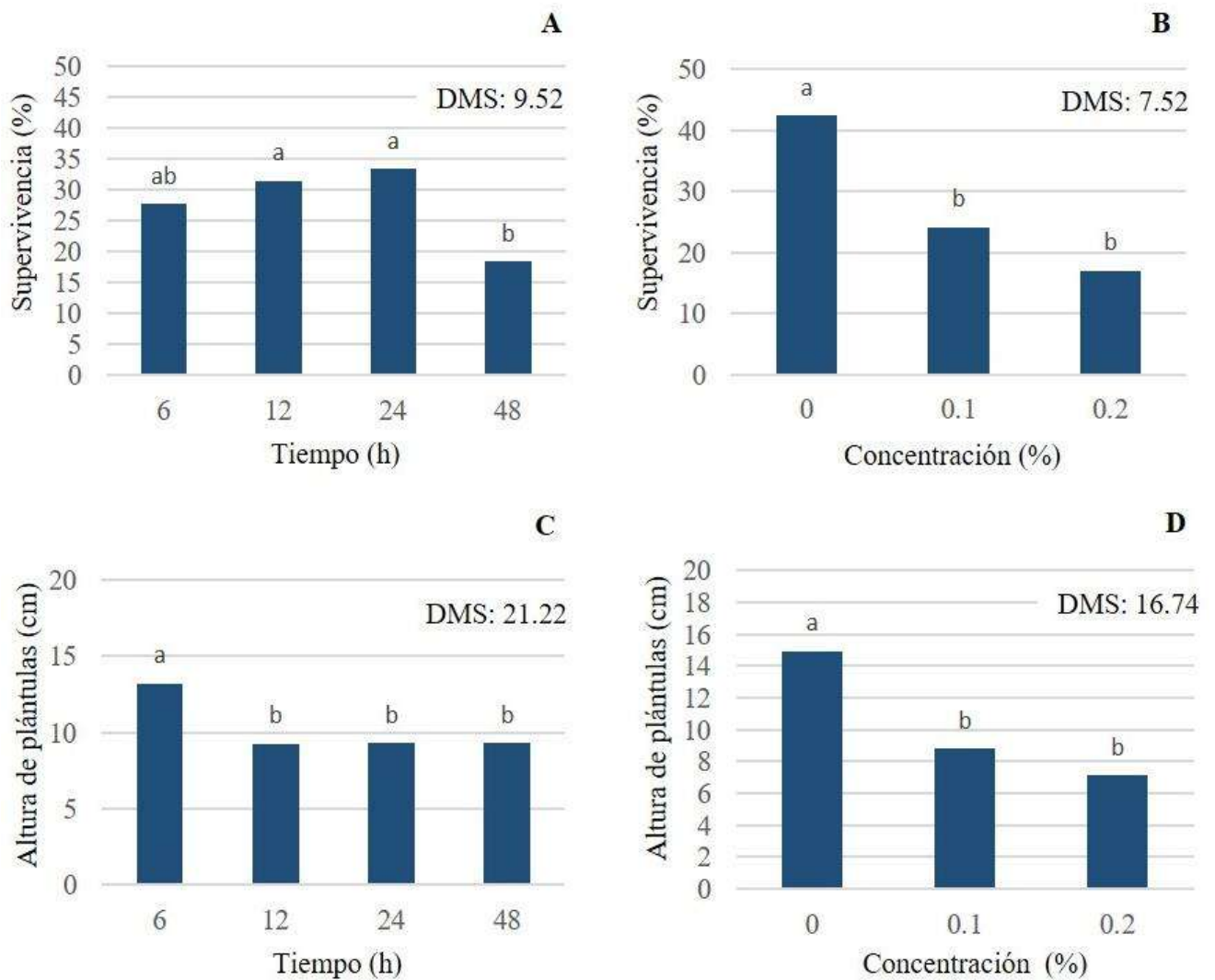


Figura 13. Influencia de tiempo de inmersión y concentración de colchicina en plántulas de *Sprekelia formosissima* tratadas con colchicina. A y B) Supervivencia, C y D) Altura de plántulas.

La inmersión por más de 12 h disminuyó 4 cm la altura de las plántulas (Figura 13 C), en tanto que con el agente antimitótico, éstas resultaron alrededor de 50 % más pequeñas (Figura 13 D).

La concentración de colchicina, el tiempo de inmersión y la interacción entre ambas resultaron significativas en el ancho y largo de estomas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto de la colchicina en el tamaño de estomas de *Sprekelia formosissima*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Tamaño de estomas (μm)	
		Ancho	Largo
Tiempo de inmersión (T)	3	28.55**	78.56**
Concentración (C)	2	59.99**	202.40**
T*C	6	20.62**	112.45**

** altamente significativo $\leq P 0.05$.

Las hojas de las plántulas tratadas con 0.2 % de colchicina durante 24 h tuvieron estomas de mayor tamaño, tanto de largo como de ancho, que las hojas de las plantas del resto de tratamientos (Figura 14 A y B). Los estomas de menor longitud se observaron en las plántulas tratadas con agua durante 12 h (Figura 14 A) y los menos angostos en hojas de plántulas tratadas con 0.2 % de colchicina por 24 h (Figura 14 B y Figura 15). Estos cambios morfológicos observados (Figura 16), estadísticamente significativos, indican que posiblemente haya habido modificaciones en el número cromosómico de las plántulas tratadas.

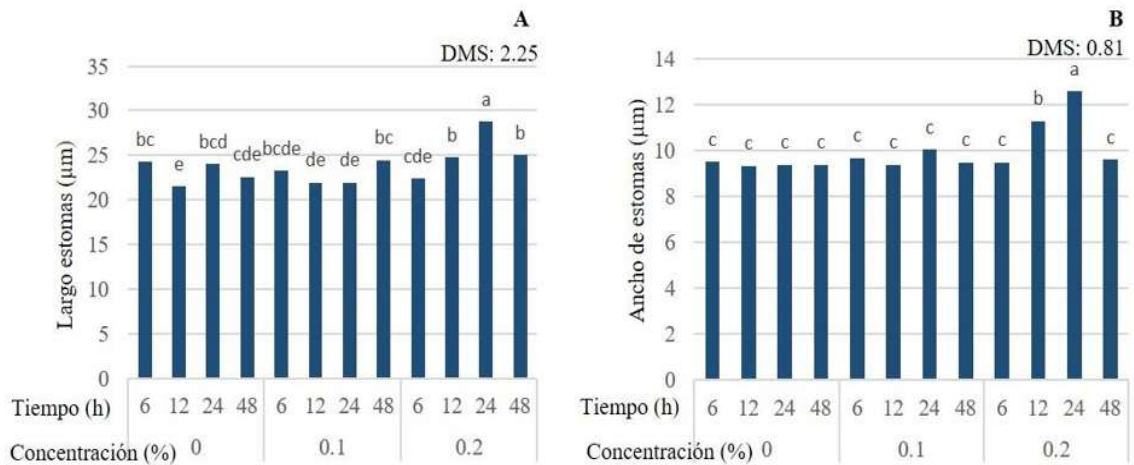


Figura 14. Estomas en hojas de plántulas de *Sprekelia formosissima*. A) Inmersas 6 h en agua y B) Con 0.2 % de colchicina por 24 h.

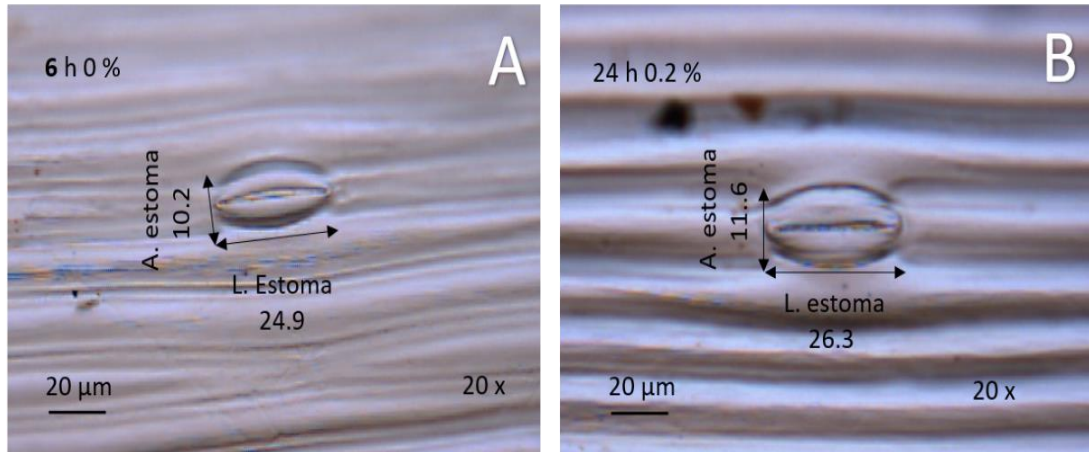


Figura 15. Estomas de *Sprekelia formosissima*. A) Tratamiento 6 h sin colchicina y B) Tratamiento de 24 h con 0.2 % de colchicina.



Figura 16. Plántulas de *Sprekelia formosissima*. A) Generada de una semilla tratada con colchicina al 0.2 % durante 12 h. B) Generada de una semilla no tratada.

3.3.4 Determinación de la germinación de semillas almacenadas *Sprekelia formosissima*

El periodo de almacenamiento influyó significativamente en el porcentaje de germinación *in vitro* de semillas de *S. formosissima*; la germinación mayor ocurrió en semillas con un mes de almacenamiento (97 %). Conforme transcurrió el tiempo de almacenamiento, la germinación disminuyó hasta llegar al 11 % cinco meses después (Figura 17).

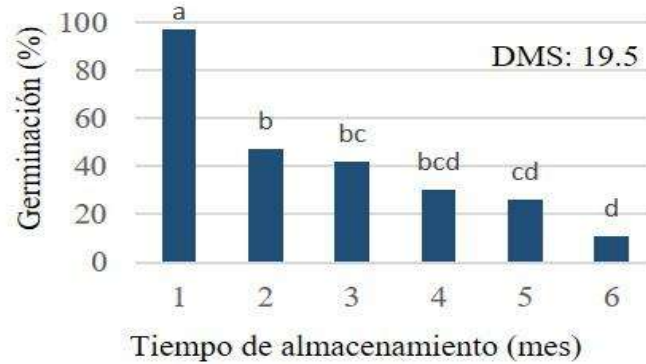


Figura 17. Efecto del periodo de almacenamiento en la germinación *in vitro* de semillas de *Sprekelia formosissima*.

3.3.5 Determinación de la viabilidad en semillas almacenadas de *Sprekelia formosissima*

Como en el caso anterior, y como era de esperarse, el tiempo de almacenamiento afectó la viabilidad de semillas de *S. formosissima*. Así, la viabilidad mayor (95 %) ocurrió en semillas con un mes de almacenamiento, Conforme transcurrió el tiempo, la viabilidad disminuyó hasta niveles menores del 30% dos meses después (Figura 18A).

Como las semillas no viables son inversamente proporcionales a las viables, la respuesta observada fue completamente contraria, como era de esperar. En cuanto a las semillas potencialmente viables, las mayores proporciones se encontraron en los meses 2, 3 y 4 con más de 46 % (Figura 18).

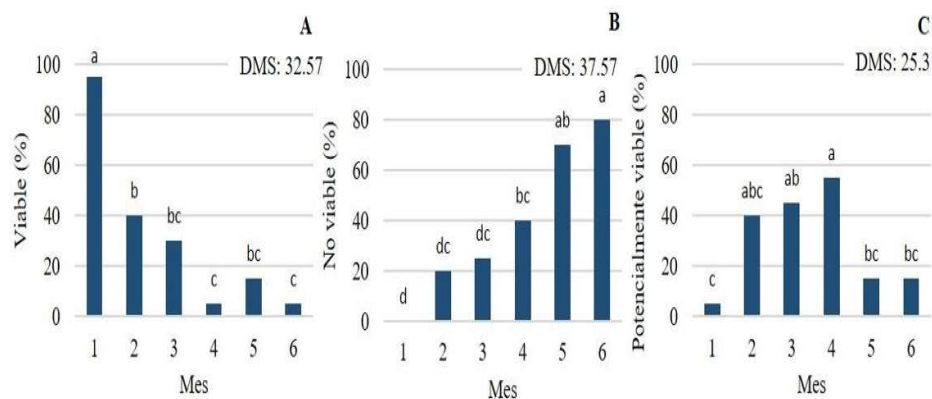


Figura 18. Viabilidad de semillas de *Sprekelia formosissima* almacenadas después de la colecta.

A) Semilla viables, B) Semillas no viables y C) Semillas potencialmente viables.

3.4 DISCUSIÓN

Se obtuvieron semillas de *S. formosissima in vitro* libres de contaminantes. Al aumentar las concentraciones de hipoclorito de sodio disminuyó el porcentaje de contaminación. Esto es debido a que el hipoclorito de sodio en soluciones acuosas se disocia en tres diferentes formas dicloro (Cl_2), ácido hipocloroso (HOCl) y ion hipoclorito (OCl^-) (Fukuzaki, 2006). El ácido hipocloroso tiene la capacidad de penetrar la bicapa lipídica en la membrana plasmática por difusión pasiva, reacciona con los doble enlaces peptídicos $\text{C}=\text{C}$ (Enlace amida) y daña al ADN; el ion hipoclorito aunque no puede difundirse a través de la membrana plasmática, ejerce una acción oxidante al exterior de la célula. Ambos son agentes oxidantes fuertes de acción germicida y de amplio espectro (Wu *et al.*, 2011).

En general, la inactivación de microbios por daño celular depende de la concentración de desinfectante (Do *et al.*, 2012). A medida que se incrementa la concentración de hipoclorito de sodio, existe menor incidencia de contaminación (Han *et al.*, 2016). En semillas de *Bursera graveolens* inmersas en hipoclorito de sodio al 75 %, encontraron que no se presenta contaminación (Pinta *et al.*, 2017). Se obtuvieron semillas *in vitro* de *S. formosissima* libres de contaminación cuando se desinfectaron con 30 y 35 % de hipoclorito de sodio, esto coincide con lo reportado por Soriano-Melgar *et al.*, (2016) en semillas de papaya sin mucilago (*Carica papaya* L.), en donde obtuvieron semillas *in vitro* libres de contaminantes con 30 % de hipoclorito comercial.

Las dosis bajas de hipoclorito de sodio no fueron efectivas en la desinfección de semillas de *S. formosissima* recolectadas en campo. Los desinfectantes afectan de manera diferente a los microorganismos (bacterias, hongos o virus) (Monsalve, 2018). Pinta *et al.*, (2017) indica que el hipoclorito de sodio es eficaz en la mayoría de las bacterias patógenas, pero es imprevisible contra hongos y virus. esto podría explicar la contaminación causada por el hongo *Dichobotrys* sp.

Las semillas de *S. formosissima* son muy sensibles al tiempo de inmersión en agua y colchicina, Ceballos y López (2008) indican que cuando las semillas se sumergen de forma prolongada, mueren por asfixia, falta de aireación y por exósmosis (osmosis del interior hacia afuera de la célula a través de las paredes) de enzimas y nutrientes. La muerte de las semillas expuestas a colchicina se debe al estrés y daño ocasionado al huso acromático de la célula (Heo *et al.*, 2016).

Un aspecto importante a considerar en los tiempos de inmersión de las semillas a colchicina es la impermeabilidad de algunas semillas por la presencia de cutinas, ligninas, quinonas y sustancias pécticas insolubles (Courtis, 2013). Aparentemente en semillas de *S. formosissima* la difusión de líquidos es rápida debido a la presencia de una cubierta membranosa muy fácil de penetrar por las soluciones antimitóticas y el agua.

La supervivencia de las semillas de *S. formosissima* es similar a lo descrito por Ren *et al.* (2018), donde la concentración más alta y el tratamiento más largo de la exposición a colchicina ocasionó la mayor letalidad. En *Dendranthema indicum* var. *aromaticum* se observaron porcentajes de mortalidad del 76.33 % al exponer semillas en colchicina a dosis de 0.1, 0.2, 0.5, 1 y 2 mg L⁻¹ durante 12, 24 y 48 h, donde el mayor porcentaje de mortalidad se presentó en la dosis y tiempo más alto (2 mg L⁻¹ 48 h). Mientras que en *Asparagus officinalis* var. *de Paoli* se observaron porcentajes de mortalidad del 100 % al exponer semillas en colchicina a (0.35 %) durante 64 h, la mortalidad disminuyó a la mitad cuando se redujo el tiempo a 8 h y se obtuvieron los porcentajes de 40 y 36.67 % en los tiempos de 4 y 2 h respectivamente (Chen *et al.*, 2020).

Al reducir seis veces los tiempos de inmersión de las semillas de *S. formosissima* en colchicina, la supervivencia aumento un 26.9 % en promedio. Sin embargo, el porcentaje aún es bajo esto se puede explicar por la poca adaptabilidad de las semillas a tolerar largos tiempos de inmersión debido a que esta planta esta presente en lugares con poca disponibilidad de agua (Borys *et al.*, 1999). De manera que el exceso de agua genera una respuesta negativa al ocasionar estrés por la falta de oxígeno soluble y difusible en el agua (hipoxia e inoxia) (Thani *et al.*, 2016).

La pérdida del 24 % en la germinación de las semillas testigos entre el primer y el segundo ensayo, se puede deber a la rapidez con la que esta semilla pierde la viabilidad, esta perdida

puede deberse a la falta de integridad de las membranas celulares de las semillas, por disminución de fosfolípidos, carbohidratos y proteínas, lo que provoca que la estructura y funcionamiento de las semillas se modifique (Melo y Cuamatzi, 2008).

El porcentaje de las semillas de *S. formosissima* supervivientes fue menor al 50 % en ambos experimentos. Es posible que las plantas obtenidas de las semillas supervivientes a la exposición a colchicina a (0.01, 0.2 y 0.3 % p/v) por 12, 24 y 48 h y 2, 4 y 8 h sean mutantes. Leitão (2012) indica que la tasa de mutación más alta puede ser lograda a dosis letales que pueden causar 25 a 50 % de letalidad (DL₅₀).

Las plantas obtenidas de las semillas *in vitro* de *S. formosissima* tratadas con 0.2 % y 0.3 % por 4 h y 2 h respectivamente, obtuvieron disminución en el tamaño de hojas, esto puede ser un indicativo indirecto de la obtención de plantas poliploides, en especies como *Lobularia maritima* la altura de las plantas tetraploides se redujo en promedio 30.2 % resultó significativamente menor a la altura de las plantas diploides (Huang *et al.*, 2015), también es conocido en la inducción de poliploides la reducción de estructuras foliares como en *Dendranthema indicum* var. *Aromaticum* en donde las plantas obtuvieron reducción en el tamaño de las hojas en individuos tetraploides (38.64 cm) en comparación con las plantas diploides 47.85 cm (He *et al.*, 2016).

El desarrollo lento de plántulas obtenidas de semillas tratadas con diferentes concentraciones y tiempos de exposición se debe al efecto morfofisiológico, ya que las células al tener mayor volumen nuclear consumen más energía y requieren más tiempo para la duplicación de ADN (Jadrná *et al.*, 2010), por lo que las plántulas de *S. formosissima* no ha alcanzado su desarrollo final.

La disminución del tamaño de las plántulas obtenidas de semillas que se sumergieron en agua durante 4 y 8 h se puede deber a que la inmersión prolongada ocasiona daños en las células empalizadas, las cuales disminuyen su tamaño y generan espacios intercelulares en el mesófilo esponjoso y ocasiona una capa delgada en las células epidérmicas (Vanden y Goffinet, 2008).

S. formosissima es una especie xerófila que esta presente en los bosques tropicales caducifolios (Silva-Sáenz, 2017), estos ambientes se caracterizan por una estación seca muy marcada, seguida por un periodo de lluvias, la alta sincronización de la especie a los periodos de lluvia podría explicar la rápida germinación del 90 % de sus semillas a los 8 días después de su siembra.

Algunas plantas presentan adaptaciones a los periodos de sequías, en *S. formosissima* las hojas se pierden de manera natural como parte de su ciclo anual, debido a la poca disponibilidad de agua. Sin embargo, en las plántulas tratadas con colchicina en invernadero obtuvieron perdida de sus hojas, esto se pudo deber a la inactivación en concentración de auxinas causada por la inhibición de mitosis (Mahure *et al.*, 2010), esto provoco la muerte de las hojas y un aumento en el periodo de rebrotación.

La menor supervivencia de los bulbillos (18 %) sometidos a inmersión de colchicina se encontró en 0.2 % de colchicina, resultados similares se observaron en bulbos de lili (*Lilium leichtlini* var. *Maximowiczii*), con 0.2 % de colchicina, donde se encontró la menor supervivencia (66 %) y el mayor indice en producción de poliploides. La mortalidad a causa de los cambios provocados en el ADN de las células, puede ser un indicador importante para evaluar la eficiencia de inducción de la poliploidía después de sumerigir los bulbos en colchicina (Heo *et al.*, 2016).

Las plántulas supervivientes obtenidas de las semillas *in vitro* de *S. formosissima* tratadas con colchicina al 0.1 % y 0.2 % por 12 h y 48 h fueron más pequeñas que las plantas testigo, resultados similares se obtuvieron en plántulas obtenidas de semillas de níspero (*Eriobotrya japonica*), tratados con colchicina (0.1 %, 0.3 % y 0.5 % p/v) y sembrados en un medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), las plantas tetraploides obtuvieron una altura menor (54 cm) en comparación con las plantas diploides (72.8) (Blasco *et al.*, 2015).

Muchas de las especies que expuestas a colchicina han mostrado un aumento en el tamaño de los estomas, debido a esto se puede pensar que la medición de estomas es un parametro confiable en la primera selección de individuos poliploides (Xie *et al.*, 2015). Se observó un incremento

en el largo (28.7 μm) y ancho (12.66 μm) de los estomas de las hojas de *S. formosissima*, resultado similares se obtuvieron en *Lobularia marítima* sumergidas a concentraciones de 0.05 % (p/v) por 48 h, en donde el largo y el ancho de sus estomas de plantas identificadas como tetraploides fueron mayores (31.75 \pm 1.68) (13.25 \pm 1.20) en comparación con plantas diploides (15.75 \pm 1.20) (7.75 \pm 0.79) respectivamente (Huang *et al.*, 2015). En *Kalanchoe daigremontiana* se observó un incremento en el largo y ancho de sus estomas en plántulas de 1 cm expuestas a la concentración (0.025 % y 0.10 %) en los tiempos de exposición (24 y 48 h) (Salazar *et al.*, 2018).

A pesar que las plantas obtenidas de los experimentos presentarán cambios típicos de individuos poliploides, es necesario comprobar los niveles de ploidía por medio de técnicas como el “squash”.

Las semillas de *S. formosissima* almacenadas, obtuvieron una rápida disminución en la germinación. Ceballos y López (2008), indican que a temperatura ambiente las semillas continúan con los procesos de respiración e incrementan la tasa metabólica, dando lugar a la oxidación o destrucción de algunos lípidos, proteínas y enzimas, causa el deterioro de la semilla y hasta la muerte del embrión y afectan la germinación. La disminución de la viabilidad en semillas de *S. formosissima* a temperatura ambiente, se relaciona a sus altos contenidos de humedad, que la distingue como una semilla recalcitrante, estas semillas pierden su viabilidad cuando su contenido de humedad cae por debajo del 20 – 30 % (Pritchard, 2004). La viabilidad de las semillas depende de las condiciones de almacenado y de factores como la temperatura, la humedad, la presión de oxígeno y organismos como bacterias, hongos, insectos y roedores (Gallo *et al.*, 2006).

3.5 CONCLUSIONES

Se lograron establecer semillas de *S. formosissima in vitro* libres de contaminantes, las mejores dosis fueron 30 y 35 % de hipoclorito de sodio.

Con 0.3 % de colchicina durante 2 h de exposición y con 0.2 % del antimitótico por 24 horas se obtuvieron los mayores cambios asociados con poliploidía *in vitro* e *in vivo*, en *S. formosissima*.

Los principales cambios morfológicos observados en las plantas fueron la disminución de la altura de las plantas tratadas *in vitro* e *in vivo*, así como el incremento en el tamaño de los estomas.

Ambas características están relacionadas con cambios asociados a la ploidia de las plantas, pero es necesario un estudio citométrico que lo confirme.

La sensibilidad de las semillas al medio acuoso indica que la técnica *in vitro* podría mejorarse disminuyendo el periodo de inmersión.

La supervivencia de las plántulas fue menor *In vitro* que *in vivo*, pero en ambos casos, se detectaron variaciones morfológicas.

Las semillas de *S. formosissima* pierden más del 50 % de su viabilidad a partir del tercer mes de almacenamiento, por ello, es importante desarrollar un protocolo de almacenamiento de semillas de esta especie para aumentar su periodo de viabilidad.

3.6 BIBLIOGRAFÍA

- Baeza C. M., P. Novoa, E. Ruiz and M. A. Negritto. 2009. **El cariotipo fundamental en *Traubia modesta* (Phil.) Ravenna (Amaryllidaceae).** *Gayana. Botánica*, 66 (2):297-300
- Balode, A. 2008. **Investigation of polyploidy in the breeding of lilies (*Lilium* spp.).** In *Research for Rural Development. International Scientific Conference Proceedings* 347-352
- Barnett H. L., and B. B. Hunter 1998. **Illustrated genera of imperfect fungi.** Minnesota. The American Phytopathological Society. 200 pp.
- Blasco M., M. L. Badenes, and M. Naval. 2015. **Colchicine-induced polyploidy in loquat (*Eriobotrya japonica*) (Thunb.) Lindl.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*120 (2): 453-461.
- Borys, M. W., H. Leszczyńska-Borys y J. L. Galván. 1999. **Observaciones sobre la floración en *Sprekelia formosissima* (L.) Herbert.** *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5:153-158.
- Ceballos A. J., y J. A. López. 2008. **Conservación de la calidad de semillas forestales nativas en almacenamiento.** *Cenicafé* 58 (4): 265-292.
- Chen C., X. Hou, H. Zhang, G. Wang and L. Tian. 2011. **Induction of *Anthurium andraeanum* “Arizona” tetraploid by colchicine *in vitro*.** *Euphytica* 181 (2):137–145
- Chen, H., Lu, Z., Wang, J., Chen, T., Gao, J., Zheng, J. and Yi, K. 2020. **Induction of new tetraploid genotypes and heat tolerance assessment in *Asparagus officinalis* L.** *Scientia Horticulturae*. 264:109-168.
- Courtis, A. C. 2013. **Cátedra de Fisiología Vegetal.** *Fisiología Vegetal* 1: 1-22.
- Do, V.T., C. Y. Tang, M. Reinhard and J. O. Leckie. 2012. **Effects of chlorine exposure conditions on physiochemical properties and performance of a polyamide membrane-mechanisms and implications.** *Environmental Science y Technology* 46 (24): 13184-13192.

- El-Nashar Y. I. and M. H. Ammar. 2016. **Mutagenic influences of colchicine on phenological and molecular diversity of *Calendula officinalis* L.** *Genetics and Molecular Research* 15 (2): 1-15.
- Eng, W. H., and W. S. Ho. 2019. **Polyploidization using colchicine in horticultural plants: A review.** *Scientia horticulturae* 246: 604-617.
- Fukuzaki S. 2006. **Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes.** *Biocontrol science* 11 (4): 147-157.
- Gallo, C., R. M. Craviotto y M. R. Arango. 2006. **Germinación y sanidad de semillas: su uso en la evaluación de la calidad de semillas de soja.** Congreso de Soja del Mercosur. Bolsa de Comercio de Rosario. Buenos Aires, Argentina. p. 174
- Ghani A., S. H. Neamati, M. Azizi, M. J. Saharkhiz and M. Farsi. 2014. **Artificial autotetraploidy induction possibility of two Iranian endemic mint (*Mentha mozaffarianii*) ecotypes.** *Notulae Scientia Biologicae* 6 (2), 185-191.
- Han X., Z. Wang, X. Wang, X. Zheng, J. Ma and Z. Wu. 2016. **Microbial responses to membrane cleaning using sodium hypochlorite in membrane bioreactors: cell integrity, key enzymes and intracellular reactive oxygen species.** *Water research*. 88: 293-300.
- He M., W. Gao, Y. Gao, Y. Liu, X. Yang, H. Jiao and Y. Zhou. 2016. **Polyploidy induced by colchicine in *Dendranthema indicum* var. *Aromaticum*, a scented chrysanthemum.** *European Journal of Horticultural Science* 81 (4): 219-226.
- Heo J. Y., S. H. Jeong, H. R. Choi and S. M. Park. 2016. **Polyploid Production in *Lilium Leichtlinii* var. *Maximowiczii* Using Colchicine.** *The Journal of Animal and Plant Sciences*. 26 (4): 1111-1116.
- Huang R., D. Liu, M. Zhao, Z. Li, M. Li and S. Sui. 2015. **Artificially induced polyploidization in *Lobularia maritima* (L.) Desv. and its effect on morphological traits.** *HortScience* 50 (5): 636-639.

- Jadrná P, O. Plavcová and F. Kobza. 2010. **Morphological changes in colchicine-treated *Pelargonium × hortorum* L.H. Bailey greenhouse plants.** *Horticultural Science* 37 (1): 27-33.
- Leitão J.M. 2012. **Chemical mutagenesis.** In: Shu, Q.Y., Forester, B.P., Nakagawa, H. (Eds.), **Plant Mutation Breeding and Biotechnology.** CABI and FAO. Pp. 135–158.
- Mahure H. R., M. L. Choudhary, K. V. Prasad and S. K. Singh, S. K. 2010. **Mutation in chrysanthemum through gamma irradiation.** *Indian Journal Horticulture.* 67: 356-358.
- Matos Á. 2014. **Efecto de diferentes concentraciones y tiempos de exposición de la colchicina en plantas de zábila [*Aloe vera* (L.) Burm. f.] *in vivo.*** *Multiciencias* 14 (4): 382-388.
- Manzoor A., T. Ahmad, M. A. Bashir, I. A. Hafiz and C. Silvestri. 2019. **Studies on colchicine induced chromosome doubling for enhancement of quality traits in ornamental plants.** *Plants* 8 (7): 194.
- Melo RV, Cuamatzi T. 2008. **Bioquímica de los procesos metabólicos.** 2a ed. Ed. Reverté. México. pp. 406
- Moratinos H., M. Peñaloza, Z. Flores, M. Avila y A. González-Vera. 2018. **Prueba topográfica por tetrazolio (TZ) en semillas de soya.** *Revista de la Facultad de Agronomía,* (73): 114-122.
- Murashige T. and F. Skoog. 1962. **A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture.** *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Pinta D. M., V. H. E. Guamán, D. U. González-Zaruma, J. A. Moreno-Serrano, J. E. Minchala-Patiño, M. Yaguana-Arévalo and M. G. Sinche-Freire. 2017. **Procesos biotecnológicos para la proliferación y enraizamiento *in vitro* de *Bursera graveolens* (kunth) triana & planch (palo santo), provenientes del bosque seco de la provincia de Loja.** *Bosques Latitud Cero* 6 (1): 1-16.
- Pirkoohi M. H., M. Keyvanloo, and M. Hassanpur. **Colchicine induced polyploidy in mint by seed treatment.** *International Journal Agriculture Crop Sciences* 2011, 3, 102–104.

- Pritchard, H. W. y J: B. Dickie. 2003. **Predicting seed longevity: the use and abuse of seed viability equations.** (Ed.) **Seed Conservation.** West Sussex. UK. pp. 655-721.
- Rameshsing, C. N., S. N. Hegde, M. R. Wallalwar and M. Vasundhara. 2015. **Crop improvement in stevia (*Stevia rebaudiana* Beroni) through colchicine.** *Research in Environment and Life Sciencies* 8 (2): 393-396.
- Ren J., X. Wu, C. Song, Y. Liang, W. Gao and Y. Wang. 2018. **Induction of Polyploid Tilled Onion using Colchicine and Pendimethalin.** *Sains Malaysiana.* 47(11): 2617-2624.
- Rzedowski G. C. de y J. Rzedowski. 2005. **Flora fanerogámica del Valle de México.** Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán. 1256 pp.
- Sajjad, Y., M. J. Jaskani, A. Mehmood, I. Ahmad and H. Abbas. 2013. **Effect of colchicine on *in vitro* polyploidy induction in African marigold (*Tagetes erecta*).** *Pakistan Journal of Botany* 45 (3): 1255- 1258.
- Salazar S. A., G. L. Valderrama and J. D. Quintero. 2018. **Efecto de la colchicina sobre la morfología foliar y los estomas de *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier (*Crassulaceae*).** *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 12 (1): 212-222.
- Salinas A. R., A. M. Yoldjian, R. M. Craviotto y V. Bisaro. 2001. **Pruebas de vigor y calidad fisiológica de semillas de soja.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36 (2): 371-379.
- SAS Institute. 2002. SAS/STAT. User's Guide, versión 9.0. **Statistical Analysis System Institute.** Cary, N. C. USA. 4424 pp.
- Sattler M. C., C. R. Carvalho and W.R. Clarindo. 2015. **The polyploidy and its key role in plant breeding.** *Planta* 243 (2): 281-296.
- Shu Q. Y., B. Forster, H. Nakagawa. 2012. **Plant Mutation Breeding and Biotechnology.** CABI, Oxfordshire, Rome, Italy. 428-429 pp.
- Silva-Sáenz P. 2017. **Flora del bajío y de regiones adyacentes.** Instituto de Ecología A.C. Centro Regional del Bajío Pátzcuaro, Michoacán, México. 51 pp.

- Soriano-Melgar L. L. A., L. Alcaraz-Meléndez, M. Rodríguez-Álvarez y S. Real-Cosío. 2016. **Colecta y conservación *in vitro* y *ex situ* de recursos fitogenéticos de *Carica papaya* L.** *Agroproductividad* 9 (4): 28-32.
- Vanden, J. and M. Goffinet. 2008. **The effects of flood initiation timing and water temperature during flooding on nonstructural carbohydrate concentration and anatomy of Cranberry.** *HortScience*. 43 (2): 338-345.
- Vichiato, M. R., M. Vichiato, M. Pasqual, F. A. Rodrigues and D. M. Castro. 2014. **Morphological effects of induced polyploidy in *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae).** *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 14 (3): 154-159.
- Xie, X., C. B. Agüero, Y. Wang and M. A. Walker. 2015. ***In vitro* induction of tetraploids in *Vitis x Muscadinia* hybrids.** *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 122 (3): 675–683.
- Wu D., H. You, R. Zhang, C. Chen y D. J. Lee. 2011. **Inactivation of *Amphidinium* sp. in ballast waters using UV/Ag-TiO₂+ O₃ advanced oxidation treatment.** *Bioresource technology* 102 (21): 9838-9842.
- Yang, N., E. Rong, Q. Li, J. Dong, T. Du, X. Zhao and Y. Wu. 2015. **Tetraploid induction and identification of *Gossypium arboreum*.** *Agricultural Science* 6 (4):436–444.

CAPÍTULO IV

VI. Soluciones nutritivas y citocininas en el desarrollo de plantas de *S. formosissima*

RESUMEN

S. formosissima es una planta silvestre que se extrae de su hábitat para su cultivo en macetas, se desconocen técnicas de reproducción y manejo de soluciones nutritivas para su óptimo desarrollo. En un primer experimento se evaluó la respuesta de plantas adultas de *S. formosissima* a diferentes concentraciones de solución nutritiva Steiner (0, 25, 50, 75 y 100 %) en combinación con TDZ (0, 0.25 y 0.5 mg L⁻¹). Tres meses después de la primera aplicación se realizó una medición del índice de verdor (Lectura SPAD) y la medición del ancho de las hojas (mm). En un segundo experimento se evaluó el efecto del TDZ en tipos de cortes de bulbos de *S. formosissima*, en condiciones de invernadero. Las variables evaluadas a los cuatro meses fueron el número de brotes, número de hojas, diámetro de bulbo y tamaño de raíz. Con los datos obtenidos se efectuó un análisis de varianza ($P \geq 0.05$) y una prueba de Tukey para la comparación de medias. Para el primer experimento el tratamiento con la mayor intensidad de verdor se encontró con la concentración de 100 % de solución Steiner en combinación de 0.25 mg L⁻¹ de TDZ. Las hojas más anchas se desarrollaron con la concentración de solución Steiner al 75 % con 0.5 mg L⁻¹ de TDZ. Para el segundo experimento el mayor número de brotes se generaron con el tipo de corte longitudinal-transversal con la concentración 0.25 mg L⁻¹ de TDZ. Para el número de hojas y tamaño de raíces se encontraron diferencias significativas en el número de hojas cuando se aplicó 0.25 mg L⁻¹ de TDZ.

Palabras clave: Solución Steiner, TDZ, cortes bulbos, invernadero.

4.1 INTRODUCCIÓN

Sprekelia formosissima cuenta con un órgano subterráneo formado por un bulbo escamoso constituido por hojas modificadas que se agrupan en torno a un disco basal (Ortega-Blu *et al.*, 2006). Este bulbo sirve para el almacen de agua, reservas, hormonas y nutrimentos (Kamenetsky y Okubo, 2013).

El tamaño de los bulbos se relaciona directamente con el rendimiento de la planta y la floración (Vallejo *et al.*, 2017). Además, Rodríguez-Mendoza *et al.* (2011), mencionan que las reservas nutrimentales con las que cuentan las plantas bulbosas, no son suficientes para garantizar la calidad de los tallos florales, ya que la calidad de la flor aumenta con la aplicación de soluciones nutritivas.

Numerosas soluciones nutritivas han sido formuladas para hacer crecer plantas en cultivo sin suelo, y su composición química varía ampliamente, Steiner estableció el concepto de relación mutua entre los aniones y entre los cationes, y elaboró una solución nutritiva universal (Moreno *et al.*, 2015). De acuerdo con Steiner (1984), de los 17 nutrimentos reconocidos como esenciales para las plantas, generalmente el productor de plántulas aplica una solución nutritiva que contiene 12 nutrimentos N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Cu, Zn, Mn, B y Mo (Parra-Terraza, 2016). El N es un elemento primario en las plantas, componente del DNA, RNA, proteínas, enzimas, clorofila, ATP, auxinas y citoquininas (Hawkesford *et al.*, 2012). El P y K se trasladan del bulbo hacia la parte aérea para iniciar el crecimiento del cultivo aumentar su área fotosintética (Ortega-Blu *et al.*, 2006). El crecimiento de las plantas también se puede regular con fitohormonas, como el tiazuron (TDZ) (N-phenyl-N'-1,2,3- thiadiazol-5-ylurea), producto químico que ha demostrado alta actividad como citocinina (Pai y Desai, 2018). La aplicación de soluciones nutritivas (SN) tiene que ser acorde a las necesidades de cada especie (Wang *et al.*, 2015), debido a esto, es importante conocer la concentración de Solución Steiner para *S. formosissima*.

El TDZ está vinculado a la división celular, crecimiento de las plantas, formación de yemas adventicias, contenido de clorofila a través de la diferenciación de cloroplastos y por consiguiente la capacidad fotosintética y la inducción de brotes (Ángeles- Espino *et al.*, 2012).

Otra manera de inducir brotes en plantas bulbosas es por activación del mecanismo hormonal provoca por heridas en la parte basal de las bulbosas, para inducir la reacción de las yemas axilares (Rodríguez, 2016).

Con base en lo expuesto, puede suponerse que con el uso de SN, TDZ e incisión de los bulbos de plantas adultas de *S. formosissima* se pueden generar avances importantes en el manejo agronómico de la especie y su reproducción asexual, que de manera natural es muy lenta. Por ello, los objetivos de esta investigación fueron:

4.1.1 Objetivo General

Desarrollar tecnología para el cultivo y propagación asexual de *S. formosissima*.

4.1.2 Objetivos específicos

- Determinar la proporción más adecuada de la solución nutritiva de Steiner, para el desarrollo y cultivo de *S. formosissima*.
- Encontrar la dosis óptima de TDZ para la propagación de *S. formosissima*.
- Identificar el tipo de corte del bulbo asociado con la mejor respuesta en la propagación asexual de *S. formosissima*.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Influencia de la solución nutritiva y el tidiazuron en el desarrollo de *Sprekelia formosissima*

Bulbos de plantas adultas de *S. formosissima* se colocaron en macetas de plástico de 3.92 L de capacidad con suelo andosol (topure).

Se aplicaron 12 tratamientos, resultantes de la combinación de cuatro niveles de la SN de Steiner (0, 50, 75 y 100 % de su concentración de sales) con tres de TDZ (0, 0.25 y 0.5 mL⁻¹), en un arreglo factorial establecido en un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones, donde la unidad experimental fue una planta. Como fuente de TDZ se usó Revent 500® (42 % de ingrediente activo). Las soluciones nutritivas se prepararon a partir de fertilizantes comerciales (Cuadro 5).

Cuadro 5. Fertilizantes comerciales utilizados para preparar la solución nutritiva de Steiner.

Fertilizante comercial (g 20 L de agua)	Proporción de la solución nutritiva de Steiner (%)		
	50	75	100
Nitrato de calcio	10.6	15.9	21.2
Nitrato de potasio	3.0	4.5	6.0
Sulfato de potasio	2.6	3.9	5.2
Sulfato de magnesio	4.9	7.3	9.8
Fosfato de potasio	1.2	3.6	4.8
Quelatos	0.2	0.2	0.2

Las plantas se regaron con 300 mL de solución nutritiva una vez por semana. El TDZ se aplicó disuelto en la misma cantidad de agua (300 mL), en tres ocasiones, a intervalos de tiempo semanales. Durante el desarrollo del experimento, la temperatura y humedad relativa promedio en el invernadero fue de 30 °C y 23 %, respectivamente.

Se evaluaron el índice de verdor y el ancho de la hoja. El índice de verdor se cuantificó con un Spad Minolta 502, 13 semanas después de establecido el experimento, en cinco hojas tomadas al azar, en las cuales se realizaron tres lecturas de cada una. Tres meses después se evaluó el ancho de hojas (mm) con un vernier digital, en la parte media de la misma, en 10 hojas tomadas al azar.

4.2.2 Efecto del tidiazuron en tipos de cortes de bulbos de *Sprekelia formosissima* en invernadero

A 32 plantas de *S. formosissima* se le cortaron las hojas y raíces, se desprendieron las catafilas externas de coloración café y se realizó un enjuague con agua. Se evaluaron ocho tratamientos conformados por cuatro tipos de corte (bulbo completo, corte transversal, corte longitudinal y corte transversal-longitudinal) y dos niveles (0 y 0.25 mg L⁻¹) de tidiazuron (Figura 19), en un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones, donde la unidad experimental fue un bulbo. Los bulbos seccionados se colocaron en macetas de cuatro pulgadas, en sustrato compuesto de corteza de pino, perlita y peat moss en proporciones 3:1:1 respectivamente. Una vez por semana la mitad de los bulbos (16) se regaron con agua corriente y la otra mitad se regó con 0.25 mg L⁻¹ de TDZ. Cuatro meses después de establecido el experimento se contó el número de brotes y hojas, con un vernier se midió el diámetro de los nuevos bulbos y el tamaño de raíz.

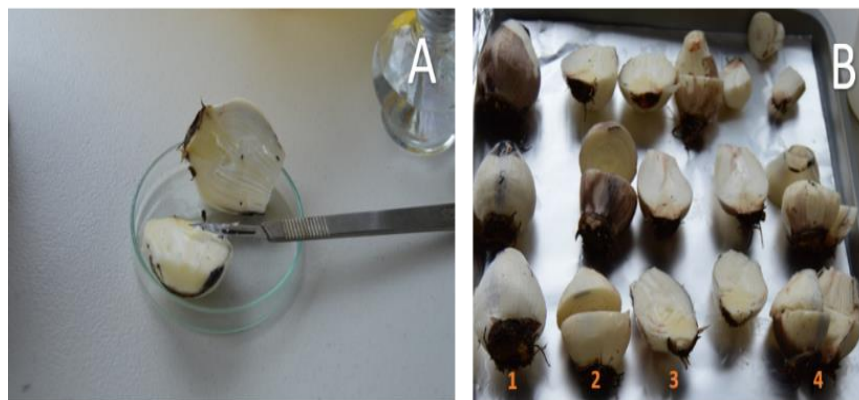


Figura 19. Manejo de bulbos de *Sprekelia formosissima* para su propagación asexual. A) Corte de bulbos B) Forma de cortes 1) bulbos completos 2) corte transversal 3) corte longitudinal y 4) corte longitudinal-transversal.

4.2.3 Análisis estadístico

Con los datos obtenidos de las variables de respuesta se realizó un análisis de varianzay la prueba de Tukey para las comparaciones de medias entre tratamientos, con el programa estadístico SAS versión 9.0 (Statistical Analysis System, 2002).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Efecto de la solución nutritiva y tidiazuron sobre el desarrollo de plantas de *Sprekelia formosissima*

La interacción solución Steiner por TDZ resultó significativa en el índice de verdor (Lectura SPAD), en tanto que la proporción de la solución Steiner y el nivel de TDZ sólo o combinados también fueron significativos en el ancho de las hojas (Cuadro 6).

Cuadro 6. Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto de la solución Steiner y TDZ en el verdor y ancho de hojas de *Sprekelia formosissima*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Hojas <i>Sprekelia formosissima</i>	
		Índice de verdor (Lectura SPAD)	Ancho
Solución nutritiva (SN)	3	248.10 ^{ns}	21.82*
Tidiazuron (TDZ)	2	831.59 ^{ns}	99.46**
SN*TDZ	6	848.07*	34.22**

No significativo (^{ns}), significativo (*) y altamente significativo (**) $\leq P 0.05$

En el verdor de las hojas, sólo se detectaron diferencias significativas entre las plantas tratadas con el 100% de la SN y 0.25 mg L⁻¹ de TDZ (50 % más verdes), y a las que se les aplicó 75 % de SN y 0.25 mg L⁻¹ de TDZ (Figura 20 A).

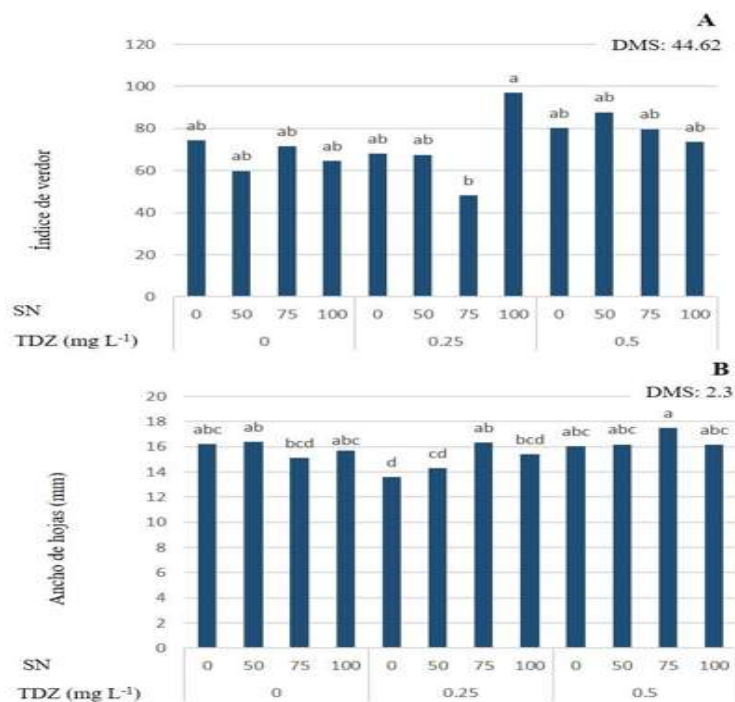


Figura 20. Efecto de la solución Steiner y TDZ. A) Verdor (Lectura SPAD). B) Ancho de hojas en plantas de *Sprekelia formosissima*.

En el ancho de hoja, por su parte, las plantas con SN al 75 % y 0.5 mg L⁻¹ tuvieron hojas más anchas (17.4 mm); en cambio (Figura 20 B), las que fueron tratadas sin SN y 0.25 mg L⁻¹ de TDZ, presentaron las hojas más angostas (13.6 mm).

4.3.2 Efecto del tidiazuron en tipos de cortes de bulbos de *Sprekelia formosissima* en invernadero

La concentración de TDZ y el tipo de corte sólo afectaron significativamente el número de brotes y hojas. El tamaño de la raíz únicamente fue afectado por la concentración de TDZ (Cuadro 7).

Cuadro 7. Cuadrados medios del análisis de varianza para el tipo de corte y la dosis de TDZ en cuatro variables de desarrollo en *Sprekelia formosissima*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Número de brotes	Diámetro de nuevos bulbos	Número de hojas	Tamaño raíz
Concentración de TDZ	1	34.03*	20.84 ^{ns}	91.12**	16016.92*
Corte	3	124.36**	72.88 ^{ns}	220.70*	1111.40 ^{ns}
Concentración*Corte	3	11.86 ^{ns}	41 ^{ns}	12.87 ^{ns}	340.88 ^{ns}

No significativo (ns), significativo (*) y altamente significativo (**) $\leq P 0.05$.

El tipo de corte longitudinal-transversal obtuvieron el mayor número de brotes, en promedio los bulbos iniciales generaron 6.9 bulbos nuevos. Los bulbos enteros que no generaron brotes nuevos y el número de brotes incremento a 4.5 cuando se aplicó 0.25 mg L⁻¹ de TDZ en comparación con el testigo. Los bulbos que no contenían parte del disco basal no generaron bulbos (Figura 21). El diámetro de los nuevos bulbos en promedio fue de 5.7 mm, sin embargo, la comparación de medias mostró que todos los tratamientos para el diámetro de bulbos fueron estadísticamente iguales.

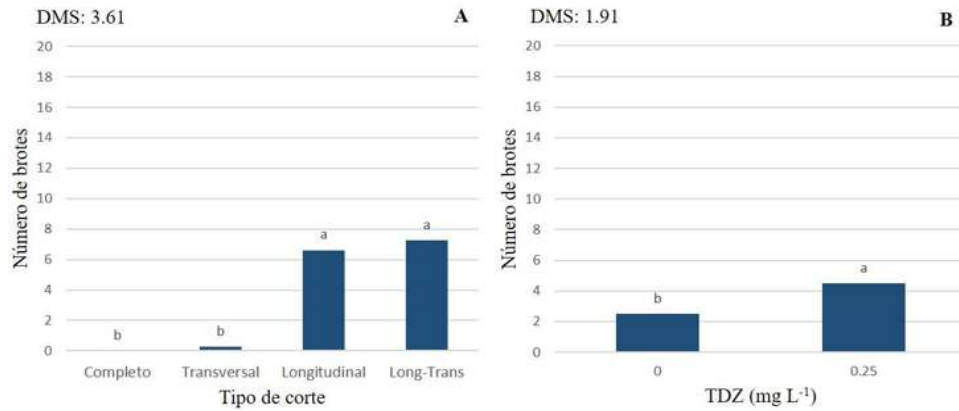


Figura 21. Efecto en el número de brotes de *Sprekelia formosissima* A) Tipo de corte y B) Concentración de TDZ.

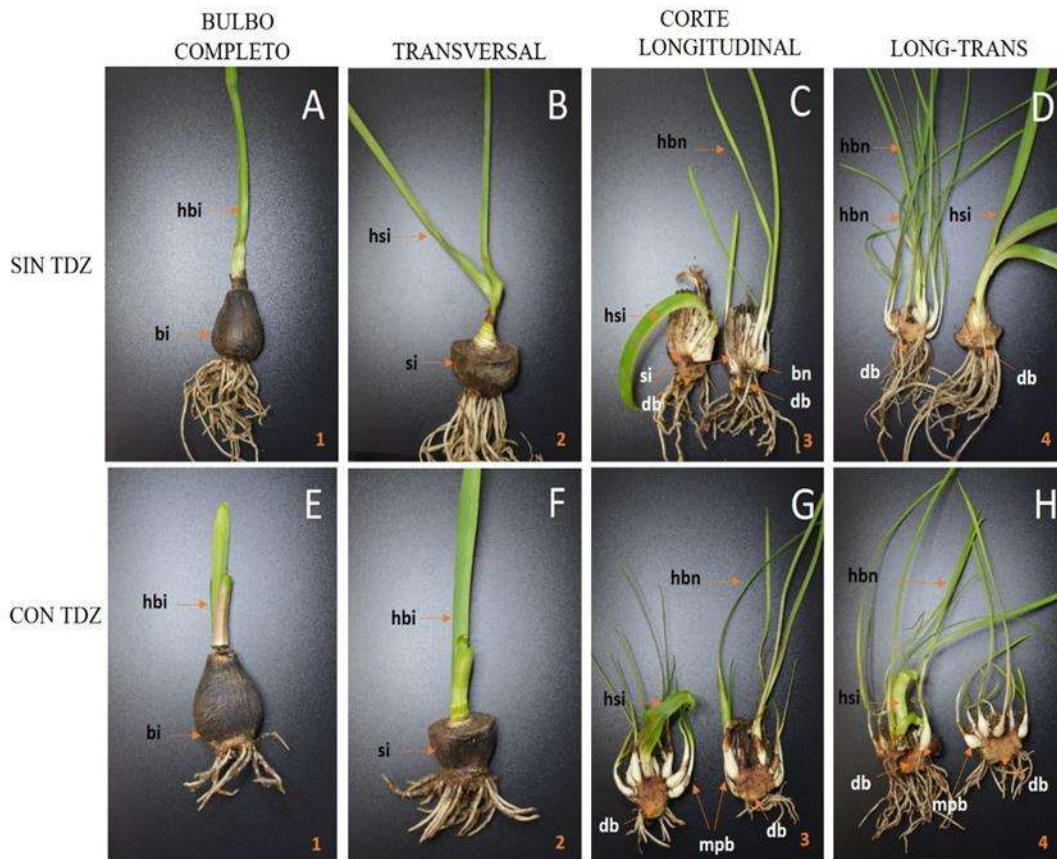


Figura 22. *Sprekelia formosissima*. A-D) Diferentes tipos de cortes sin TDZ. E-H) Diferentes tipos de cortes con TDZ. bi: bulbo inicial, hbi: hoja bulbo inicial, si: sección inicial, hsi: hoja sección inicial, bn: bulbo nuevo, hbn: hoja bulbo nuevo, db: disco basal, mpb: mayor producción de bulbos.

La sección longitudinal y la sección transversal de los bulbos obtuvieron el mayor número de hojas, en promedio generaron 10 hojas (Figura 23 A) y con la aplicación de 0.25 mg L⁻¹ de TDZ presentan tres hojas más en comparación con el testigo (Figura 23 B)

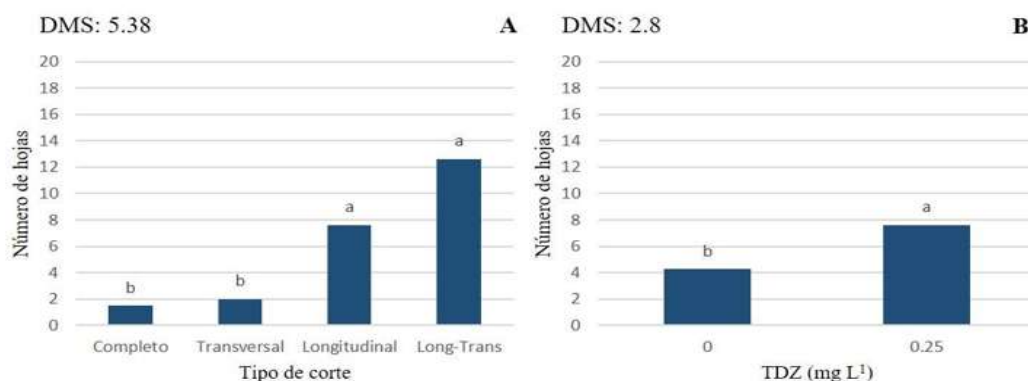


Figura 23. Número de hojas en secciones de bulbo de *Sprekelia formosissima*. A) Efecto del tipo de corte y B) Efecto de la dosis de TDZ.

El factor concentración de TDZ influyó en el tamaño de raíces de *S. formosissima*. Con la aplicación de 0.25 mg L⁻¹ de TDZ las raíces fueron 44 mm más pequeñas que cuando solo se aplicó agua (Figura 24).

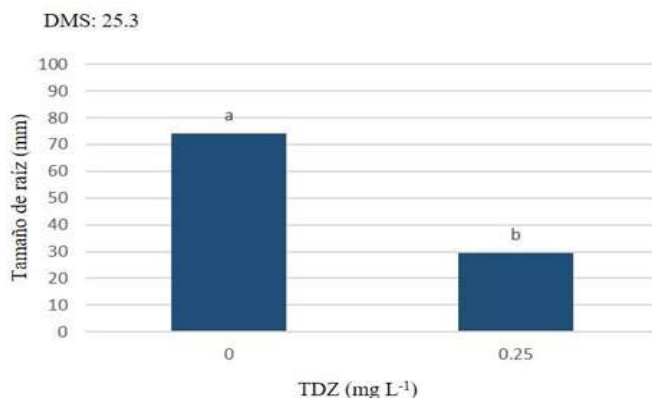


Figura 24. Efecto del TDZ en el tamaño de raíz de *Sprekelia formosissima*.

4.4 DISCUSIÓN

Las lecturas del índice de verdor con el SPAD 502 más altas (74 Lecturas SPAD) se obtuvieron en las plantas tratadas con SN al 100 % y 25 mg L⁻¹ de TDZ. Resultados similares se observa en plántulas de tomate, regadas con 100 % de SN en donde la lectura SPAD a los 70 días fue mayor (53.80 Lecturas SPAD) comparada con el testigo (36.77 Lecturas SPAD) (Cruz-Crespo *et al.*, 2012). Esto se debe a que el nitrógeno es uno de los componentes principales del sistema fotosintético en la clorofila, además se requieren altas cantidades de N para aumentar la enzima ribulosa 1, 5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RUBISCO) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (Combatt *et al.*, 2018).

Las citocininas tienen actividad fotosintética sobre la RUBISCO (Vlčková *et al.*, 2006) y la división celular (Raspor *et al.*, 2012), esto puede explicar el mayor desarrollo de las hojas con 0.25 de TDZ. La solución nutritiva a una concentración de 75 % fue la mejor para desarrollar hojas más anchas, estas concentraciones también incrementaron el crecimiento y una mayor concentración nutricional de nitrógeno, calcio y magnesio en tejido foliar de chile serrano (Cruz-Crespo *et al.*, 2014).

El mejor tipo de corte para obtener brotes de *S. formosissima* fue el longitudinal-transversal que generó 6.9 bulbillos nuevos. Padilla-Sánchez *et al.*, (2016) obtuvieron 7.4 bulbillos, con el tipo de corte longitudinal-transversal en mayito (*Zephyranthes fosteri*), los cortes estimulan la activación de las yemas localizadas en la base de la escama por medio de un mecanismo hormonal.

La concentración 0.25 mg L⁻¹ de TDZ resultó ser la más efectiva para la formación de callo en hojas jóvenes de *Toona ciliata*, sembradas en un medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) adicionado con TDZ (0, 0.10, 0.25, 0.50 and 1.0) (Daquinta *et al.*, 2005). En explantes de *Phaseolus vulgaris* L, sembrados en un medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) se formaron 2.5 yemas múltiples cuando se utilizó la concentración de 0.2 mg L⁻¹ TDZ (García *et al.*, 2008). En escamas de bulbo de *Hymenocallis littoralis* en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) adicionado con 2iP, TDZ y Zeatina en concentración de (2.25, 4.50, 9.00, 13.50, 18.00 y 22.50

μM), no se encontraron diferencias significativas para la multiplicación de brotes, esto puede ser porque las concentraciones de citocininas no fueron suficientemente altas como para estimular la multiplicación (Yew *et al.*, 2010).

En *S. formosissima* cultivada *in vitro* probaron la respuesta de 20 μM de la citoquinina BA en combinación con la 2 μM de la auxina IBA generando 75 brotes (Cázarez *et al.*, 2010). Esta respuesta hormonal puede estar relacionada con la sinergia que ocurre en la combinación de una auxina con la citoquinina para la proliferación de brotes (Chengalrayan *et al.*, 2005). Las citocininas son consideradas importantes reguladores de crecimiento en el cultivo de meristemos y su efecto estimulador en formación de órganos de almacenaje, aumento en el tamaño de bulbos y de masa fresca (Mujica y Mogollón, 2004).

Los bulbos enteros y las secciones superiores de los bulbos que no contenían parte del disco basal no generaron bulbos nuevos, similar a lo encontrado en bulbos de mancuernilla (*Hippeastrum hybridum* Hort.) en donde la forma de corte del bulbo en sección basal, corte de sección basal y bulbo completo, no generaron nuevos bulbillos, debido a que la yema del centro no fue dañada (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2015). Esta yema apical puede inhibir el transporte polar de la auxina endógena en las yemas laterales la cual es indispensable para su crecimiento (Jamil *et al.*, 2014).

En bulbos de *S. formosissima* cultivados *in vitro* observaron que los explantes que no contenían una porción de disco basal solo se hincharon y no desarrollaron brotes (Cázarez *et al.*, 2010). El tipo de corte no influyó en el diámetro de los bulbillos nuevos, que en promedio midieron 0.57 cm. En *Hippeastrum brachyandrus*, el corte longitudinal generó bulbillos de 0.87 cm de diámetro. El tamaño de los nuevos bulbos generados a partir de el corte de un bulbo madre está relacionada al tamaño promedio habitual de los bulbos maduros propios de cada especie (Orlando *et al.*, 2018).

En *S. formosissima* la mejor respuesta en la generación de hojas fue en el tipo de corte longitudinal-transversal, los resultados indican que a mayor número de bulbillos nuevos, es mayor la generación de hojas, resultados similares se obtuvieron en *Hippeastrum striatum* y

Habranthus brachyandrus en donde el número de hojas varió según el tipo de corte, los bulbos completos no produjeron hojas, *H. striatum* generó entre 0 y 5 hojas y en *H. brachyandrus* se generó entre 0 y 3 hojas (Orlando *et al.*, 2018). En *Zephyranthes fosteri* el número de hojas varió según el tipo de corte, los bulbos completos obtuvieron el menor número (0.14 hojas) y el mayor número de hojas (1.70) se presentó en el tipo de corte longitudinal-transversal (Padilla *et al.*, 2016). Andrade-Rodríguez *et al.*, (2015) indica que la formación de nuevos bulbos conlleva a la generación de nuevas estructuras que permitan el crecimiento independiente de cada bulbo formado.

El tamaño de la raíz fue menor con la aplicación de TDZ, esto se puede deber a que las citocininas puedan modificar el metabolismo de la actividad enzimática o de un receptor reduciendo la actividad de las auxinas (Javed *et al.*, 2013). El tamaño de las raíces podría estar relacionado con las reservas almacenadas en las secciones de bulbos, las raíces más pequeñas se encontraron en secciones de bulbos con un mayor número de brotes con hojas (Padilla-Sánchez *et al.*, 2016).

4.5 CONCLUSIONES

La SN al 100 % con 0.25 mg L⁻¹ de TDZ es la mejor concentración para incrementar el verdor en las hojas de *S. formosissima*, el ancho de las hojas se aumentan con la SN al 75 % con 0.5 mg L⁻¹.

Cuando se aplica 0.25 mg L⁻¹ de TDZ en cortes longitudinal-transversal se obtiene el mayor número de bulbos, para el mayor número de hojas se obtuvo con el tipo de corte longitudinal y en el transversal. *Sprekelia formosissima* mostró un aumento en la cantidad de hojas y una disminución en el tamaño de raíz cuando se aplicó 0.25 mg L⁻¹ de TDZ.

S. formosissima se puede reproducir de forma vegetativa al efectuar cortes en los bulbos, la obtención del protocolo de reproducción de esta especie es importante para generar protocolos de inducción de poliploidía.

4.6 BIBLIOGRAFÍA

- Andrade-Rodríguez, M., D. Guillén-Sánchez, O. G. Villegas-Torres, J. J. Ayala-Hernández, V. López-Martínez, and J. Vargas-Araujo. 2015. **Bulb cutting methods to propagate *Hippeastrum hybridum* Hort.** *Revista Chapingo Serie Horticultura* 21(1): 57-69.
- Ángeles-Espino, A., A. J. Valencia-Botín, G. Virgen-Calleros, C. Ramírez-Serrano, L. Paredes-Gutiérrez and S. Hurtado-De la Peña. 2012 **Micropropagación de agave (*Agave tequilana* Weber. Var. Azul) a través de yemas axilares.** *Tropical and subtropical agroecosystems* 15:693-698.
- Bermúdez-Carabaloso, I., M. R. Urquiza, y A. J. Padrón. 2017. **Efecto del uso combinado de citoquininas en la formación de yemas adventicias en banano cv. ‘Gros Michel’ (*Musa AAA*).** *Biotecnología Vegetal* 17 (1): 51-56.
- Cázar, P., R. Andrade, M. Villegas, T. Alia, T. Villegas and M. López. 2010. ***In vitro* propagation of *Sprekelia formosissima* Herbert., a wild plant with ornamental potential.** *Revista Fitotecnia Mexicana* 33 (3): 197-203.
- Chengalrayan, K., A. Abouzid and M. Gallomeagher. 2005. ***In vitro* regeneration of plants from sugarcane seed-derived callus.** *In vitro Cell y Developmental Biology* 41: 477-482.
- Combatt, E., D. J. Pérez y A. Jarma-Orozco. 2018. **Efecto del nitrógeno y el potasio sobre el intercambio gaseoso y la distribución de biomasa en albahaca (*Ocimum basilicum* L.).** *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 12 (1), 192-201.
- Cruz-Crespo, E., V. M. Sandoval Villa, H. Volke, Á. Can-Chulim y E. Sánchez. 2012. **Efecto de mezclas de sustratos y concentración de la solución nutritiva en el crecimiento y rendimiento de tomate.** *Revista mexicana de ciencias agrícolas* 3 (7): 1361-1373
- Cruz-Crespo, E., Á. Can-Chulim, R. Bugarín-Montoya, J. Pineda-Pineda, R. Flores-Canales, P. Juárez-López y G. Alejo-Santiago. 2014. **Concentración nutrimental foliar y**

- crecimiento de chile serrano en función de la solución nutritiva y el sustrato.** *Revista Fitotecnia Mexicana* 37(3), 289-295.
- Daquinta, M., Y. Lezcano and M. Cid. 2005. **Morfogénesis *in vitro* de *Toona ciliata* a partir de raquis de hojas jóvenes con tidiazuron.** *Revista Colombiana de Biotecnología* 7 (2): 5-9.
- García, L. R., R. Collado, I. Bermúdez-Caraballosa, N. Veitía, D. Torres, and C. Romero. 2008. **Regeneración de plantas vía organogénesis directa en *Phaseolus vulgaris* L.** *Biotecnología Vegetal* 8 (2): 109-114.
- Hawkesford, M., W. Horst, T. Kichey, Lambers, H.; Schjoerring, J.; Skrumsager, M. I. and White, P. 2012. **Functions of macronutrients.** *In: Marscher, P. (Ed.). Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants.* 3th (Ed.). Academic Press, London. pp. 135-189.
- Jamil, M. K., M. M. Rahman and M. M. Rahman. 2014. **Effect of bulb cutting and pot medium on propagation of *Hippeastrum* (*Hippeastrum hybridum* Hort.).** *Journal of Ornamental & Horticultural Plants* 4 (3): 123- 132.
- Javed, S. B., M. Anis, P. R. Khan, I. M. Aref. 2013. ***In vitro* regeneration and multiplication for mass propagation of *Acacia ehrenbergiana* Hayne: a potential reclaimment of denude arid lands.** *Agrofor Systems* 87 (3): 621–629
- Mujica, H. and N. Mogollón. 2004. **Bulbificación *in vitro* del ajo (*Allium sativum* L.) con adición de citocininas y sacarosa en el medio de cultivo.** *Bioagro* 16 (1): 55-60.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. **A revised medium for rapid growth and biossays whit tobacco tissue cultures.** *Physiology Plantarum* 15: 473-497.
- Nakandalage, N. and S. Seneweera. 2018. **Micronutrients Use Efficiency of Crop-Plants Under Changing Climate.** Elsevier, London-United Kingdom-United States.194 pp.
- Orlando, R. M., H. Ana and J. Daviña. 2018. **Regeneración de bulbos de *Hippeastrum striatum* y *Habranthus brachyandrus* (Amaryllidaceae) sometidos a corte longitudinal.** *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 53 (4): 609-618.

- Ortega-Blu, R., M. Correa-Benguria and E. Olate-Muñoz 2006. **Determinación de las curvas de acumulación de nutrientes en tres cultivares de *Lilium* spp. para flor de corte.** *Agrociencia* 40 (1):77-88.
- Padilla-Sánchez, A., M. A. Rodríguez, I. Alia-Tejacal, O. G. Villegas-Torres y D. Guillen-Sánchez. 2016. **Propagación vegetativa y sexual de mayito (*Zephyranthes fosteri* TRAUB y *Z. lindleyana*).** *Acta Agrícola y Pecuaria* 2 (2): 34-42.
- Pai, R., y Desai, N. S. 2018. **Effect of TDZ on various plant cultures.** En: Ahmad N., Faisal M. (eds) **Thidiazuron: From urea derivative to plant growth regulator.** Springer, Singapore. pp. 439-454.
- Parra-Terraza, S., 2016. **Relaciones NO³-aniones y K⁺/cationes en la solución nutritiva para el crecimiento de plántulas de tomate.** *Revista mexicana de ciencias agrícolas* 7 (7): 1527-1538.
- Raspor, M., M. Václav, E. Zizková, P. Dobrev, A. Trávníčková, S. Zdravkovic-Korac, A. Simonovic, S. Ninkovic, I. Dragicevic. 2012. **Cytokinin profiles of AtCKX2-overexpressing potato plants and the impact of altered cytokinin homeostasis on tuberization *in vitro*.** *The Journal of Plant Growth Regulation* 31 (3): 460-470.
- Rodrigues, M., E. Romais, Schmildt, R. Sobreira, E. Castro, T. Furtado, M. Ferreira and M. Pasqual 2014. **Direct organogenesis and leaf anatomy modifications *in vitro* of *Neoregelia concentrica* (vellozo) L.B. Smith (bromeliaceae).** *Pakistan Journal of Botany* 46 (6):2179-2187.
- Rodriguez, M. A. 2016. **Propagación vegetativa y sexual de mayito (*Zephyranthes fosteri* Traub y *Zephyranthes lindleyana* Herb.) (Amaryllidaceae).** *Acta Agrícola y Pecuaria* 2 (2):34-42.
- Rodríguez-Mendoza, M. D. L. N., B. Osorio-Rosales, L. I. Trejo-Téllez, M. D. L. Arévalo-Galarza y A. M. Castillo-González. 2011. **Producción organomineral de tulipán (*Tulipa gesneriana* L.) para flor de corte.** *Revista Chapingo Serie Horticultura* 17 (3): 117-127.

- Steiner, A. A. (1984). **The universal nutrient solution**. In 6. *International Congress on Soilless Culture, Lunteren (Netherlands)*. 649 pp.
- Vallejo, J. A. P. 2017. **Momento de riego y tamaño de bulbo en el rebrote y floración del Amancay (*Ismene amancaes* Ruiz y Pavón)**. In *Anales científicos* 78 (1):1-10.
- Vlčková, A., M. Špundová, E. Kotabová, R. Novotný, K. Doležal and Nauš, J. 2006. **Protective cytokinin action switches to damaging during senescence of detached wheat leaves in continuous light**. *Physiologia Plantarum* 126 (2): 257-267.
- Wang, C. X., Gu, F., Chen, J., Yang, H., Jiang, J., Du, T. and Zhang. 2015. **Assessing the response of yield and comprehensive fruit quality of tomato grown in greenhouse to deficit irrigation and nitrogen application strategies**. *Agricultural Water Management* 161: 9-19.
- Wolstenholme, B., A. Whiley. 1995. **Prospect for increasing Hass fruit size**. a southern hemisphere perspective. Australian avocado growers. Federation Inc, Conference. Esplanade Hotel, Fremantle. 30 April – 2 May, 3. 1995: 83-102. En Gil, P. 1999.
- Yew, C. K., Balakrishnan, B., Sundasekaran, J., y Subramaniam, S. 2010. **The effect of cytokinins on *in vitro* shoot length and multiplication of *Hymenocallis littoralis***. *J Med Plants Res*, 4, 2641-2646.

CAPÍTULO V

V. DISCUSIÓN GENERAL

La industria de la floricultura constantemente requiere variedades nuevas que cubra la demanda de productos novedosos. Estas variedades se desarrollan a partir de germoplasma nativo y puede ser por medio de protocolos de inducción de mutantes. Por sus atractivas características morfológicas *S. formosissima* es una especie muy codiciada por coleccionistas en México y en varias partes del mundo, extracción ilegal pone en riesgo a las poblaciones de la especie. El desarrollo de una variedad de *S. formosissima* disponible en el mercado podría disminuir las colectas ilegales. Cuando se induce poliploidía a especies silvestres lo primero que se debe conocer son los aspectos de la reproducción, en el caso de *S. formosissima* la información es muy escasa. Para la inducción de poliploidía en *S. formosissima in vitro* primero fue necesario el desarrollo de un protocolo de desinfección de las semillas para inducir la poliploidía en condiciones de laboratorio.

Desinfección de semillas de *Sprekelia formosissima*

Las sustancias más utilizadas para disminuir la contaminación en el cultivo *in vitro* son el hipoclorito de sodio, el hipoclorito de calcio, el cloruro de mercurio, el alcohol al 70 % y el peróxido de hidrógeno. La selección del tipo de desinfectante depende del tipo de tejido vegetal (Brenes-Madriz *et al.*, 2014). En nuestro estudio se eligió hipoclorito de sodio al 30 y 35 %, esta sustancia ya ha sido muy utilizada para la desinfección *in vitro* en diferentes especies de semillas de amaryllidaceas como *Zephyranthes* spp (Müller *et al.*, 2017) y *Rhodophiala bífida* (Maritano *et al.*, 2008).

Inducción de poliploidía

La generación de variedades podría lograrse en tiempo corto por medio del uso de colchicina, estos sistemas dependen de las técnicas de propagación de las especies que consiste en sistemas *in vitro* e *in vivo* (Eng y Ho 2019). Al exponer semillas y plantúlas de *S. formosissima* a colchicina se observaron diferencias morfológicas, además las plantas obtenidas fueron de

tamaño menor que las plantas sin exponer a experimentos con colchicina *in vitro* e *in vivo*, estas últimas también presentaron variaciones en tamaños de los estomas, esta característica puede aumentar la eficiencia de la fotosíntesis dando como resultado una compatibilidad innata con los factores ambientales (Liu *et al.*, 2011). Los cambios morfológicos se presentaron en plántulas muy jóvenes, esto no permitió hacer una selección de individuos con características con potencial ornamental.

Los mejores resultados para la inducción de poliploidía tanto *in vitro* como *in vivo* se obtuvieron en las dosis de colchicina y tiempos de inmersión más altos (0.3 % 2h) y (0.2 % 24 h) respectivamente, estos resultados se pueden deber a la poca afinidad de la colchicina con las tubulinas de las plantas (Dhooghe *et al.*, 2011). Las altas concentraciones y mayores tiempos de inmersión de semillas y plantulés, disminuyeron la viabilidad y supervivencia tanto de las plántulas cultivadas *in vitro* e *in vivo* (Nasirvand, 2018). Las plantulas sometidas a tratamientos *in vivo* obtuvieron mayor supervivencia (27 %) comparada con la supervivencia de los experimentos *in vitro* (14.6 %).

Los resultados indican que los bulbos de *S. formosissima* tienen una mayor resistencia a la aplicación de los agentes antimitóticos en comparación con las semillas. Por otra parte, la aplicación de colchicina en semillas ofrece la ventaja de que puede realizarse en un espacio reducido y con poca cantidad de colchicina (Omran y Mohammad, 2008). Al inducir la poliploidía durante el desarrollo embrionario, cuando las células se encuentran en división se incrementa la probabilidad de generar poliploides, debido al cambio de las frecuencias alélicas (Rauf *et al.*, 2006) y al acortamiento en los cromosomas producidos por la colchicina (Omran y Mohammad 2008).

Solución nutritiva y TDZ en el desarrollo de *Sprekelia formosissima*

El rendimiento de *S. formosissima* se favoreció con la aplicación de solución nutritiva y TDZ. El incremento en el verdor y el ancho de hojas se observó con la aplicación de solución nutritiva al 100 % de su concentración de sales y con una aplicación de 0.25 y 0.5 mg L⁻¹ de TDZ, la información obtenida sobre el manejo agronomico de *S. formosissima* es valiosa para su

producción comercial, otras geofitas de interés agronomico como *Gladiolus x grandiflorus* Hort (Gómez-Pérez *et al.*, 2018), *Tulipán* (Ramírez *et al.*, 2010), *Hippeastrum* (Ruamrungsri y Inkham, 2016) requieren de la aplicación de nutrimentos para incrementar el rendimiento, en algunas otras bulbosas la aplicación de reguladores de crecimiento también mejora su rendimiento como en *Lilium* sp. (Chanamé *et al.*, 2016) y *Dahalia variabilis* (Malik *et al.*, 2017).

La reproducción asexual de *S. formosissima* al igual que en otras bulbosas *Narcissus tazetta* (Khalafalla *et al.*, 2019), *Sternbergia lutea* (Nazari, 2019) y *Hippeastrum x johnsonii* (Kharrazi *et al.*, 2017) se puede obtener en poco tiempo, al generar bulbos a partir de la planta madre por medio de cortes.

CAPÍTULO VI

VI. CONCLUSIÓN GENERAL

De acuerdo a la hipótesis y objetivos planeados se concluye lo siguiente:

Se logró establecer semillas *in vitro* de *S. formosissima* libres de contaminación con concentraciones de 30 y 35 % de hipoclorito de sodio, a pesar de que se obtuvieron semillas sin contaminación se recomienda buscar otros agentes químicos que optimice la desinfección de las semillas.

La dosis 0.3 % de colchicina durante 2 horas para semillas *in vitro* y 0.2 % de colchicina durante 24 *in vivo* fue efectiva para producir cambios morfológicos en plántulas. Se recomienda establecer experimentos con un rango más bajo de inmersión (0 a 4 h).

La poliploidía en este trabajo se midió de manera indirecta por medio de la altura de las plantas, supervivencia y tamaño de estomas, sin embargo, hace falta un estudio de conteo de cromosomas para determinar con exactitud en que sistema se obtiene la mayor cantidad de individuos poliploides.

El crecimiento de *S. formosissima* con la aplicación de soluciones nutritivas y hormonas, así como la producción de bulbillos por medio del tipo de corte transversal-longitudinal con la aplicación de 0.25 mg L⁻¹ de TDZ. Se recomienda seguir trabajando con la aplicación de hormonas y la combinación de estas para determinar cual es la mejor.

CAPÍTULO VII

VII. BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Aasim, M., K. M. Khawar and S. Özcan. 2008. ***In vitro* regeneration of red squill *Urginea maritima* (L.) Baker. using tidiazuron.** *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 22 (4): 925-928.
- Alcántar V. J. P. 2014. **La poliploidía y su importancia evolutiva.** *Temas de Ciencia y tecnología* 18: 17-29.
- Alix, K., P. R. Gérard, T. Schwarzacher and J. S. Heslop-Harrison. 2017. **Polyploidy and interspecific hybridization: partners for adaptation, speciation and evolution in plants.** *Annals of botany* 120 (2):183–194.
- Allario, T., J. Brumos, J. M Colmenero-Flores, D. J. Iglesias, J. A. Pina, L. Navarro, M. Talon, ... R. Morillon. 2013. **Tetraploid Rangpur lime rootstock increases drought tolerance via enhanced constitutive root abscisic acid production.** *Plant Cell Environ* 36 (4): 856–868.
- Allum, J. F., D. H. Bringloe and A. V. Roberts. 2007. **Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. hybrid by exposure of *in vitro* nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time.** *Plant Cell Reports* 26 (11):1977–1984.
- Ammal, E. J. and B. K. Gupta. 1966. **Oil content in relation to polyploidy in *Cymbopogon*.** *Springer India* 64 (6):334-335.
- Balode, A. 2008. **Investigation of polyploidy in the breeding of lilies (*Lilium* spp.).** In *Research for Rural Development. International Scientific Conference Proceedings* 347-352
- Basumatari, M. and B. N. Das. 2017. **Karyomorphological studies in two Species of *Bauhinia* Linn. and induction of polyploidy in *Bauhinia acuminata* Linn.** *International journal of life sciences scientific research* 3:1223-1229.
- Bautista-Puga, M., L. M. Vázquez-García, H. Leszczynska-Borys, M. W. Borys, y A. M. Arzate-Fernández. 2011. **Caracterización del lirio azteca mediante marcadores morfológicos y moleculares.** *Agrociencia* 45 (4): 413-422.

- Beck, S. L., R. W. Dunlop, and A. Fossey. 2003. **Stomatal length and frequency as a measure of ploidy level in black wattle, *Acacia mearnsii* (de Wild).** *Botanical Journal of the Linnean Society* 141 (2):177-181.
- Blaine, M., D. E. Soltis and P. S. Soltis. 2016. **Patterns of abiotic niche shifts in allopolyploids relative to their progenitors.** *New Phytologist Trust* 212 (3):708–718.
- Brenes-Madriz, J. A. and A. V. Guillén-Watson. 2014. **Establecimiento de un protocolo *in vitro* para el cultivo del ajo (*Allium sativum*) en Costa Rica.** *Revista Tecnología en Marcha* 27 (4):49-57.
- Caiza, J. C., D. Vargas, C. Olmedo, M. Arboleda, A. Boada, O. Acurio, O., ... y M. C. Segovia-Salcedo. 2018. **Morfometría y morfología de estomas y de polen como indicadores indirectos de poliploidía en especies del género *Polylepis* (Rosaceae) en Ecuador.** *Ecología Austral* 28: 175-187.
- Castañeda, E. S., Y. M. Moreno, S. R. Piñeros, D. A. F. Alonso and Cavazos, J. **Percepción de *Sprekelia formosissima* (L.) Herb. como planta ornamental en Puebla y Morelos.** 2014. *Revista mexicana de ciencias agrícolas* 9: 1781-1786
- Cázar, P., R. Andrade, M. Villegas, T. Alia, T. Villegas y M. López. 2010. ***In vitro* propagation of *Sprekelia formosissima* Herbert., a wild plant with ornamental potential.** *Revista Fitotecnia Mexicana* 33 (3): 197-203.
- Chakraborti, S. P., K. Vijayan, B. Roy, and S. Qadri. 1998. ***In vitro* induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.).** *Plant Cell Reports* 17 (10):799-803.
- Colque, R., F. Viladomat, J. Bastida y C. Codina. 2002. **Micropropagation of the rare *Eucrosia stricklandii* (Amaryllidaceae) by twin-scaling and shake liquid culture.** *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 77 (6): 739-743.
- Comai, L. 2005. **The advantages and disadvantages of being polyploid.** *Nature Reviews Genetics* 6 (11):836–846.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (Conabio). <http://www.enciclovida.mx/especies/6025197> (Accesada 21 Julio 2018).

- Damián-domínguez, M.D.J.X., Cano-Sanatana, Z., Castellanos-vargas, I., 2009. **Fenología reproductiva de *Habranthus concolor* y *H. aff. concolor* (Amaryllidaceae) y su relación con la lluvia.** Ed. Biodiversidad Del Pedregal de San Ángel. México. 328 pp.
- Dewitte, A, T. Eeckhaut, J. Van Huylenbroeck and E. Van Bockstaele. 2009. **Occurrence of viable unreduced pollen in a *Begonia* collection.** *Euphytica* 168 (1):81–94.
- Dhawan, O. P. y U.C. Lavania. 1996. **Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review.** *Euphytica* 87 (2):81-89.
- Dhooghe, E., K. Van, T. Eeckhaut, L. Leus and J. Van. 2011. **Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*.** *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 104 (3):359-373
- Doležel, J., P. Binrova y S. Lucretti. 1989. **Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry.** *Biología Plantarum* 31 (2):113:120.
- Eng, W. H., and Ho, W. S. 2019. **Polyplodization using colchicine in horticultural plants: A review.** *Scientia horticultrae*, 246, 604-617.
- Evans, A. 1955. **The production and identification of polyploids in red clover, white clover and lucerne.** *The New Phytologist* 54 (2):149-162.
- Flory, W. S. 1977. **Overview of chromosomal evolution in the *Amaryllidaceae*.** *Nucleus* 20:70–88.
- Gentry, A. H., 1974. **Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae.** *Biotropica*, 6: 64-68.
- Geoffriau, E., R. Kahane and M. Rancillac. 1997. **Variation of gynogenesis ability in onion (*Allium cepa* L.).** *Euphytica* 94 (1): 37-4.
- Gómez-Pérez, L., L. A. Valdez-Aguilar, A. Benavides-Mendoza and A. Juárez-Maldonado. 2018. **Dinámica de biomasa y macronutrientos en cormos madre y cormos hijos de gladiolo (*Gladiolus x grandiflorus* Hort).** *Bio ciencias* (5):1-16
- Gordillo, F., F. Zárate, C. Mejía, L. Rivera y H. Calderón. 2008. **Análisis de la actividad fotosintética de plantas de café utilizando la técnica fotoacústica.** *Revista Colombiana de Física* 40(1): 186-189.

- Gutiérrez-Mora, A., F. Santacruz-Ruvalcaba, J. L. Cabrera-Ponce, y B. Rodríguez-Garay. 2003. **Mejoramiento genético vegetal. *in vitro*. e-Gnosis** 1: 1-19.
- Hadlaczky, G., G. Bistrany, T. Parznovszky and D. Dudits. 1983. **Mass isolation of plant chromosomes and nuclei.** *Planta* 157 (3): 278-285.
- He, M., W. Gao, Y. Gao, Liu, X. Yang, H. Jiao, and Y. Zhou. 2016. **Polyploidy induced by colchicine in *Dendranthema indicum* var. *aromaticum*, a scented chrysanthemum.** *European Journal of Horticultural Science* 81 (4):219-226.
- Hegarty, M. J., R. J. Abbott y S. J. Hiscock. 2012. **Allopolyploid speciation in action: The origins and evolution of *Senecio cambrensis*.** En: P.S., Soltis, D.E., (eds.). *Polyploidy and Genome Evolution*, SpringerVerlag, Berlin, Alemania pp. 245-270.
- Hernández-Muñoz, S., M. E. Pedraza-Santos, P. A. López, E. De La Cruz-Torres, S. P. Fernández-Pavía, A. Martínez-Palacios y M. Martínez-Trujillo. 2017. **Determinación de la DL₅₀ y GR₅₀ con rayos gamma (⁶⁰Co) en protocormos de *Laelia autumnalis in vitro*.** *Agrociencia* 51 (5):507-524.
- Hetherington, A. y F. Woodward. 2003. **The role of stomata in sensing and driving environmental change.** *Nature* 424 (6951):901-908.
- Kermani, M. J., V. Sarasan A. V. Roberts, K. Yokoya, J. Wentworth and V. K. Sieber. 2003. **Oryzalin-induced chromosome doubling in *Rosa* and its effect on plant morphology and pollen viability.** *Theoretical and Applied Genetics*. 107 (7):1195-1200.
- Khalafalla, M. M., M, Eltarawy, M. E. A. Saad and A. Hegazy. 2019. **Effect of hot-water treatment and bulb storage temperature on propagation of *Narcissus tazetta* by the chipping and twin-scaling techniques.** *Applied ecology and environmental research*, 17(5), 10293-10301.
- Kharrazi, M., A. Tehranifar, H. Nematy and A. Bagheri. 2017. **Vegetative propagation of amaryllis (*Hippeastrum × johnsonii*) by different cutting methods.** *Horticultural Science and Technology* 35 (3): 373-380.

- Kher, M. M., D. Joshi, S. Nekkala, M. Nataraj y D. P. Raykundaliya. 2014. **Micropropagation of *Pluchea lanceolata* (Oliver & Hiern.) using nodal explant.** *Journal of Horticultural Research* 22 (1):35-39.
- Kokate, C., 2011. **Pharmaceutical Biotechnology.** Elsevier, India. 82 pp.
- Lara, H. A. 1999. **Manejo de la solución nutritiva en la producción de tomate en hidroponía.** *Terra Latinoamericana* 17 (3):221-229.
- Lavania, U. C., S. Srivastava, S. Lavania, S. Basu, N. K. Misra & Y. Mukai. 2012. **Autopolyploidy differentially influences body size in plants, but facilitates enhanced accumulation of secondary metabolites, causing increased cytosine methylation.** *The Plant Journal* 71 (4):539-549.
- Leitch, I. J. and M. D. Bennett. 1997. **Polyploidy in angiosperms.** *Trends in Plant Science* 2 (12):470- 476.
- Leszczyńska-Borys, H. y M. W. Borys. 2000. **Seeds production by *Sprekelia formosissima* (L.) Herbert.** *Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture* 452:96-103.
- Liu, G., Z. Li y M. Bao. 2007. **Colchicine-induced chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its effect on plant morphology.** *Euphytica*, 157 (1):145-154.
- Liu, S., S. Chen, Y. Chen, Z. Guan, D. Yin and Chen, F. 2011. ***In vitro* induced tetraploid of *Dendranthema nankingense* (Nakai) Tzvel. shows an improved level of abiotic stress tolerance.** *Scientia horticultrae* 127 (3):411-419.
- López-Ferrari, A. R. y A. Espejo-Serna. 2002. ***Amaryllidaceae. Flora de Veracruz.*** Fascículo 128. Instituto de Ecología, A.C.-University of California. Xalapa, Ver. 32 pp.
- Luna, P., R. Castañon-Barrientos y A. Raz-Guzmán. 2011. **La biodiversidad en México: su conservación y las colecciones biológicas.** *Ciencias* 101 (101):36-43.
- Luo, Z., B. J. Iaffaldano y K. Cornish. 2018. **Colchicine-induced polyploidy has the potential to improve rubber yield in *Taraxacum kok-saghyz*.** *Industrial Crops and Products* 112:75-81.

- Macnish, A. J., C. Z. Jiang y M. S. Reid. 2010. **Treatment with tidiazuron improves opening and vase life of iris flowers.** *Postharvest biology and technology* 56(1), 77-84.
- Magaña, P., y J. L. Villaseñor. 2002. **La flora de México ¿Se podrá conocer completamente.** *Ciencias* 66:24-26.
- Malik, S. A., Z. A. Rather, M. A. Wani, A. Din and I. T Nazki. 2017. **Effect of growth regulators on plant growth and flowering in dahlia (*Dahlia variabilis*) cv. Charmit.** *Journal of Experimental Agriculture International* 15 (3):1-7.
- Maritano, P. F., M. C. Pérez de la Torre, P. A. Marinangeli and A. S. Escandón. 2008. **Ensayos preliminares para el estudio de una amarilidácea nativa con potencial ornamental. Cultivo *in vitro* y caracterización molecular de *Rhodophiala bífida* (Herb.) Traub.** Actas del IV Congreso Argentino de Floricultura y 10a Jornadas Nacionales de Floricultura. INTA. Buenos Aires. p. 428
- Martínez M. F. 2003. **“Plantas Ornamentales de México: su potencial ornamental”.** III Simposium de plantas Nativas con Potencial Ornamental. Departamento de Fitotecnia. pp. 32-47.
- Matos Á. 2014. **Efecto de diferentes concentraciones y tiempos de exposición de la colchicina en plantas de zábila [*Aloe vera* (L.) Burm. f.] *in vivo*.** *Multiciencias* 14 (4):382-388.
- Müller, D., P. G. Giménez, A. Travacio and M. Bueno. 2017. **Establecimiento *in vitro* de *Zephyranthes* spp.** *Biotechnología Vegetal* 17 (1).
- Mayett-Moreno, Y., J. S. Popp, M. Sabogal-Salamanca, S. Rodríguez-Piñeros, E. Salomé-Castañeda y D. A. Flores-Alonso. 2018. **Consumers “and Retailers” Attitudes Towards a Mexican Native Species of Aztec Lily as an Ornamental Plant.** *Sustainability* 10 (1):1-15.
- Mensah, J. K., B. O. Obadoni, P. A. Akomeah, B. Ikhajiagbe and J. Ajibolu. 2007. **The effects of sodium azide and colchicine treatments on morphological and yield traits of sesame seed (*Sesame indicum* L.).** *African Journal of Biotechnology* 6 (5): 534-538.

- Milo, J., A. Levy, D. Palevitch y G. Ladizinsky. 1987. **Thebaine content and yield in induced tetraploid and triploid plants of *Papaver bracteatum* Lindl.** *Euphytica* 36 (2):361-367.
- Mishra M. K. 1997. **Stomatal characteristics at different ploidy levels in *Coffea* L.** *Annals of Botany* 80 (5):689-692.
- Motero, P. T., M. Narvaez, M., y V. Fernández. 2018. **Inducción de poliploidía con clochicina en vitroplantas de *Aloe vera* (L.).** *Revista Colombiana de Biotecnología* 20 (1):97-105.
- Nazari, F. 2019. **Propagation of endemic and endangered *Sternbergia lutea* with a high ornamental value by bulb chipping and plant growth regulators.** *Acta scientiarum polonorum-hortorum cultus* 18 (2):123-131.
- Nicola, S. y L. Basoccu 1994. **Pretransplant nutritional conditioning affects pepper seedling growth and yield.** *Acta Horticulturae* 361: 519-526.
- Noori, S. A. S., M. Norouzi, G. Karimzadeh, K. Shirkoool, y M. Niazian. 2017. **Effect of colchicine-induced polyploidy on morphological characteristics and essential oil composition of ajowan (*Trachyspermum ammi* L.).** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTO) 130 (3):543-551
- Novak F. J. y H. Brunner. 1992. **Tecnología de mutación inducida para el mejoramiento de los cultivos.** *Fitotecnia* 4: 25-33.
- Omran A., and B. Mohammad. 2008. **Polyploidization effect in two diploid cotton (*Gossypium herbaceum* L. and *G. arboreum* L.) species by colchicine treatments.** *African Journal of Biotechnology* 7 (2):102-108.
- Otto S. P. 2007. **The evolutionary consequences of polyploidy.** *Cell* 131 (3):452-462.
- Parthibhan, S., M. V. Rao y T. S. Kumar. 2015. **In vitro regeneration from protocorms in *Dendrobium aequum* Lindley—An imperiled orchid.** *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 13 (2):227-233.

- Pelé, A., M. Rousseau-Gueutin y A. M. Chèvre. 2018. **Speciation success of polyploid plants closely relates to the regulation of meiotic recombination.** *Frontiers in plant science* 9:1-9
- Pereira, R. C., L. Chamma Davide, V. H. Techio y A. L. Oliveira. 2012. **Duplicação cromossômica de gramíneas forrageiras: uma alternativa para programas de melhoramento genético.** *Ciência Rural* 42 (7): 1278-1285.
- Polis G. A. y D. W. Sissom. 1990. **Life History.** En: Polis, G. A (Ed.) **The Biology of Scorpions.** Stanford University Press. USA. pp. 161-223.
- Prabhukumar, K. M., V. P. Thomas M. Sabu, Prasanth and K. V. Mohanan. 2015. **Induced mutation in ornamental gingers (*Zingiberaceae*) using chemical mutagens viz. colchicine, acridine and ethyl methane sulphonate.** *Journal Horticultural Science and Biotechnology*, 19, 18-27.
- Price, H. J., Levis, R. W., Coggins, L. W., and A. H. Sparrow. 1972. **High DNA content of *Sprekelia formosissima* Herbert (*Amaryllidaceae*) and *Ophioglossum petiolatum* Hook.(*Ophioglossaceae*).** *Experimental cell research* 73 (1):187-191.
- Quesenberry, K. H., J. M. Dampier, J. M., Y. Y. Lee, R. L. Smith y C. A. Acuna. 2010. **Doubling the chromosome number of bahiagrass via tissue culture.** *Euphytica* 175 (1):43-50.
- Ramírez, Martínez M., L. Trejo-Téllez, F. C. Gómez Merino and P. Sánchez García. 2010. **La relación K^+/Ca^{2+} de la solución nutritiva afecta el crecimiento y calidad postcosecha del tulipán.** *Revista fitotecnia mexicana* 33 (2):149-156.
- Ramsey J., y D. W. Schemske. 1998. **Pathways, mechanisms, and rates of polyploidy formation in flowering plants.** *Annual Review of Ecology and Systematics* 29 (1):467-501.
- Rauf, S., I. A. Khan, I. A., and F. A. KHAN. 2006. **Colchicine induced tetraploidy and changes in allele frequencies in colchicine-treated populations of diploids assessed with RAPD markers in *Gossypium arboreum* L.** *Turkish Journal of Biology* 30 (2):93-100.

- Rodríguez-Domínguez, J. M., L. P. Benavides-Gómez y R. Barba-Gonzalez. 2018. **Cytotypes of *Sprekelia formosissima* (Amaryllidaceae) collected in three localities of the state of Jalisco, México.** *The Journal of the Torrey Botanical Society* 145 (1):91-99.
- Ruamrungsri S. and Inkham. 2016. **Effect of calcium nitrate addition on growth and bulb quality of *Hippeastrum*.** International Symposium on Tropical and Subtropical. Chiand Mai, Tailand p. 375-380
- Rzedowski G. C. de y J. Rzedowski. 2005. **Flora Fanerogámica del Valle de México.** Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán. 1256 pp.
- Salazar, S. A., G. J. Valderrama y J. D. Quintero. 2018. **Efecto de la colchicina sobre la morfología foliar y los estomas de *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet y *H. Perrier* (Crassulaceae).** *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 12:212-222.
- Sánchez S. O. 1979. **La Flora del Valle de México, 5 th ed.** Herrero, Mexico, D.F. 519 p.
- Savard, J. P. L., Clergeau, P. y Mennechez, G. (2000) **Biodiversity concepts and urban ecosystems.** *Landscape and urban planning* 48 (4):131-142.
- Scagliusi, S., D. Grosselli, T. E. Ruppenthal y A. Z. Deon. 2009. **Estudios preliminares sobre o efeito da cafeína na duplicação cromossômica em plantas haplóides de cevada (*Hordeum vulgare* L.).** *Embrapa Trigo*.1-9.
- Silva-Sáenz P. (2017) **Flora del bajío y de regiones adyacentes.** Instituto de Ecología A.C. Centro Regional del Bajío Pátzcuaro, Michoacán, México. 51 p.
- Soltis, P. S., D. B. Marchant, Y. V. de Peer, and D. E. Soltis. 2015. **Polyploidy and genome evolution in plants.** *Genetics and Development* 35:119-125.
- Souza-Kaneshima, A. M., C. Simioni, M. F. Felismino, A. B. Mendes-Bonato, C. Risso-Pascotto, C. Pessim ... y C. B Valle. 2010. **Meiotic behaviour in the first interspecific hybrids between *Brachiaria brizantha* and *Brachiaria decumbens*.** *Plant Breeding* 129 (2):186-191.
- Speckmann, G., J. Post y H. Dijkstra. 1995. **The Length of Stomata as an Indicator for Polyploidy in Rey-Grasses.** *Euphytica* 14 (3):225-230

- Tapia-Campos, E., J. M. Rodríguez-Domínguez, M. M. Revuelta-Arreola, J. M. Van Tuyl, and R. Barba Gonzalez. 2012. **Mexican geophytes II: The genera *Hymenocallis*, *Sprekelia*, and *Zephyranthes***. *Floriculture Ornamental Biotechnol* 6:129–139.
- Tejalca I. y G. Pérez. 2018. **El espárrago para uso ornamental**. *Inventio la génesis de la cultura universitaria en Morelos* 4:47-50.
- Trejo-Hernández, L., M. E. Olson-Zúnica y R. A. Bye-Boettler. 2015. **Datos históricos y diversidad genética de las nochebuenas (*Euphorbia pulcherrima*) del Distrito Federal, México**. *Revista mexicana de biodiversidad* 86 (2):478-485.
- Valladolid, A., R. Blas y R. Gonzáles. 2004. **Raíces andinas**. (Ed.) **Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos**. Centro Internacional de la papa. Peru pp. 95-99.
- Vallejo J. A. P. 2017. **Momento de riego y tamaño de bulbo en el rebrote y floración del Amancay (*Ismene amancaes* Ruiz y Pavón)**. In *Anales científicos* (Vol. 78, No. 1, pp. 1-10). Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Van, P. Y., E. Mizrachi y Marchal, K. 2017. **The evolutionary significance of polyploidy**. *Nature Reviews Genetics* 18 (7):411.
- Van, T. J., H. Van and A. A. Kwakkenbos. 1990. **Research on polyploidy in interspecific hybridization of Lily**. *Acta Horticulturae* 266:323-329.
- Vázquez-García, L. M., T. H. Norman-Mondragón y M. del C. Corona-Rodríguez. 1998. **El Lirio Azteca**. Colección: Ciencias Naturales y Exactas, Serie: Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, Estado de México. 29 pp.
- Vivar, S. F., y J. E. Alvarez. 2015. **Increasing fruit size of ‘Hass’ avocado (*Persea americana* Mill.) Using Giberellic acid, Tidiazuron and Girdling**. Memorias del VIII Congreso Mundial de la Palta. Lima, Perú. p. 261.
- Wan, Y., J. Petolino y J. Widholm. 1989. **Efficient production of doubled-haploid plants through colchicine treatment of anther derived maize callus**. *Theoretical and Applied Genetics* 77 (6):889-892.

Wang, S. Y., G. L. Staffans and M. Faust. 1986. **Breaking bud dormancy in apple with a plant bioregulator, Thidiazurón.** *Phytochemistry* 25 (2):311-317.

VIII. APENDICE

CAPÍTULO III

Cuadro 1A. Análisis de varianza para evaluar el **efecto de la concentración de hipoclorito de sodio en la desinfección** de semillas de *Sprekelia formosissima* germinadas *in vitro*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	6	0.384	0.128	17.15	<.0001
Error	16	0.119	0.007		
Total	19	0.504			

correcto

R^2 0.75, C.V. = 7.77

Cuadro 2A. Análisis de varianza para evaluar el **efecto de la dosis y tiempo (12, 24 y 48 h) de exposición en la germinación** de *Sprekelia formosissima* germinadas *in vitro*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados de la media	F-Valor	Pr>F
Tiempo de inmersión (T)	3	1.059	0.353	179.26	<.0001
Concentración (C)	3	0.025	0.008	4.26	0.0077
T*C	9	0.060	0.010	5.08	0.0002

R^2 0.88, C.V. = 4.25

Cuadro 3A. Análisis de varianza para evaluar el **efecto de la dosis y tiempo (2, 4 y 8 h) de exposición en la germinación** de *Sprekelia formosissima* germinadas *in vitro*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados de la media	F-Valor	Pr>F
Tiempo de inmersión (T)	3	0.490	0.163	21.90	<.0001
Concentración (C)	3	0.182	0.060	8.15	<.0001
T*C	9	0.298	0.049	6.66	<.0001

R^2 0.62, C.V. = 7.97

Cuadro 4A. Análisis de varianza para evaluar el **efecto de la exposición a colchicina (12, 24 y 48) en la altura** de plántulas de *Sprekelia formosissima* germinadas *in vitro*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados de la media	F-Valor	Pr>F
Tiempo de inmersión (T)	3	833.57	277.85	409.63	<.0001
Concentración (C)	3	148.36	49.45	72.91	<.0001
T*C	9	838.098	69.841	102.96	<.0001

R² 0.94, C.V. = 86.64

Cuadro 5A. Análisis de varianza para evaluar el **efecto de la exposición a colchicina (2, 4 y 8) en la altura** de plántulas de *Sprekelia formosissima* germinadas *in vitro*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados de la media	F-Valor	Pr>F
Tiempo de inmersión (T)	3	473.287	157.762	69.57	<.0001
Concentración (C)	3	28.735	9.578	4.22	.0080
T*C	9	45.119	7.519	3.32	.0058

R² 0.75, C.V. = 109.98

Cuadro 6A. Análisis de varianza para el **efecto de la exposición en colchicina en la supervivencia** de *Sprekelia formosissima* en invernadero.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados de la media	F-Valor	Pr>F
Tiempo de inmersión (T)	3	20210.126	6736.708	6.57	0.0002
Concentración (C)	3	68201.309	34100.654	33.25	<.0001
T*C	6	11402.014	1900.335	1.85	0.0868

R² 0.142, C.V. = 115.07

Cuadro 7A. Análisis de varianza para el **efecto de la exposición en colchicina en la altura** de plántulas de *Sprekelia formosissima* en invernadero

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados de la media	F-Valor	Pr>F
Tiempo de inmersión (T)	3	34540.250	11513.416	11.60	0.0001
Concentración (C)	2	135124.026	67562.013	68.06	<.0001
T*C	6	12029.929	2004.988	2.02	0.0691

R² 0.62, C.V. = 30.58

Cuadro 8A. Análisis de varianza para el **efecto de la exposición de colchicina en el ancho** de estomas de plántulas de *Sprekelia formosissima*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados de la media	F-Valor	Pr>F
Tiempo de inmersión (T)	3	85.677	28.559	31.37	<.0001
Concentración (C)	2	119.996	59.998	65.91	<.0001
T*C	6	123.740	20.623	22.66	<.0001

R² 0.50, C.V. = 9.56

Cuadro 9A. Análisis de varianza para el **efecto de la exposición de colchicina en el largo de** estomas de plántulas de *Sprekelia formosissima*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados de la media	F-Valor	Pr>F
Tiempo de inmersión (T)	3	235.697	78.565	11.15	<.0001
Concentración (C)	2	404.807	202.403	28.71	<.0001
T*C	6	674.733	112.455	15.95	<.0001

R² 0.34, C.V. = 11.17

Cuadro 10A. Análisis de varianza para evaluar el **efecto del tiempo de almacenamiento en la germinación de semillas** de *Sprekelia formosissimas* germinadas *in vitro*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	5	88216.66	17643.33	38.96	<.0001
Error	114	51620.00	452.80		
Total correcto	119	139836.66			

R² 0.63, C.V. = 50.46

Cuadro 11A. Análisis de varianza para evaluar el **efecto del tiempo de almacenamiento en semillas viables** de *Sprekelia formosissimas* germinadas *in vitro*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	5	115666.66	23133.33	18.31	<.0001
Error	114	144000.00	1263.15		
Total correcto	119	259666.66			

R² 0.44, C.V. = 111.23

Cuadro 12A. Análisis de varianza para evaluar el **efecto del tiempo de almacenamiento en semillas no viables** de *Sprekelia formosissimas* germinadas *in vitro*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	5	94416.66	18883.33	11.24	<.0001
Error	114	191500.00	1679.82		
Total correcto	119	285916.66			

R² 0.33, C.V. = 104.6

Cuadro 13A. Análisis de varianza para evaluar el **efecto del tiempo de almacenamiento en semillas** potencialmente viables de *Sprekelia formosissimas* germinadas *in vitro*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	5	40416.66	8083.33	4.44	0.0010
Error	114	207500.00	1820.17		
Total correcto	119	247916.66			

R^2 0.16, C.V. = 146.27

CAPÍTULO IV

Cuadro 14A. Análisis de varianza para el **efecto de la solución Steiner y TDZ en el verdor de hojas** de *Sprekelia formosissima*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados de la media	F-Valor	Pr>F
Solución Nutritiva (SN)	3	744.31	248.10	0.70	0.558
Tidiazuron (TDZ)	2	1663.18	831.59	2.34	0.109
SN*TDZ	6	5088.43	848.07	2.39	0.045

R^2 0.34, C.V. = 25.70

Cuadro 15A. Análisis de varianza para el **efecto de la solución Steiner y TDZ en el ancho de hojas** de *Sprekelia formosissima*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados de la media	F-Valor	Pr>F
Solución Nutritiva (SN)	3	65.46	21.82	2.84	<.0001
Tidiazuron (TDZ)	2	198.92	99.46	12.95	0.037
SN*TDZ	6	205.32	34.22	4.46	0.0002

R^2 0.11, C.V. = 17.60

Cuadro 16A. Análisis de varianza para el **efecto de tipo de corte y dosis de TDZ en la generación de nuevos brotes de *Sprekelia formosissima*.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados de la media	F-Valor	Pr>F
Corte	3	373.09	124.36	18.06	<.0001
Tidiazuron (TDZ)	1	34.03	34.03	4.94	0.0359
Corte*TDZ	3	35.59	11.86	1.72	0.1890

R² 0.72, C.V. = 74.30

Cuadro 17A. Análisis de varianza para el **efecto de tipo de corte y dosis de TDZ en el diámetro de nuevos brotes de *Sprekelia formosissima*.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados de la media	F-Valor	Pr>F
Corte	3	218.64	72.88	2.80	.0615
Tidiazuron (TDZ)	1	20.84	20.84	0.80	0.379
Corte*TDZ	3	12.49	4.16	0.16	0.922

R² 0.28, C.V. = 116.37

Cuadro 18A. Análisis de varianza para el **efecto de tipo de corte y dosis de TDZ en la generación de hojas en bulbos nuevos de *Sprekelia formosissima*.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados de la media	F-Valor	Pr>F
Corte	3	662.12	220.70	14.47	<.0001
Tidiazuron (TDZ)	1	91.12	91.12	5.98	0.022
Corte*TDZ	3	38.62	12.87	0.84	0.483

R² 0.68, C.V. = 65.77

Cuadro 19A Análisis de varianza para el **efecto del tipo de corte y TDZ en el tamaño de raíces en bulbos** de *Sprekelia formosissima*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados de la media	F-Valor	Pr>F
Corte	3	3334.22	1111.40	0.92	0.4473
Tidiazuron (TDZ)	1	16016.92	16016.92	13.22	0.0013
Corte*TDZ	3	1022.66	340.88	0.28	0.8383

R² 0.412, C.V. = 67.30