



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA  
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ÁREA TEMÁTICA DE  
FISIOLOGÍA Y GENÉTICA VEGETAL**

**PROPAGACIÓN VEGETATIVA E INDUCCIÓN DE VARIACIÓN  
FENOTÍPICA EN *Zephyranthes fosteri* CON COLCHICINA**

**TESIS**

Que presenta:

**ING. MARICARMEN VALENCIA CAMARENA**

Para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Directora de tesis:

**DRA. MARTHA ELENA PEDRAZA SANTOS**

**Mayo, 2023**



## Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

---

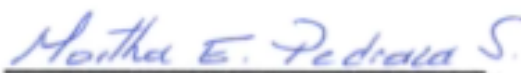
**DRA. MARTHA ELENA PEDRAZA SANTOS**  
COORDINADORA GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
P R E S E N T E


Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Propegación vegetativo e inducción de variación fenotípica en *Zephyranthes fosteri* con colchicina" presentado por la Ing. Maricarmen Valencia Camarena con Número de Matrícula 1350627A, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestra en Ciencias.


Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.


**ATENTAMENTE**  
Morelia, Michoacán, a 23 de mayo de 2023

**COMITÉ SINDICAL**

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Martha Elena Pedraza Santos  
Directora de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Patricia Delgado Valerio  
Vocal 1

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Selene Hernández Muñoz  
Presidenta

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Ana Tetzqui Chávez Bárcenas  
Vocal 2

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Ulises Manzanilla Quiñones  
Vocal 3

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por su apoyo para realizar esta investigación.

A mi asesora de tesis la **Dra. Martha Elena Pedraza Santos** por su apoyo incondicional para este trabajo, por permitirme formar parte de su equipo de investigación, gracias por compartir su conocimiento conmigo, por ser un gran ejemplo académico a seguir y por enseñarme a amar la investigación. Gracias por sus consejos, por motivarme a creer en mi y seguir hacia adelante.

A mis asesores, **Dra. Ana Tztzqui Chávez Bárcenas, Dra. Patricia Delgado Valerio y el Dr. Ulises Manzanilla Quiñones** por sus correcciones, atenciones y sus consejos para que esta investigación se pudiera realizar de la mejor manera. Gracias por su dedicación y enseñarme tanto en esta etapa.

A mi amiga la **Dra. Selene Hernandez Muñoz** por su apoyo durante esta investigación, sus consejos y sus correcciones tan acertadas. Gracias por compartir tus conocimientos y tiempo conmigo.

A mi amigo **Adolfo Jimenez Carrillo** por ser parte de mi estancia en laboratorio y por conseguir el material vegetal de *Z. fosteri* para lograr esta investigación. No dejes que la experimentación deje de sorprenderte.

A mis amigos **Victor, Ale, Yesi, Arturo y Kevin** por apoyarme de manera experimental, por enseñarme ser paciente, por compartir risas y consejos. Gracias por ser parte de mi tiempo en laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio los **M. C Agustín y Juan, Dafne, Polet, Jesús, Ricardo, Roman, Fabian, Eliza, Iván, Marlen, Lupita y Karen** por que en mi estancia en el laboratorio me enseñaron muchas cosas y me hicieron parte del equipo.

## DEDICATORIAS

*A lo mas importante de mi vida mi familia*

A mi padre **Mario Valencia Angel** por motivarme y por su apoyo incondicional para cumplir mis sueños.

A mi madre **Hilda Camarena Ortiz** por su amor incondicional, sus oraciones y su motivación para solucionar los problemas que se presentan.

A mi pareja **Mario Antonio Cendejas Colin** gracias por ser parte de mi vida, estar en los momentos más difíciles y enseñarme a ser una mejor persona. *Muchas Gracias por apoyarme incondicionalmente en todas mis metas.*

A mis hermanos **Mariana y Vangelis** gracias por sus consejos y cuidarme siempre.

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
ÍNDICE DE CUADROS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
RESUMEN GENERAL.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
Hipótesis general.....	7
Objetivo general.....	7
Objetivos específicos.....	7
CAPÍTULO I. PROPAGACIÓN VEGETATIVA DE <i>Zephyranthes fosteri</i> .....	8
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
1.1 INTRODUCCIÓN.....	10
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
1.2.1 Propagación clonal.....	13
1.2.2 Relación entre el calibre del bulbo y el desarrollo de la planta.....	14
1.2.3 Análisis estadísticos.....	15
1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
1.3.1 Propagación clonal.....	16
1.3.2 Relación entre el calibre del bulbo y el desarrollo de la planta.....	23
1.4 CONCLUSIÓN.....	29
1.5 LITERATURA CITADA.....	30
CAPÍTULO II. INDUCCIÓN DE POLIPLOIDÍA EN PLANTAS SILVESTRES	
DE <i>Zephyranthe fosteri</i> .....	35
RESUMEN.....	35
ABSTRACT.....	36
2.1 INTRODUCCIÓN.....	37
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
2.2.1 Inducción de variación fenotípica en condiciones <i>in vitro</i> .....	40

2.2.2 Inducción de variación fenotípica en condiciones de invernadero.....	43
2.2.3 Análisis estadísticos.....	43
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
2.3.1 Inducción de variación fenotípica en condiciones <i>in vitro</i> .....	44
2.3.2 Inducción de variación fenotípica en condiciones de invernadero.....	48
2.4 CONCLUSIÓN.....	54
2.5 LITERATURA CITADA.....	55
CAPÍTULO III. CONCLUSIÓN GENERAL.....	60
CAPÍTULO IV. LITERATURA CITADA COMPLEMENTARIA.....	61

## ÍNDICE DE CUADROS

### CAPÍTULO I. PROPAGACIÓN VEGETATIVA DE *Zephyranthes fosteri*

Cuadro		Página
1	Cuadros medios del análisis de varianza para el efecto del tipo de corte en los bulbos y la concentración de TDZ en el crecimiento vegetativo de plantas de <i>Z. fosteri</i> .....	16
2	Cuadros medios del análisis de varianza para el efecto del tipo de corte y la concentración de TDZ en el desarrollo de bulbillos de <i>Z. fosteri</i> .....	21
3	Influencia del tipo de corte y la aplicación de citocininas (thidiazuron, TDZ) en bulbos de <i>Zephytanthes fosteri</i> para estimular la producción de bulbillos.....	22
4	Análisis de varianza del efecto del calibre del bulbo de <i>Z. fosteri</i> en el desarrollo vegetativo a los 30 dde.....	23
5	Análisis de varianza del efecto del calibre del bulbo en el desarrollo vegetativo de plantas de <i>Z. fosteri</i> a los 60 dde.....	24
6	Análisis de varianza del efecto del calibre en el desarrollo vegetativo y formación de bulbillos de plantas de <i>Z. fosteri</i> a los 9 meses después de la siembra.....	25
7	Coefficientes de correlación y su significancia estadística en bulbos de <i>Z. fosteri</i> de diversos tamaños.....	28

### CAPÍTULO II. INDUCCIÓN DE POLIPLOIDÍA EN PLANTAS SILVESTRES DE *Zephyranthe fosteri*

Cuadro		Página
1	Supervivencia de plántulas de <i>Z. fosteri</i> expuestas a colchicina aplicada sobre el medio de cultivo.....	47
2	Supervivencia de plantulas de <i>Z. fosteri</i> expuestas de manera reccurrente a colchicina 5 meses dde.....	48
3	Correlación del efecto de la colchicina y tiempo de exposición para el	

	desarrollo morfológico de <i>Z. fosteri</i> .....	51
4	Efecto de la colchicina y el tiempo de exposición para el desarrollo morfológico de los bulbos de <i>Z. fosteri</i> .....	53



## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO I. PROPAGACIÓN VEGETATIVA DE *Zephyranthes fosteri*

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Metodología para la propagación de bulbos de <i>Z. fosteri</i> . A) proceso de desinfección, B) tipos de corte y C) tamaño del bulbo.....	14
2	Efecto de la interacción del tipo de corte y concentración de TDZ en el desarrollo de bulbos de <i>Z. fosteri</i> . A) emergencia de brotes, B) longitud de hoja, C) anchura de la hoja D) Número de raíces.....	17
3	Desarrollo vegetativo de <i>Z. fosteri</i> con diferentes tipos de corte y concentraciones de TDZ.....	18
4	Efecto del tipo de corte y concentración de TDZ en el desarrollo de bulbos de <i>Z. fosteri</i> . A) número de hojas, B) número de brotes, C) longitud de raíz, D) volumen radicular.....	20
5	Efecto del calibre del bulbo en el desarrollo de plantas de <i>Z. fosteri</i> . A) número de hojas a los 30 dde, B) anchura de hoja a los 30 dde, C) anchura de las hojas 60 dde, D) diámetro polar final del bulbo madre, E) diámetro ecuatorial final del bulbo madre y F) número de bulbillos a los 9 meses dde.....	26

### CAPÍTULO II. INDUCCIÓN DE POLIPLOIDÍA EN PLANTAS SILVESTRES DE *Zephyranthe fosteri*

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Metodología para la exposición al agente antimetabólico en plántulas y bulbos de <i>Z. fosteri</i> . A) semillas, B) establecimiento <i>in vitro</i> de semillas, C) plántulas <i>in vitro</i> utilizadas para la exposición al agente antimetabólico, D) bulbos utilizados para la exposición al agente antimetabólico <i>in vivo</i> , E) exposición de bulbos en colchicina y F) bulbos en macetas con sustrato.....	41

2	Efecto de la concentración y tiempo de exposición a la colchicina en plántulas de <i>Z. fosteri in vitro</i> .....	44
3	Bulbos de <i>Z. fosteri</i> con necrosis expuestos a colchicina 120 dde. A) testigo, B) colchicina 0.05, C) colchicina a 0.1 %.....	45
4	Efecto del tiempo de exposición a la colchicina para el desarrollo morfológico de plantas <i>Z. fosteri</i> . A) número de hojas, B) longitud de hoja, C) ancho de la hoja.....	50
5	Efecto del tiempo de exposición a la colchicina para el desarrollo morfológico de plantas de <i>Z. fosteri</i> 12 meses después. A) longitud de hoja y B) diámetro de bulbillos.....	52

## RESUMEN GENERAL

La floricultura se ve favorecida por variedades obtenidas a partir de germoplasma nativo y la mutagénesis inducida por poliploidia es la técnica más utilizada para generar nuevas variedades. Un ejemplo de flora nativa con potencial ornamental es *Zephyranthe fosteri*, una geófito silvestre con flores elegantes de color rosa. Esta planta se puede propagar de forma sexual, pero se requiere de 4 a 7 años para que un bulbo llegue a su madurez fisiológica; además, la tasa de multiplicación asexual de forma natural es baja porque solo se produce un bulbillo al año esto provoca que no haya oferta de plantas cultivadas en viveros y se recolecten individuos silvestres para comercializar. Por ello, es necesario establecer un protocolo de propagación vegetativa y la metodología para generar variación fenotípica como fuente de variedades. Con base en lo anterior se llevaron a cabo dos estudios con el objetivo de optimizar la propagación vegetativa de plantas de *Zephyranthes fosteri* para establecer un método de inducción de variación fenotípica con colchicina. En el primer estudio se estableció un protocolo de propagación vegetativa para *Z. fosteri* a partir de la activación de las yemas axilares presentes en los catáfilos. El segundo para determinar el método de aplicación, el tiempo de exposición y concentración de colchicina para inducir variación fenotípica en bulbos de *Z. fosteri*. En el primer estudio se redujo el tiempo de emergencia de los bulbos a 4 días en bulbos enteros o con corte longitudinal tratados con TDZ 0.57 y 1.14  $\mu\text{M}$ , estas concentraciones favorecieron 50 % el desarrollo vegetativo en todos los tipos de corte. Se determinó que los bulbos enteros con dos cortes longitudinales sin TDZ generaron 54 bulbillos en total y los bulbos de 19 a 26 mm favorece el desarrollo de las plantas en un 50 % y se obtiene mayor número de bulbillos, 3.72 en promedio. En el segundo se determinó que en exposición recurrente a 0.05 % de colchicina durante 5 meses en plantas de *Z. fosteri in vitro* se alcanzó una supervivencia de 71 %. En los bulbos *in vivo* expuestos a 0.1 % de colchicina durante 24 h sobrevivieron 20 plantas, en comparación con las expuestas 6 h, donde solo sobrevivieron 14 plantas. En los bulbos expuestos durante 12 h, las hojas fueron 34 % más largas y con mayor número de hojas, en promedio 10.30 hojas.

### Palabras clave

Propagación vegetativa, bulbos, *in vitro*, *in vivo*, variación fenotípica, colchicina.

## GENERAL ABSTRACT

Floriculture is favored by varieties obtained from native germplasm and polyploidy-induced mutagenesis is the most widely used technique to generate new varieties. An example of native flora with ornamental potential is *Zephyranthe fosteri*, a wild geophyte with elegant pink flowers. This plant can be propagated sexually, but it takes 4 to 7 years for a bulb to reach physiological maturity; in addition, the rate of natural asexual multiplication is low because only one bulblet is produced per year, which means that there is no supply of cultivated plants in nurseries and wild individuals are collected for commercialization. Therefore, it is necessary to establish a vegetative propagation protocol and the methodology to generate phenotypic variation as a source of varieties. Based on the above, two studies were carried out with the objective of optimizing the vegetative propagation of *Zephyranthes fosteri* plants to establish a method to induce phenotypic variation with colchicine. In the first study, a vegetative propagation protocol was established for *Z. fosteri* based on the activation of axillary buds present in the cataphylls. The second to determine the application method, exposure time and colchicine concentration to induce phenotypic variation in *Z. fosteri* bulbs. In the first study, bulb emergence time was reduced to 4 days in whole or longitudinally cut bulbs treated with TDZ 0.57 and 1.14  $\mu\text{M}$ , these concentrations favored 50% vegetative development in all types of cuttings. It was determined that whole bulbs with two longitudinal cuts without TDZ generated 54 bulblets in total and bulbs from 19 to 26 mm favored plant development by 50 % and obtained a greater number of bulblets, 3.72 on average. In the second one, it was determined that in recurrent exposure to 0.05 % colchicine for 5 months in *Z. fosteri* plants in vitro, a survival of 71 % was achieved. In the in vivo bulbs exposed to 0.1 % colchicine for 24 h, 20 plants survived, compared to those exposed for 6 h, where only 14 plants survived. In bulbs exposed for 12 h, leaves were 34 % longer and with a higher number of leaves, on average 10.30 leaves.

### Key words

Vegetative propagation, bulbs, in vitro, in vivo, phenotypic variation, colchicine.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

En México existen especies silvestres con cualidades farmacéuticas, alimentarias y/o potencial ornamental para su comercialización que constituyen recursos genéticos de importancia; sin embargo, muchas especies aún requieren estrategias eficientes para la propagación de material vegetal o no se han incorporado en programas de mejoramiento genético para obtener variedades comerciales y así evitar la extracción de poblaciones nativas (Honfi y Daviña, 2015). Una de estas especies es *Zephyranthes fosteri*, una geófita nativa de México que en el código Badiano se denomina como Huetzcanixochitl “flor sonriente o flor que te hace reír”, también se conoce como “flor de mayo”, “mayito” y “quiebraplato”. Los aztecas utilizaban sus hojas y flores en infusiones para tratar la fatiga y el estrés. Esta especie es una planta herbácea, perenne, su bulbo mide de 2 a 5 cm, cada bulbo produce de uno a tres escapos con una flor de color rosa o blanca, que suelen durar de tres a siete días, su apariencia elegante le da el potencial para ser apreciada como elemento decorativo dentro del diseño de paisajes o como planta en maceta (Centeno-Betanzos *et al.*, 2021).

Las plantas geófitas pueden reproducirse por semillas, que geminan cuando las condiciones son adecuadas, pero su mortalidad es más alta que las plantas formadas por reproducción asexual, porque en este último método la planta madre le proporciona nutrientes y protección a los bulbillos (Moreno-Pachón, 2017). La propagación vegetativa se logra cuando las plantas pueden dividirse manualmente, porque en cada ciclo el bulbo madre es reemplazado por uno o dos bulbillos hijos que surgen de las yemas axilares; sin embargo, el número de los meristemas axilares es bajo y no todos crecen durante el ciclo de crecimiento anual del bulbo, este crecimiento depende de la etapa de desarrollo, estado y condición fisiológica de la planta, así como de condiciones ambientales (Bihmidjene *et al.*, 2013).

Cuando la multiplicación vegetativa no es suficiente se puede recurrir a eliminación de la latencia apical, este método consiste en hacer cortes, extirpar una porción o dividir a la mitad el bulbo madre, para que las incisiones estimulen la formación de hijuelos mediante un mecanismo hormonal y formar mayor o menor cantidad de bulbillos del bulbo madre (Padilla *et al.*, 2016). La latencia apical es el control del ápice de la planta sobre el crecimiento de las yemas axilares las cuales se denominan paralatentes y reanudan su crecimiento tras la eliminación del ápice, esta latencia es inducida por las auxinas que interactúan con la hormona estrigolactona y la alta demanda de azúcar producida en el ápice, así como la inanición de las yemas axilares y se ha demostrado que la sacarosa y citocininas son el desencadenante para modular las redes hormonales que controlan el crecimiento de las yemas (Barbier *et al.*, 2015). La inducción mecánica para tener

nuevos bulbos y ha sido un método efectivo y de bajo costo en diversas especies; sin embargo, los métodos de propagación de bulbos por hijuelos y por estacas de bulbo son lentos, ya que el inicio de la formación del bulbo hasta la floración requiere de cuatro a cinco años (Hartman *et al.*, 1990). Otro factor que se debe tomar en cuenta es el tamaño del bulbo, porque afectará el tiempo que se requiere para tener un bulbo maduro, es decir que los bulbos pequeños necesitan más tiempo para crecer a un tamaño comercial, debido a la fuente de reservas como el almidón y los azúcares, el bulbo puede ser fuente cuando ha completado su crecimiento o demanda cuando está en proceso de crecimiento (Zhu *et al.*, 2004).

La micropropagación se ha usado con éxito en algunas especies de *Zephyranthes* se ha logrado hasta 95% de germinación en condiciones *in vitro*, pero cuando se trabaja con secciones de bulbos, la contaminación microbiana aumenta y se requiere de la aplicación de desinfectantes como un paso crucial para lograr el establecimiento *in vitro* (Müller *et al.*, 2017). La micropropagación de *Zephyranthes* spp. a partir de los catáfilos de los bulbos, se intentó al desinfectar los bulbos con solución de etanol (90 %), hipoclorito de sodio (1.5 %) y fungicida Mancozeb, durante 10, 15 y 20 minutos; sin embargo, 100 % de los explantes presentaron contaminación microbiana (Müller *et al.*, 2017).

Establecer un método de propagación masiva de *Z. fosteri* es indispensable para acelerar el crecimiento de las plántulas y asegurar su abastecimiento con fines comerciales (Tapia-Campos, 2012). Además, el cultivo de tejidos vegetales es una herramienta biotecnológica útil en los programas de mejoramiento genético ya que reduce el tiempo para la obtención de nuevas variedades (Gonzales *et al.*, 2005) e incrementa la probabilidad de generar variación fenotípica (Skirvi *et al.*, 1994).

El desarrollo de variedades ornamentales con rasgos morfológicos deseables se puede realizar por poliploidía, este método es más eficaz en comparación con el mejoramiento por mutación y el cruzamiento convencional, debido a su manejo fácil en un periodo de tiempo corto, lo que también aumenta la disponibilidad de germoplasma (Niu *et al.*, 2016). La poliploidía consiste en incrementar el tamaño del genoma causado por la presencia de tres o más juegos de cromosomas dentro de las células somáticas de un organismo y se induce al exponer diferentes órganos de las plantas como semillas, meristemas apicales, botones florales, raíces, entre otros, con soluciones antimitóticas como colchicina, orizalina y vicristina (Slamet *et al.*, 2018). Estos productos químicos se pueden incorporar a los tejidos por inmersión, remojo, goteo, o mezclado con linolina, agar o algodón (Ranney, 2006). La reacción que causan es duplicar el número de

cromosomas de una especie, que provoca reordenamientos cromosómicos, remodelaciones epigenéticas y reunión de jerarquías reguladora de genes divergentes (Kannan *et al.*, 2013).

La colchicina ( $C_{22}H_{25}NO_6$ ) es alcaloide venenoso extraído del azafrán otoñal *Cochium autumnale* L., es fácilmente soluble en agua fría, cloroformo o alcohol, pero baja solubilidad en agua caliente (Kumar y Rani, 2013). Este antimitótico actúa 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 dobles (Hadlaczky *et al.*, 1983). Sin embargo, la colchicina tiene mayor afinidad a la tubulina animal, lo que resulta en una actividad peligrosa, ya que si no existe una correcta manipulación puede provocar efectos tóxicos en los seres humanos (Ebrahimzadeh *et al.*, 2018).

Aunque la colchicina se aplica como solución acuosa es inestable en agua, por lo que es aconsejable preparar una nueva solución antes de los tratamientos, en semillas pregerminadas con raíces emergentes es eficaz y la concentración que se recomienda es entre 0.1 y 0.8 %, dosis más altas provocan malformaciones y reducen la producción de plantas tetraploides, por lo que es recomendable utilizar colchicina en concentraciones muy bajas; sin embargo, la dosis y el tiempo de exposición a las sustancias antimitóticas dependerá de la especie y el tejido a tratar (Pirkoonhi *et al.*, 2011). En explantes de hojas de lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) variedad azul tratados con orizalina 0.01 % por 48 horas y 0.05 % durante 24 y 72 horas presentaron rasgos fenológicos diferentes (Corza, 2019). En bulbos de *Zephyranthes rosea* se reemplazó la colchicina con extracto etanólico de hoja de *Catharanthus roseus* al 0.1 % durante 24 horas, los bulbos aumentaron el peso de la raíz, número de hojas, área foliar y densidad estomática (Wu *et al.*, 2012). La poliploidía inducida en *Tagetes erecta*, produjo hojas de forma ovalada con una base robusta y disposición en espiral (Sadhukhan *et al.*, 2014). en plantas tetraploides de *Pelargonium graveolens* se observaron variaciones en el color y forma de las hojas (Jadrná *et al.*, 2010).

Las plantas poliploides son notablemente diferentes o a veces superiores a las diploides, en su expresión fenotípica, porque la duplicación de cromosomas causa un efecto en las plantas que se conoce como “gigas” debido al aumento en el tamaño de las células, por la adición de copias de genes (Botelno *et al.*, 2015). Los individuos tetraploides son más vigorosos, más grandes, pueden producir hojas más grandes y gruesas, de color verde oscuro y con cambios en la morfogénesis tisular, específicamente en la epidermis, lo que provoca un cambio en el tamaño de los estomas (Panteris *et al.*, 1993). También se pueden alterar las hojas, estructuras florales y semillas (Kazi *et*

*al.*, 2015), así como los hábitos de crecimiento de plantas como enanismo, los patrones de sexualidad, restauración de esterilidad y aumentar la resistencia al frío (Dibyendu, 2010). En la industria ornamental se ha inducido artificialmente en muchos cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y celulares en cultivos de importancia económica como lirio, gladiolo, petunia y caléndula (Balode, 2008; Suzuki *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2010; El-Nashar *et al.*, 2015).

Además de mejorar rasgos ornamentales como flores y hojas, la inducción de poliploidía con colchicina, también aumenta el rendimiento de las plantas y modifica sus estructuras reproductivas tanto sexuales como asexuales, como es el caso de *Lagerstroemia indica* (Ye *et al.*, 2010) y *Catharanthus roseus* (Hosseini *et al.*, 2013) las cuales también incrementaron el tamaño y peso de sus semillas significativamente. En *Impatiens balsamina* la colchicina aumentó el número y peso de las semillas y número de frutos (Du *et al.*, 2011).

Para detectar la poliploidización, se debe generar un protocolo de confirmación por medio de citometría de flujo, que se considera un método más fiable, rápido y sencillo, aunque también se utilizan métodos como el conteo de cromosomas y las observaciones morfológicas de las plantas (Dhooghe *et al.*, 2009). En particular, el diámetro del polen, número de cloroplastos, tamaño y densidad de los

estomas que están relacionados con funciones fisiológicas importantes como la fotosíntesis, la respiración y acumulación de biomasa en las plantas (Costa *et al.*, 2003). La densidad, tamaño, longitud y ancho de los estomas, se pueden usar como indicador de cambios, estos tienen una correlación positiva con la tasa de éxito de la poliploidía en plantas (Lin *et al.*, 2015). Aunque estos métodos indirectos son fáciles, porque se requiere de menos tiempo y se utilizan instrumentos sencillos, tienen la desventaja de que son sensibles al ambiente y no identifican el nivel de ploidía correcto en plantas mixoploides y citoquimeras, por lo cual se requiere de protocolos específicos para cada especie vegetal (Moghbel *et al.*, 2015).

Un programa de mejoramiento genético de *Z. fosteri* puede iniciar desde cero a partir de plantas nativas con características ornamentales deseadas; sin embargo, en México los estudios de micropropagación de *Z. fosteri* son escasos (Nava *et al.*, 2021) y no se han realizado trabajos de poliploidía en genotipos silvestres, lo que ha impedido obtener variedades con mejores características de color, tamaño y forma de la flor para aumentar el valor y la aceptación de la especie en el mercado nacional y de exportación (Hernández *et al.*, 2017).

Con base en la información expuesta, el uso de herramientas biotecnológicas como el cultivo de tejidos *in vitro* y la inducción de poliploidía, son esenciales para generar y propagar variantes



de *Z. forteri*, que es de gran interés comercial, cultural y ecológico, y que a través de este conocimiento, se logró constituir las bases técnico-científica de un proyecto de mejoramiento genético dirigido a esta especie geófito nativa de nuestro país.

## **HIPÓTESIS**

Los tipos de corte, el uso de TDZ y el tamaño de los bulbos en *Z. fosteri*, favorece la reproducción vegetativa.

La exposición y dosis de colchicina *in vivo* e *in vitro* en bulbos de *Z. fosteri* genera plantas con variación fenotípica.

## **OBJETIVO GENERAL**

Optimizar la propagación vegetativa de plantas de *Zephyranthes fosteri* para establecer un método de inducción de variación fenotípica con colchicina.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Establecer un protocolo de propagación vegetativa para *Z. fosteri* a partir de la activación de las yemas axilares presentes en los catáfilos.

Determinar el método de aplicación, el tiempo de exposición y concentración de colchicina para inducir variación fenotípica en bulbos de *Z. fosteri*.

## CAPÍTULO I

### PROPAGACIÓN VEGETATIVA DE *Zephyranthes fosteri*

#### RESUMEN

La especie *Zephyranthes fosteri* es una geófito ornamental mexicana que se puede propagar a partir de bulbos; aunque con este método las yemas axilares ubicadas entre los catáfilos del bulbo tunicado solo generan uno o ningún bulbillo al año. El objetivo de esta investigación fue establecer un protocolo de propagación vegetativa para *Z. fosteri* a partir de la activación de las yemas axilares presentes en los catáfilos. En el primer ensayo los bulbos se colocaron en soluciones de TDZ (0, 0.57 y 1.14  $\mu\text{M}$ ) y se trataron en cinco formas: a) bulbo entero sin cortes, b) corte transversal sin ápice, c) corte transversal sin ápice más corte longitudinal, d) corte longitudinal y e) dos cortes longitudinales. En un segundo ensayo se determinaron tres calibres para su propagación: calibre 1) peso de 0.2 a 1 g, diámetro 6 a 12 mm y longitud de 9 a 16 mm, calibre 2) peso 1 a 3 g, diámetro de 13 a 18 mm y longitud de 16 a 20 mm, calibre 3) peso de 4 a 10 g, diámetro de 19 a 26 mm y longitud de 18 a 26 mm. En ambos ensayos se evaluó el desarrollo morfológico de la planta y el número de bulbillos obtenidos, los diseños experimentales fueron al azar con arreglo factorial y se efectuaron correlaciones de Pearson entre las variables. Con los resultados se logró determinar que el TDZ a 0.57 y 1.14  $\mu\text{M}$  estimula el desarrollo vegetativo de las yemas axilares. El bulbo entero con dos cortes longitudinales sin TDZ generó mayor número de bulbillos, además se determinó que el calibre óptimo para su propagación es de 19 a 26 mm de diámetro.

#### **Palabras clave**

Geófito ornamental, yemas axilares, calibre de bulbos, formación de bulbillos.

## ABSTRACT

The species *Zephyranthes fosteri* is a Mexican ornamental geophyte that can be propagated from bulbs; although with this method the axillary buds located between the cataphylls of the tunicate bulb only generate one or no bulblets per year. The objective of this research was to establish a vegetative propagation protocol for *Z. fosteri* from the activation of the axillary buds present in the cataphylls. In the first trial bulbs were placed in TDZ solutions (0, 0.57 and 1.14  $\mu\text{M}$ ) and treated in five ways: a) whole bulb without cuts, b) transverse cut without apex, c) transverse cut without apex plus longitudinal cut, d) longitudinal cut and e) two longitudinal cuts. In a second trial, three calibers were determined for propagation: caliper 1) weight 0.2 to 1 g, diameter 6 to 12 mm and length 9 to 16 mm, caliper 2) weight 1 to 3 g, diameter 13 to 18 mm and length 16 to 20 mm, caliper 3) weight 4 to 10 g, diameter 19 to 26 mm and length 18 to 26 mm. In both trials the morphological development of the plant and the number of bulblets obtained were evaluated, the experimental designs were randomized with factorial arrangement and Pearson correlations were made between the variables. The results showed that TDZ at 0.57 and 1.14  $\mu\text{M}$  stimulated the vegetative development of axillary buds. The whole bulb with two longitudinal cuts without TDZ generated a greater number of bulblets, and it was also determined that the optimum caliber for propagation is 19 to 26 mm in diameter.

### Key words

Ornamental geophyte, axillary buds, bulb size, bulblet formation.

## 1.1 INTRODUCCIÓN

La especie *Zephyranthes fosteri* Traub. de la familia Amaryllidaceae, es una planta monocotiledónea silvestre y nativa de México, las plantas miden hasta 45 cm de altura, su flor es pequeña, de 2 a 6 cm, de color rosa o blanco-rosado y florecen de primavera hasta otoño (Rzedowski y Calderón, 2005). La planta se ha usado en la medicina indígena, debido a que contiene alcaloides inhibidores, utilizados en tratamientos para el cáncer y el Alzheimer (Bastida *et al.*, 2006).

*Z. fosteri* como ornamental, se utiliza en grupos como plantas en maceta o para formar tapices y adornar caminos, balcones y jardines. Aunque se puede encontrar como parte de la colección privada de algunas personas, la mayoría de los ejemplares se extraen de su hábitat natural (Seyidoğlu *et al.*, 2009), ya que no existen métodos eficientes de reproducción en vivero.

La reproducción sexual de *Z. fosteri* se considera muy alta porque más de 95 % de sus semillas son viables y germinan en un periodo de tres días. Sin embargo, las plantas obtenidas por semillas pueden tardar hasta cuatro años en florecer y suelen presentar una tasa de mortalidad alta en comparación con las plantas obtenidas mediante reproducción asexual (Ikegami *et al.*, 2012). Esto ocurre por que los bulbos propagados a partir de semilla pasan por tres fases de desarrollo: vegetativa juvenil, vegetativa adulta y reproductiva. Después de estas etapas la planta se vuelve competente para su propagación y floración, esta última es inducida por señales ambientales como el fotoperiodo, la temperatura y por factores endógenos como los niveles hormonales, la edad fisiológica de la planta, el peso y el tamaño del bulbo (Kamenetsky *et al.*, 2015).

En otras especies geófitas la propagación vegetativa se desarrolla a partir de los meristemas axilares de cada escama del bulbo; estas escamas son hojas modificadas unidas a un tallo corto llamado placa basal, con raíces y una yema axilar, que le da la capacidad de multiplicarse por sí misma. Las yemas pasan por un periodo de latencia y cuando las condiciones ambientales y endógenas son óptimas suprimen el letargo, crecen y se convierten en propágulos (hijuelo, bulbo o bulbillo), este proceso de crecimiento de las yemas axilares está controlado por un complejo intercambio de hormonas, por el estado nutricional y por el medio ambiente; el crecimiento de las yemas determina la tasa de propagación en especies bulbosas, que es variable entre especies, pero en promedio es baja, debido al número limitado de meristemas axilares y a la restricción de su crecimiento por factores bióticos o abióticos (Rameau *et al.*, 2015).

Una técnica empleada en plantas bulbosas para incrementar el número de brotes y bulbillos son los cortes al bulbo, con este método se generan clones de la planta madre, lo que permite mantener composiciones genéticas deseables; además, es una técnica de bajo costo que se puede implementar a nivel comercial (Leeggangers *et al.*, 2013).

En las especies *Hippeastrum striatum* y *Habranthus brachyandrus* se ha demostrado que al seccionar el bulbo aumenta el número de brotes y bulbillos obtenidos por bulbo madre, porque las heridas inducen el desarrollo de las yemas axilares (Rodríguez-Mata *et al.*, 2018). El estrés que causan los cortes, genera respuestas fisiológicas como la activación de genes de defensa y se inducen captadores de especies reactivas de oxígeno (ROS), para iniciar la regeneración de la planta, porque se estimula la señalización hormonal del etileno, el ácido salicílico, el ácido abscísico y el ácido jasmónico (Minibayeva *et al.*, 2015). Los cortes también interrumpen el transporte polar de las auxinas que se acumulan en el área herida y promueven la proliferación y la dediferenciación celular para regenerar los bulbillos (Motte *et al.*, 2014), los bulbillos obtenidos crecen durante el reposo del bulbo madre (Rodríguez-Mata *et al.*, 2018).

El tamaño del bulbo es otro factor importante en la propagación vegetativa, ya que, si éste es grande contiene mayor cantidad de carbono almacenado, agua y nutrientes, que influyen en el crecimiento y calidad de los bulbos (Ikegami *et al.*, 2012). En el género *Lilium*, cuando los bulbos se encuentran inactivos a nivel fisiológico, las escamas movilizan parte de su carbono almacenado, 75 % se traslada a las raíces y al meristemo apical, mientras que el resto del carbono se va a los meristemas axilares para soportar el crecimiento de los bulbos hijos. Cuando el meristemo apical brota y las hojas se vuelven fisiológicamente activas, suministran carbono a la flor y al tallo, mientras que las escamas alimentan exclusivamente a los bulbos hijos, una vez que florece la planta, la fuente de carbono de las hojas se traslada a los bulbos hijos y se convierte en almidón, la distribución del carbono sobre los bulbos hijos no es igual y algunos de los meristemas axilares permanecen inactivos durante un periodo largo (Moreno-Pachón *et al.*, 2016). Las reservas y el metabolismo de almidón y sacarosa presentes en las escamas del bulbo son importante para la formación y desarrollo de los bulbillos, es por esto que en plantas geófitas, es importante determinar los calibres para su comercialización, de acuerdo al peso, longitud y diámetro del bulbo madre y se tiene estandarizado cuantas flores y bulbillos se obtendrán de acuerdo al calibre (Li *et al.*, 2014). El calibre mínimo que se utiliza en tulipán es de 6 a 8 cm y el más grande es de 12 a 14 cm, en plantas del género *Lilium* el calibre mínimo es de 14 a 16 cm y el más grande es de 22 a 24 cm (Francescangeli y Marinangeli, 2018).

Por otra parte, la aplicación de citocininas en dosis y tiempos determinados influye en el desarrollo de las plantas, al promover la inducción de yemas y brotes laterales, estimula la división celular y la capacidad de participar en el proceso de hidrólisis del almidón almacenado en los bulbos (Taiz y Zeiger, 2013). El tiazurón es una citocinina sintética del grupo fenilurea que a nivel molecular se le atribuye la capacidad de estimular la acumulación de citocininas naturales y desencadena la señalización de hormonas presentes en la planta, se utiliza en plantas leñosas y herbáceas, porque posee un alto rango de estimulación de brotes axilares, rompe la latencia de yemas apicales y laterales y favorece la traslocación de auxinas (Baránek *et al.*, 2015). En *Lilium* spp. el TDZ es utilizado en concentraciones bajas para retrasar la senescencia de hojas y flores (Ferrante *et al.*, 2003), en los géneros *Tulipa* y *Crysanthemum* se utiliza para estimular la formación de brotes (Dhiman *et al.*, 2015).

Con base en lo anterior, puede esperarse que los tipos de corte, el uso de TDZ y el tamaño de los bulbos en *Z. fosteri*, favorezca su reproducción asexual, que de manera natural es muy lenta. En este estudio se planteó como objetivo establecer un protocolo de propagación vegetativa para *Z. fosteri* a partir de la activación de las yemas axilares presentes en los catáfilos. Los resultados esperados aportarán información relevante para el manejo integral y agronómico de la especie.

## 1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Los 145 bulbos de *Z. fosteri* que se usaron en este estudio se recolectaron en el municipio de Parácuaro, Michoacán. Esta localidad se ubica en las coordenadas geográficas 19° 10' 00" de latitud Norte y 102° 12' 31" de longitud Oeste. El clima dominante de la zona de recolecta es cálido húmedo (AWO), con una temperatura media anual de 22 °C y una precipitación acumulada anual de 800 mm (Tu Municipio, 2022). El suelo que predomina en el área de recolecta es vertisol pélico (Vp) (CONABIO, 1995). El uso de la vegetación y suelo en el área de estudio corresponde a agricultura de riego anual y permanente (RAP) (INEGI, 2016).

Los experimentos se realizaron en el Invernadero de Plantas Ornamentadas de la Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" perteneciente a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en el periodo de enero del 2021 a enero del 2022.

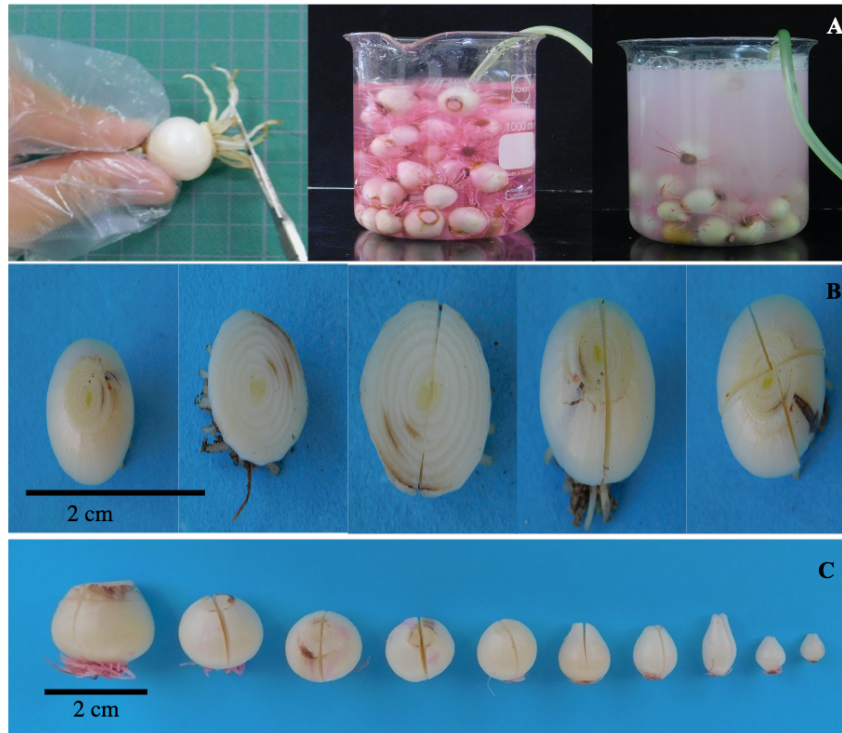
### 1.2.1 Propagación clonal

En este estudio se usaron 75 bulbos a los cuales se les retiró el primer catáfilo y se sumergieron en solución de pentacloronitrobenzeno 300 g de i.a kg<sup>-1</sup> y disulfuro de tetrametil tiuram 300 g de i.a kg<sup>-1</sup> (1 g L<sup>-1</sup>) durante 15 minutos. Después se retiró el fungicida y se colocaron en solución de tidiázurón (42.4 % de i.a) a diferentes dosis (0, 0.57 y 1.14 µM) durante 30 minutos. Durante el proceso de inmersión se tuvo una constante oxigenación de los tejidos (Figura 1A).

La solución con tidiázurón se retiró y los bulbos se trataron en cinco formas: a) bulbo entero sin cortes, b) corte transversal sin ápice, c) corte transversal sin ápice más corte longitudinal, d) corte longitudinal y e) dos cortes longitudinales (Padilla *et al.*, 2016) (Figura 1B). La combinación de las tres concentraciones de TDZ y los cinco tipos de corte generaron 15 tratamientos con cinco repeticiones, la unidad experimental fue un bulbo. El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo de tratamientos factorial.

Cada bulbo se colocó en una maceta de 3 pulgadas con peat moss, vermiculita y perlita en porción 2:2:1. A los 30 días después del establecimiento del ensayo (dde) se evaluaron las variables: número, longitud y anchura de las hojas (mm), número y días a emergencia de brotes, número y longitud de raíces (mm) y volumen radicular (mL) (Padilla *et al.*, 2016). A los 12 meses

dde se evaluó el número de bulbillos obtenidos en cada tratamiento con su diámetro y longitud (mm).



**Figura 1.** Metodología para la propagación de bulbos de *Z. fosteri*. A) proceso de desinfección, B) tipos de corte y C) tamaño del bulbo.

### 1.2.2 Relación entre el calibre del bulbo y el desarrollo de la planta

Para determinar el calibre óptimo se utilizaron 70 bulbos, los cuales se desinfectaron con el método del ensayo anterior y se colocaron en una solución de tiazurón ( $1.14 \mu\text{M}$ ) durante 30 minutos. Con base en el peso, diámetro y longitud de cada bulbo se establecieron tres calibres, calibre 1: peso de 0.2 a 1 g, diámetro 6 a 12 mm y longitud de 9 a 16 mm; calibre 2: peso 1 a 3 g, diámetro de 13 a 18 mm y longitud de 16 a 20 mm; calibre 3: peso de 4 a 10 g, diámetro de 19 a 26 mm y longitud de 18 a 26 mm (Figura 1C). En cada bulbo se efectuó un corte longitudinal y se sembraron en macetas de 3 pulgadas con sustrato formado por peat moss, vermiculita y perlita en proporción 2:2:1. A los 30 y 60 días dde se evaluaron las variables: días a emergencia de brotes, número, longitud y anchura de las hojas (mm). A los 180 dde se midió la longitud y diámetro del bulbo madre (mm), el número de bulbillos obtenidos por bulbo y la longitud y diámetro de los bulbillos (mm).



El diseño experimental fue al azar con tres tratamientos (calibres del bulbo) y el número de repeticiones varió de acuerdo a la disposición de bulbos de cada calibre: calibre 1 con 8 repeticiones, calibre 2 con 34 y calibre 3 con 28.

### **1.2.3 Análisis estadístico**

En ambos ensayos las variables evaluadas se analizaron mediante la prueba de Shapiro y Wilks (1965), esto con la finalidad de determinar la normalidad de los datos, además se empleó la prueba de Bartlett (1937), para comprobar la homogeneidad de varianzas (homocedasticidad). Las cuales en el primer ensayo se cumplieron en las variables longitud y anchura de hoja. Los datos días a emergencia de brote, longitud y diámetro de los bulbillos se normalizaron mediante la transformación a Log (x) y la variable número de raíz se normalizó con  $\sqrt{(x+1)}$ . Estas cinco variables se procesaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA), con el procedimiento Modelo Lineal Generalizado (GLM) y se utilizó la prueba de Tukey ( $\alpha= 0.05$ ) para la comparación de medias entre tratamientos. Desafortunadamente, no fue posible normalizar las siguientes variables: número de hojas, número de brotes, longitud y volumen de raíz y número de bulbillos. Los datos de estas cinco variables se analizaron con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

En el segundo ensayo las pruebas de normalidad de los datos y homogeneidad de varianzas se cumplieron, por lo que se procedió analizar los datos obtenidos mediante análisis de varianza ANDEVA con el procedimiento GLM. Posteriormente, a las variables que presentaron un nivel de significancia se les aplicó una prueba de Tukey ( $\alpha= 0.05$ ), la cual permitió realizar una comparación de medias entre tratamientos y correlaciones de Pearson entre las variables.

Todos los análisis estadísticos se efectuaron en el programa SAS® OnDemand for Academics (SAS, 2020).

## 1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1.3.1 Propagación clonal

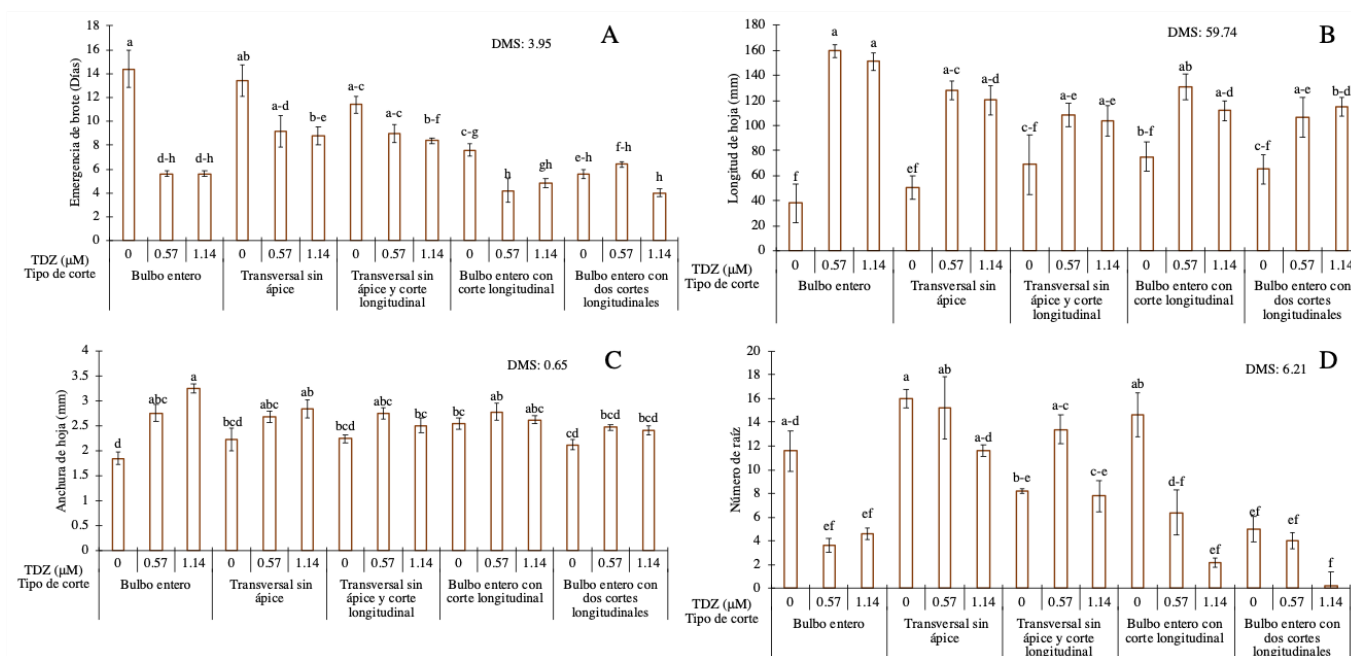
El ANDEVA determinó que el tipo de corte y la concentración de TDZ de forma independiente y la interacción de ambos factores influyeron en los días a emergencia de brotes, anchura de las hojas y número de raíces. La longitud de las hojas solo se afectó por la concentración de TDZ y la interacción de esta fitohormona con el tipo de corte (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto del tipo de corte en los bulbos y la concentración de TDZ en el crecimiento vegetativo de plantas de *Z. fosteri*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Emergencia de brote	Longitud hojas	Anchura hojas	Número raíces
Tipo de corte (TC)	4	0.313**	1247.29 <sup>ns</sup>	0.23*	7.70**
Concentración de tiazurón (TDZ)	2	0.347**	34237**	2.22**	7.26**
TC*TDZ	8	0.034**	1901.35*	0.35**	1.41**

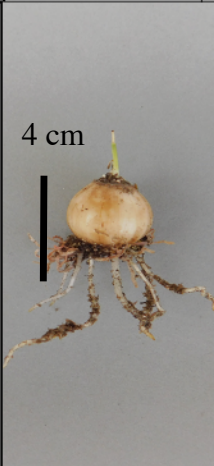














(\*\*) altamente significativo, (\*) significativo, (ns) no significativo.

La aplicación de tiazurón y el tipo de corte estimularon la emergencia de brotes (Figura 2A). En los bulbos enteros o con corte longitudinal tratados con TDZ (0.57 y 1.14  $\mu\text{M}$ ) los bulbos emergieron en promedio 4 dde y cuando no se aplicó TDZ en los bulbos enteros, bulbos con corte transversal sin ápice y bulbos con corte transversal sin ápice más cortes longitudinales, los brotes emergieron en promedio a los 13 dde. Esto ocurrió porque al retirar la parte apical de los bulbos, se interrumpe el transporte polar de auxinas, estimulando la regeneración de las yemas axilares y con la aplicación de TDZ se acelera la emergencia de los brotes, porque se estimula la división de las células en el meristemo apical, al mismo tiempo que se reprograma a las células para el inicio de la diferenciación de los brotes (Dey *et al.*, 2012). Así mismo, se modulan los niveles de otros reguladores de crecimiento como las auxinas, que influyen en la regeneración de las yemas axilares (Guo *et al.*, 2011).



**Figura 2.** Efecto del tipo de corte y concentración de TDZ en el desarrollo de bulbos de *Z. fosteri*. A) emergencia de brotes, B) longitud de hoja, C) anchura de la hoja D) Número de raíces. DMS= diferencia mínima significativa. Error estándar de los datos originales: indicado por las líneas en las barras.

La aplicación de TDZ (0.57 y 1.14  $\mu\text{M}$ ), en todos los tipos de corte generó un aumento mayor a dos veces en la longitud de las hojas, en comparación con los tratamientos en los que no se aplicó TDZ. Además, las hojas fueron 3 % más anchas cuando se dejó el bulbo entero y se aplicó TDZ (1.14  $\mu\text{M}$ ) (Figura 2B y C). El TDZ elimina la latencia apical y estimula el desarrollo de las yemas axilares al promover el crecimiento vegetativo; por su actividad biológica, induce acumulación de citocininas endógenas como la zeatina y el BA, que estimulan la división celular y promueven el desarrollo vegetativo (Nisler, 2018) (Figura 3). Algunos factores que influyen en los efectos de TDZ son las heridas en los tejidos y la concentración endógena de reguladores de la planta madre, ya que las plantas interpretan la presencia de TDZ como una manifestación de estrés y como respuesta inicial al estrés se induce la morfogénesis a través de otros reguladores de crecimiento y otros metabolitos de iones (Dinani *et al.*, 2018). Su forma de acción no solo es en el tratamiento inicial, sino que tiene la capacidad para resistir la degradación enzimática *in vivo*, lo que permite que los niveles de TDZ se mantengan estables con el tiempo (Kumar y Redy, 2012).

TDZ ( $\mu\text{M}$ )	Tipo de corte				
	Bulbo entero	Transversal sin ápice	Transversal sin ápice + corte longitudinal	Bulbo entero con corte longitudinal	Bulbo entero con dos cortes longitudinales
0					
1.14					
0.57					

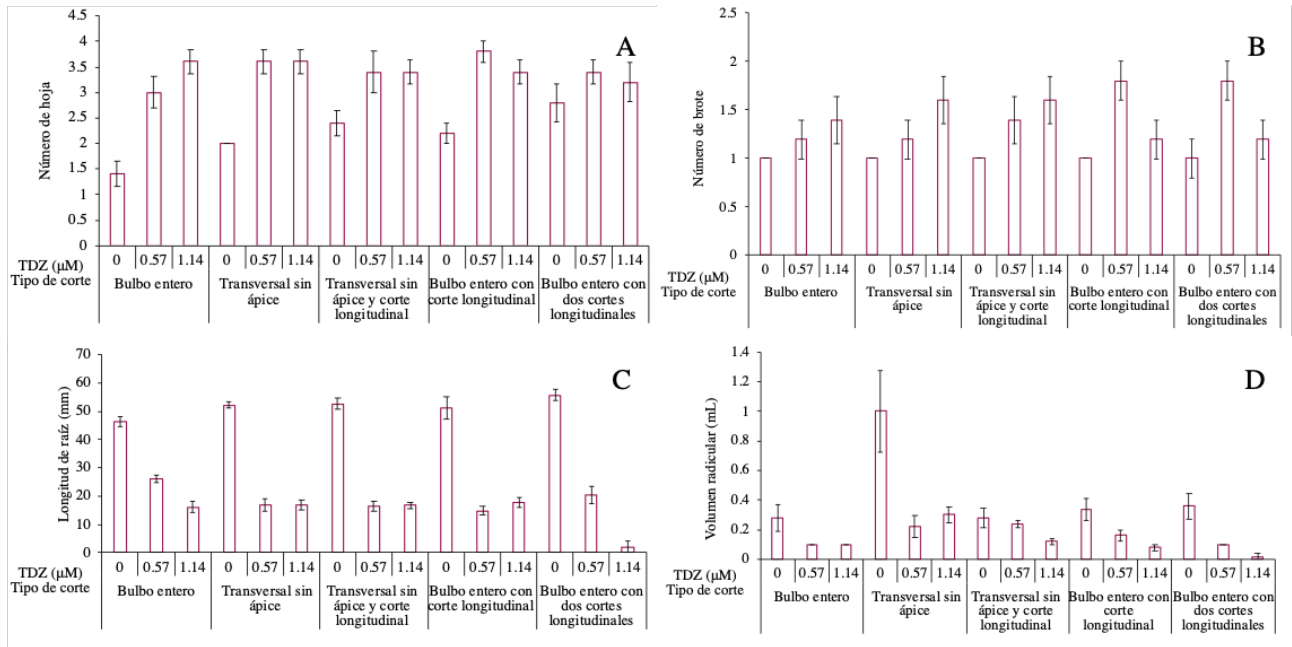
**Figura 3.** Desarrollo vegetativo de *Z. fosteri* con diferentes tipos de corte y concentraciones de TDZ.

Por el contrario, el TDZ (0.57 y 1.14  $\mu\text{M}$ ) inhibió el número de raíces en los bulbos, en promedio se obtuvieron 4.6 en comparación con los tratamientos sin esta hormona, donde se obtuvieron 11 raíces en promedio (Figura 2D). La exposición de TDZ en los explantes influye en la proliferación y elongación de brotes (Liu *et al.*, 2016), aumenta la tasa de multiplicación por su capacidad para romper la latencia apical (Guo *et al.*, 2011), influye en el nivel de auxinas endógenas en la planta a través de su acumulación y traslocación, esto proporciona una relación óptima de auxinas/citocininas en los tejidos (Jones *et al.*, 2007). Sin embargo, el TDZ inhibe el crecimiento de las raíces y se atribuye a que actúa como antagonista de las auxinas (Rolli, *et al.*, 2012). Su efecto está relacionado con su estructura química considerada fuerte, por que las citocininas débiles estimulan el enraizamiento de manera dependiente a la concentración (Nisler, 2018). El TDZ en *Lallemantia iberica* redujo drásticamente el desarrollo de las raíces al utilizar la concentración de 0.22 a 2  $\text{mg L}^{-1}$  (Pourebadi *et al.*, 2015).

La prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, indicó que existen diferencias altamente significativas entre tratamientos en las variables número de hoja, longitud y volumen radicular ( $P < 0.0001$ ), mientras que en la variable número de brote fue significativa ( $P < 0.01$ ). El análisis muestra que se obtuvo mayor número de hojas con el bulbo entero con corte longitudinal y 0.57  $\mu\text{M}$  TDZ (media 3.8; mediana 4; 0.44 D.E;  $P < 0.0001$ ) y en el mismo tipo de corte sin la aplicación de TDZ se redujo (media 2.20; mediana 2; 0.44 D.E;  $P < 0.0001$ ) (Figura 4A). El mayor número de brotes se obtuvo en el bulbo entero con corte longitudinal y 0.57  $\mu\text{M}$  TDZ (media 1.80; mediana 2; 0.44 D.E;  $P \leq 0.01$ ) y se redujo en todos los tipos de corte cuando no se aplicó TDZ (media 1; mediana 1; 0 D.E;  $P < 0.01$ ) (Figura 4B). La longitud de raíz fue mayor en el bulbo entero con dos cortes longitudinales sin la aplicación de TDZ (media 55.66; mediana 58.03; 4.55 D.E;  $P < 0.0001$ ), en el mismo tipo de corte con la aplicación de TDZ 1.14  $\mu\text{M}$  la raíz disminuyó (media 1.93; mediana 0; 4.32 D.E;  $P < 0.0001$ ) (Figura 4C). El volumen radicular fue mayor en el corte transversal sin ápice y sin TDZ (media 1; mediana 1; 0.61 D.E;  $P < 0.0001$ ), en todos los tipos de corte cuando se aplicó TDZ el volumen radicular se redujo (Figura 4D).

En *Zephyranthes fosteri* Traub. y *Z. lindleyana* Herb. se ha reportado que al cortar los bulbos madre en cuatro y seis partes se duplica el crecimiento vegetativo y radicular, así como la formación de bulbillos, estos resultados pueden deberse al número de cortes y a la eliminación de la yema apical que estimula la activación de las yemas axilares, ya que al plantar los bulbos completos se mantienen en latencia y no se interrumpe el flujo de nutrientes y hormonas para la

regeneración de nuevos bulbillos y cuando se extirpa una parte del bulbo, se eliminan las reservas para la formación de los bulbillos (Padilla *et al.*, 2016). En las especies *Habranthus brachyandrus* e *Hippeastrum striatum* al realizar un corte longitudinal seccionando al bulbo en dos partes iguales, se estimuló el crecimiento vegetativo y la emergencia de los bulbillos, ya que el estrés causado por los cortes al bulbo y la eliminación de la yema apical estimuló la activación de las yemas axilares, lo contrario sucedió cuando se mantuvo intacta la yema apical, que inhibió el crecimiento de las yemas internas de los catáfilos (Rodríguez *et al.*, 2018).



**Figura 4.** Efecto del tipo de corte y concentración de TDZ en el desarrollo de bulbos de *Z. fosteri*.

A) número de hojas, B) número de brotes, C) longitud de raíz, D) volumen radicular.

Error estándar de los datos originales: indicado por las líneas en las barras.

El ANDEVA paramétrico determinó que el tipo de corte y la concentración de TDZ de forma independiente y la interacción de ambos factores no influyeron en el desarrollo del diámetro y longitud de los bulbillos obtenidos 12 meses dde (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Cuadrados medios del análisis de varianza para el efecto del tipo de corte y la concentración de TDZ en el desarrollo de bulbillos de *Z. fosteri*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Longitud	Diámetro
Tipo de corte (TC)	4	0.15 <sup>ns</sup>	0.18 <sup>ns</sup>
Concentración de tidiazurón (TDZ)	2	0.004 <sup>ns</sup>	0.16 <sup>ns</sup>
TC*TDZ	5	0.002 <sup>ns</sup>	0.007 <sup>ns</sup>

(ns) no significativo.

El número de bulbillos formados por el bulbo madre a los 12 meses dde, fue mayor en el tipo de corte bulbo entero con cortes longitudinales, sin la aplicación de TDZ se generaron 7.7 bulbillos y con 0.57  $\mu$ M obtuvieron 5.25 bulbillos por planta en promedio, al mantener el bulbo entero se tiene mayor contenido de nutrientes y almidón para el desarrollo de las yemas axilares (Cuadro 3). Las yemas axilares para desarrollarse obtienen la mayor parte de carbono de las hojas formadas de la yema apical y las yemas ubicadas en medio del bulbo madre pueden no obtener suficiente sacarosa para romper la latencia, debido a la competencia con las yemas ya activas y al final del crecimiento anual solo dos o tres bulbillos alcanzan un tamaño similar al bulbo madre con la capacidad de florecer. En tulipán y lili se identificó la expresión del gen TgTB1, que es un marcador de latencia estimulado por la sacarosa, citocininas y la estrigolactona, este gen se evaluó en los bulbos que tienen un fenotipo denominado “Springpartij”, el cual hace que no exista control en el desarrollo de las yemas axilares en el bulbo madre incluidas las yemas axilares de las yemas axilares (yemas nietas), este fenotipo se repite en cada uno de los bulbos hijos, los bulbos con este fenotipo tenían una baja expresión de TgTB1 (Moreno-Pachón *et al.*, 2018).

**Cuadro 3.** Influencia del tipo de corte y la aplicación de citocininas (thidiazuron, TDZ) en bulbos de *Zephyranthes fosteri* para estimular la producción de bulbillos.

<b>Tipo de corte en el bulbo</b>	<b>TDZ (<math>\mu</math>M)</b>	<b>Número de plantas con bulbillos (n= 10)</b>	<b>Número de bulbillos por planta</b>	<b>Número total de bulbillos</b>
Bulbo entero	0	1	1	1
	0.57	1	1	1
	1.14	2	4	8
Transversal sin ápice	0	2	2	4
	0.57	3	1.6	5
	1.14	1	3	3
Transversal sin ápice y corte longitudinal	0	9	2	18
	0.57	7	3.2	23
	1.14	6	2	12
Bulbo entero con corte longitudinal	0	5	3	15
	0.57	5	2.8	14
	1.14	2	3	6
Bulbo entero con dos cortes longitudinales	0	7	7.7	54
	0.57	8	5.25	42
	1.14	3	2	6



### 1.3.2 Relación entre el calibre del bulbo y el desarrollo de la planta

El análisis de varianza a los 30 dde demostró que el calibre del bulbo influyó ( $P < 0.01$ ) en las variables número y anchura de hojas (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Análisis de varianza del efecto del calibre del bulbo de *Z. fosteri* en el desarrollo vegetativo a los 30 dde.

Variables	Media	Cuadrados Medios		Coeficiente de Variación	Coeficiente de Determinación
		Tratamientos	Error		
		Emergencia de brote	5.74		
Número de hojas	3.37	11.81 <sup>**</sup>	1.08	30.9	0.24
Longitud de hojas (mm)	78	1621.21 <sup>ns</sup>	942.77	39.9	0.048
Anchura de hoja (mm)	2	5.13 <sup>**</sup>	0.23	24.23	0.39

(\*\*) altamente significativo, (\*) significativo, (ns) no significativo.

El número y anchura de las hojas fue 50 % menor en el calibre de 6-12 y 13-18 mm, en relación al calibre 3, que generó el mayor número de hojas 4.03, con una anchura de 2.38 mm (Figura 5A y B). En *Lilium* sp. al considerar las características biométricas del bulbo, se encontró que en diámetros de 3.3 a 4 cm no se obtuvieron respuestas morfogénicas en las escamas de los bulbos, pero al utilizar bulbos de calibre de 5 cm se obtuvo la mejor respuesta, esto se debe a que existe una relación proporcional entre el tamaño del bulbo y la cantidad de carbohidratos almacenados en las escamas del bulbo madre (Vera *et al.*, 2020). El tamaño del bulbo madre determina si se producirán flores o no, incluso bajo condiciones ambientales favorables. Además, los bulbos grandes tienen mayor cantidad de reservas que influye en la calidad y número de flores, así como en la producción de plantas más vigorosas y de gran tamaño (Vallejo, 2017).

El análisis de varianza en las variables evaluadas a los 60 dde mostró que el calibre de los bulbos influyó ( $P < 0.01$ ) sólo en la anchura de las hojas (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Análisis de varianza del efecto del calibre en el desarrollo vegetativo de plantas de *Z. fosteri* a los 60 días después de la siembra.

Variables	Cuadrados Medios			Coeficiente de Variación	Coeficiente de Determinación
	Media	Tratamientos			
		Error			
Número de brote	1.34	0.039 <sup>ns</sup>	0.77	65.41	0.001
Número de hojas	2.74	5.02 <sup>ns</sup>	2.2	54.42	0.06
Longitud de hojas (mm)	61.64	1000.91 <sup>ns</sup>	2847.16	86.56	0.01
Anchura de hoja (mm)	2.15	7.40 <sup>**</sup>	0.50	33.05	0.30

(\*\*) altamente significativo, (\*) significativo, (ns) no significativo.

La anchura de la hoja fue mayor en el calibre de 19-26 mm (2.67 mm), esto es, 52 y 28 % más anchas que en los calibres 1 y 2 respectivamente. A los 60 dde las plantas entraron en estado de latencia después de su crecimiento anual y las hojas llegaron a su senescencia, esta puede ser la razón por la que se presentó diferencia solo en la variable anchura de hoja (Figura 5C). En plantas geófitas el final de la fase vegetativa se reconoce por la senescencia del follaje, la maduración de bulbo y la desintegración de raíces, esto indica que las plantas entran en periodo de latencia, se suspende el crecimiento visible, pero el desarrollo interno de los bulbos presenta procesos fisiológicos como el crecimiento de las yemas axilares, los factores que promueven la latencia son la temperatura y la ausencia de humedad (Vallejo, 2017). La especie *Hymenocallis* presenta una extendida latencia, que bajo condiciones de riego se presenta en diferentes tiempos del cultivo y se reconoce por la ausencia de hojas y escapos, se necesitan condiciones térmicas para romper el estado de latencia y producir hojas y escapos (Borys *et al.*, 2009).

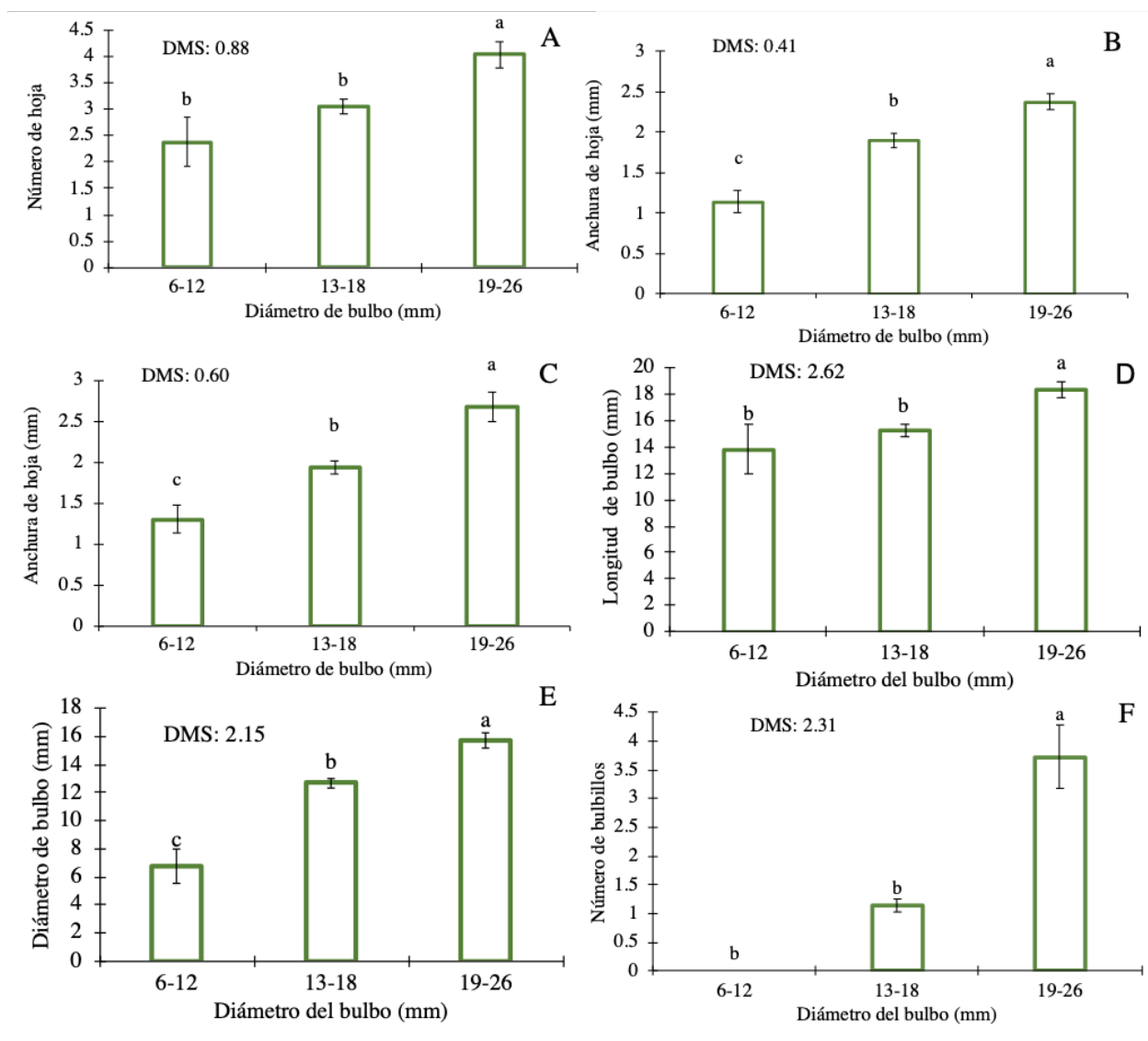
Los resultados evaluados 9 meses dde muestran que el calibre de bulbo influyó ( $P < 0.01$ ) en las variables diámetro polar y ecuatorial de los bulbos madre, así como en el número de bulbillos obtenidos por bulbo madre (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Análisis de varianza del efecto del calibre del bulbo en el desarrollo vegetativo y formación de bulbillos de plantas de *Z. fosteri* a los 9 meses después de la siembra.

Variables	Cuadrados Medios			Coeficiente de Variación	Coeficiente de Determinación
	Media	Tratamientos			
		Error			
Longitud	16.32	101.30**	9.47	18.85	0.24
Diámetro	13.22	258.53**	6.36	19.07	0.54
Número de bulbillos	1.72	36.32**	4.59	124.12	0.34
Longitud de bulbillos	10.89	0.735 <sup>ns</sup>	7.10	24.47	0.004
Diámetro de bulbillos	6.33	0.91 <sup>ns</sup>	1.16	20.03	0.024

(\*\*) altamente significativo, (\*) significativo, (ns) no significativo.

La selección de bulbos de calibre 3: peso de 4 a 10 g, diámetro de 19 a 26 mm y longitud de 18 a 26 mm, garantiza la reproducción de *Z. fosteri* a los 9 meses de la siembra. La longitud de los bulbos madre fue mayor en el calibre 3, en promedio midieron 18.33 mm, esto es 25.54 % mayor que los calibres 1 y 2 (Figura 5D). Para el diámetro del bulbo madre el calibre 3 en promedio midió 15.71 mm por bulbo, fué 50 y 20 % más grande que los calibres 1 y 2 (Figura 5E). El calibre 3 generó 3.72 bulbillos, fué mayor que el calibre 2, que solo se obtuvo 1.14 bulbillos, mientras que el calibre 1 no generó ningún bulbillo (Figura 5F). Sin embargo, no todos los bulbos madre presentaron bulbillos, en el calibre 2 solo 14 bulbos y en el calibre 3 solo 11, por lo que no todas las yemas axilares tienen el mismo comportamiento y su desarrollo puede estar influenciado por la edad y la actividad fisiológica de la planta, en la formación y el metabolismo del almidón y de la sacarosa presentes en el bulbo madre, ya que estos demandan la participación de carbohidratos en sus diferentes etapas de crecimiento (Li *et al.*, 2014). Por tanto, los bulbos que incrementan su tamaño a través del tiempo, pueden tener mayor capacidad de almacenar carbohidratos para su desarrollo. En *Lilium* sp. el principal problema es el tamaño pequeño de los bulbos, ya que este influye en la tasa de crecimiento, morfogénesis y en la transición entre varias fases vegetativas y reproductivas, así mismo influye en el almacenamiento interno y transporte de sacarosa en las escamas del bulbo, lo que a su vez influye en la regeneración y crecimiento de los bulbos tanto *in vivo* como *in vitro*, por lo tanto el almidón almacenado en las escamas grandes sustentan el crecimiento del bulbo, mientras que en los bulbos pequeños no se puede compensar el crecimiento (Islam *et al.*, 2017).



**Figura 5.** Efecto del calibre del bulbo en el desarrollo de plantas de *Z. fosteri*. A) número de hojas a los 30 dde, B) anchura de hoja a los 30 dde, C) anchura de las hojas 60 dde, D) longitud final del bulbo madre, E) diámetro final del bulbo madre y F) número de bulbillos a los 9 meses dde. DMS= diferencia mínima significativa. Error estándar de los datos originales: indicado por las líneas en las barras.

Los coeficientes de correlación fueron positivos y altamente significativos entre el calibre del bulbo, con la longitud inicial (0.61), diámetro inicial (0.89), con el número de hojas a los 30 dde (0.49) y la anchura de las hojas a los 30 y 60 dde (0.60 y 0.54). La longitud y diámetro inicial presentaron una correlación positiva con el ancho de hoja a los 30 y 60 dde (0.60 y 0.58) y con la longitud y diámetro final (0.48 y 0.71). El desarrollo morfológico y la diferenciación de las yemas axilares depende de la madurez fisiológica de los bulbos que es inducida por factores como la

latencia, el tamaño, el peso y los cambios de temperatura; sin embargo, es difícil de conocer cuando se recolectan los bulbos (Cuadro 7). Para que un bulbo se desarrolle y forme bulbillos depende de su madurez fisiológica que es inducida por factores como el tamaño, peso y temperatura que suprimen la latencia de las yemas axilares (Vallejo, 2017). En iris y tulipán aunque los bulbos presenten botones florales no es un indicativo para caracterizar su estado fisiológico, ya que su comportamiento posterior no se puede predecir, se ha demostrado que cuando el bulbo no llega a su madurez fisiológica no puede reaccionar a factores externos favorables para los procesos de crecimiento. Además, las yemas axilares más externas inician primero su desarrollo que es inhibido por la yema apical y dos o tres primordios florales, posterior a la floración se activa nuevamente la diferenciación de las yemas axilares (Moreno-Pachón *et al.*, 2018). Esta organogénesis comparte muchos elementos comunes con la vía genética que controla la inducción floral y que se genera por las hojas, llamada flowering locus T proteínas de tipo ft:StSP3D para floración y StSP6A para yemas axilares, ambos genes están relacionados con los órganos fuente y demanda de la planta. Cuando inicia el crecimiento de las yemas axilares y floración, los fotoasimilados se direccionan hacia ambos órganos y la concentración de sacarosa también actúa como señalizadora de estos procesos (Lehretz *et al.*, 2019).

El comportamiento de las yemas axilares depende de la madurez fisiológica de los bulbos y cormos, los cuales pasan por dos fases: la primera coincide con el periodo de latencia y dependiendo de la especie puede ser larga, en esta fase no es posible el crecimiento de los bulbos hijos, incluso si los bulbos y cormos se colocan en condiciones favorables para la inducción o procesos de crecimiento según la especie crezca en primavera, verano o invierno. La segunda fase es cuando el bulbo adquiere la capacidad de crecimiento y es inducida rápidamente si cambia la temperatura, para gladiolo altas y medias y para tulipán e iris bajas y medias (Vallejo, 2017). En este sentido, el uso de reguladores de crecimiento es una alternativa que puede reemplazar algunos tratamientos de temperatura que son largos y costosos. Además, es importante conocer los patrones de comportamientos de los bulbos para así lograr que sean más homogéneos.

**Cuadro 7.** Coeficientes de correlación y su significancia estadística en bulbos de *Z. fosteri* de diversos tamaños.

VARIABLES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 Calibre del bulbo	1.00	<b>0.61**</b>	<b>0.89**</b>	-0.14	<b>0.49**</b>	0.14	<b>0.61**</b>	0.02	0.24	0.08	<b>0.54**</b>	<b>0.48**</b>	<b>0.71**</b>
2 Longitud inicial		1.00	<b>0.75**</b>	-0.13	0.38	0.11	<b>0.60**</b>	0.03	0.26	-0.20	<b>0.58**</b>	<b>0.61**</b>	<b>0.72**</b>
3 Diámetro inicial			1.00	-0.08	<b>0.48**</b>	0.15	<b>0.70**</b>	-0.02	0.25	0.06	<b>0.55**</b>	<b>0.55**</b>	<b>0.81**</b>
4 Emergencia de brote				1.00	-0.18	<b>-0.57**</b>	-0.10	-0.18	-0.10	-0.15	-0.04	-0.05	-0.08
5 Número de hojas 30 días					1.00	0.11	<b>0.46**</b>	0.12	<b>0.59**</b>	0.11	0.35	0.20	0.40
6 Longitud de hojas (mm) 30 días						1.00	0.27	-0.06	0.20	<b>0.53**</b>	0.16	-0.01	0.24
7 Anchura de hoja (mm) 30 días							1.00	-0.12	0.38	0.16	<b>0.70**</b>	0.44	<b>0.69**</b>
8 Número de brotes 60 días								1.00	0.13	-0.03	0.09	-0.04	-0.15
9 Número de hojas 60 días									1.00	0.34	0.37	0.16	0.19
10 Longitud de hojas (mm) 60 días										1.00	0.19	0.02	0.15
11 Anchura de hojas (mm) 60 días											1.00	0.38	<b>0.56**</b>
12 Longitud final												1.00	<b>0.58**</b>
13 Diámetro final													1.00

(\*\*) altamente significativo, (\*) significativo, (ns) no significativo.

## 1.4 CONCLUSIÓN

Bajo las condiciones evaluadas se logró la propagación asexual de *Z. fosteri* y la reducción en el tiempo de emergencia de los bulbos a 4 dde al tratar los bulbos enteros o con corte longitudinal con TDZ 0.57 y 1.14  $\mu\text{M}$ . Estas concentraciones favorecieron un 50 % el desarrollo vegetativo en todos los tipos de corte. El bulbo entero con dos cortes longitudinales sin TDZ generaron 54 bulbillos en total. En *Z. fosteri* se determinó que la propagación a partir de bulbos con calibre de 19 a 26 mm favorecen el desarrollo de las plantas 50 % y se obtiene mayor número de bulbillos (3.72 en promedio), respecto a la propagación a partir de bulbos de menor calibre. Estos métodos generan avances para la propagación vegetativa de plantas silvestres *Z. fosteri*, con el fin de producir plantas idénticas de genotipos selectos para su mejoramiento genético, esta reproducción asexual se considera de vital importancia para la propagación de individuos homogéneos en el cultivo.

## 1.5 LITERATURA CITADA

- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 1995. **Edafología. Escalas 1:250,000 y 1:1,000,000**. México. Archivo vectorial shapefile. México, D.F., México.
- Baránek, M., J. Čechová., J. Raddová., V. Holleínová., E. Ondrušíková and M. Pidra. 2015. **Dynamics and reversibility of the DNA methylation landscape of grapevine plants (*Vitis vinifera*) stressed by *in vitro* cultivation and thermotherapy**. PLoS One, 10(5): e0126638. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126638>
- Bartlett, M. S. 1937. **Properties of sufficiency and statistical tests**. Proceedings of the Royal Society of London: Series A, Mathematical and Physical Sciences, 160(901): pp. 268-282.
- Bastida, J., R. Lavilla and F. Viladomat. 2006. **Chemical and biological aspects of Narcissus alkaloids**. The alkaloids: chemistry and biology, 63: 87-179. doi:10.1016/S1099-4831(06)63003-4
- Borys, M., H. Leszcynska-Borys and J. Galvan. 2009. **Hymenocallis Salisb. – Bulbs reaction to applied temperatures**. Acta Horticulturae, 813: 631-636. doi: 10.17660/Acta Hortic.2009.813.88
- Dey, M., S. Bakshi., G. Galiba., L. Sahoo and S. K Panda. 2012. **Development of a genotype independent and transformation amenable regeneration system from shoot apex in rice (*Oryza sativa* spp. indica) using TDZ**. 3 Biotech, 2(3): 233-240. doi: <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0051-y>
- Dhiman, M. R., M. S. Guleria., C. Parkash., and R. Kumar. 2015. **Effect of different chemical compounds on leaf chlorophyll content and postharvest quality of *Lilium***. International Journal of Horticulture. 5: 1-16. doi: 10.5376/ijh.2015.05.0018
- Dinani, E. T., M. R. Shukla., C. E. Turi, J. A. Sullivan and P. K. Saxena. 2018. **Thidiazuron: modulator of morphogenesis *in vitro*. Thidiazuron: from urea derivative to plant growth regulator**. 1-36. doi: [https://doi.org/10.1007/978-981-10-8004-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-10-8004-3_1)
- Francescangeli, N. y P. Marinangeli. 2018. **Guía práctica para el cultivo de flores y bulbos de *Tulipa***. pp. 33. Ediciones INTA. [https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta\\_\\_guia\\_practica\\_para\\_el\\_cultivo\\_de\\_flores\\_y\\_bulbos\\_de\\_tulipan.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta__guia_practica_para_el_cultivo_de_flores_y_bulbos_de_tulipan.pdf)



- Francescangeli, N. y P. Marinangeli. 2018. **Guía práctica para el cultivo de flores y bulbos de *Lilium***. pp. 33. Ediciones INTA. [https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta\\_guia\\_para\\_cultivo\\_lilium.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_guia_para_cultivo_lilium.pdf)
- Ferrante, A. M. S. and A. G Serra. 2003. **Treatment with thidiazuron for preventing leaf yellowing in cut tulips and chrysanthemum**. Acta Horticulturae 624:357–363. doi: 10.17660/Acta Hortic.2003.624.49
- Guo, B., B. H. Abbasi., A. Zeb., L. L. Xu., and Y. H. Wei. 2011. **Thidiazuron: a multi-dimensional plant growth regulator**. African Journal of Biotechnology 10 (45): 8984-9000. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.10.012>
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2016. **Uso del suelo y vegetación**. Escala 1:250 000.Serie VI (capa unión) Archivo vectorial Shapefile. México D.F., México.
- Ikegami, M., D. F. Whigham and M. J. Werger. 2012. **Effects of local density of clonal plants on their sexual and vegetative propagation strategies in a lattice structure model**. Ecological modelling, 234, 51-59. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2012.03.026>
- Islam, M. S., M. Z. K. Roni and K. Shimasaki. 2017. **Factors affecting bulblet growth of *Lilium* sp. *in vitro* and *in vivo***. Plant Omics, 10(5): 263-268. doi: 10.21475/poj.10.05.17.pne872
- Jones, M., J. Cao., R. O'Brien., S. J. Murch and P. K. Saxena. 2007. **The mode of action of thidiazuron: auxins, indoleamines, and ion channels in the regeneration of *Echinacea purpurea* L.** Plant Cell Reports, 26(9): 1481-1490. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.10.012>
- Kamenetsky, R., A. Faigenboim., E. Shemesh Mayer., T. Ben Michael., C. Gershberg., S. Kimhi and A. Sherman. 2015. **Integrated transcriptome catalogue and organ-specific profiling of gene expression in fertile garlic (*Allium sativum* L.)**. BMC Genomics, 16(1), 1-16. doi: 10.1186/s12864-015-1212-2
- Kumar, N. and M. P. Reddy. 2012. **Thidiazuron (TDZ) induced plant regeneration from cotyledonary petiole explants of elite genotypes of *Jatropha curcas*: a candidate biodiesel plant**. Industrial crops and products, 39: 62-68. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.02.011>
- Leeggangers, H. A., N. Moreno-Pachon., H. Gude and R. G. Immink. 2013. **Transfer of knowledge about flowering and vegetative propagation from model species to**

- bulbous plants.** International Journal of Developmental Biology, 57(6-7-8), 611-620. doi: 10.1387/ijdb.130238ri
- Lehretz, G. G., S. Sonnewald., C. Hornyik., J. M. Corral and U. Sonnewald. 2019. **Post-transcriptional Regulation of FLOWERING LOCUS T Modulates Heat-Dependent Source-Sink Development in Potato.** Current Biology, 29(10): 1614-1624. e3. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.04.027>
- Li, X., C. Wang., J. Cheng., J. Zhang., J. A. Texeira da Silva., X. Liu., X. Duan., T. Li and H. Sun. 2014. **Transcriptome analysis of carbohydrate metabolism during bublet formation and development in *Lilium davidii* var. unicolor.** BMC Plant Biology, 14(1): 358. doi: <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0358-4>
- Liu, Y., J. Lu., H. Zhu., L. Li., Y. Shi and X. Yin. 2016. **Efficient culture protocol for plant regeneration from cotyledonary petiole explants of *Jatropha curcas* L.** Biotechnology and Biotechnological Equipment, 30(5): 907-914. doi: <https://doi.org/10.1080/13102818.2016.1199971>
- Minibayeva, F., R. P. Beckett and I. Kranner. 2015. **Roles of apoplastic peroxidases in plant response to wounding.** Phytochemistry, 112: 122-129. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.06.008>
- Moreno-Pachon, N. M., H. A. Leeggangers., H. Nijveen., E. Severing., H. Hilhorst and R. G. Immink. 2016. **Elucidating and mining the *Tulipa* and *Lilium* transcriptomes.** Plant Molecular Biology, 92(3): 249-261. doi: <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0508-1>
- Moreno-Pachon, N. M., M. C. Mutimawurugo., E. Heynen., L. Sergeeva., A. Benders., I. Blilou and R. G. Immink. 2018. **Role of *Tulipa gesneriana* TEOSINTE BRANCHED1 (TgTB1) in the control of axillary bud outgrowth in bulbs.** Plant reproduction, 31(2): 145-157. doi: <https://doi.org/10.1007/s00497-017-0316-z>
- Motte, H., D. Vereecke., D. Geelen and S. Werbrouck. 2014. **The molecular path to *in vitro* shoot regeneration.** Biotechnology Advances, 32(1): 107-121. doi: <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.12.002>
- Nisler, J. 2018. **Mode of Action, Use and Potential in Agriculture.** In: Ahmad, N., and M. Faisal, (eds). (eds). En Thidiazuron: de derivado de urea a regulador del crecimiento vegetal, Singapur, Springer. pp. 37-59 doi: [https://doi.org/10.1007/978-981-10-8004-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-10-8004-3_2)
- Padilla, A., M. Andrade., I. Tejacal., O. Villegas and D. Ghullén. 2016. **Vegetative and sexual propagation of mayito *Zephyranthes fosteri* Traub and *Zephyranthes lindleyana***

- Herb. Amaryllidaceae.** Acta Agrícola y Pecuaria, 2, 34- 42.  
<http://riaa.uaem.mx/handle/20.500.12055/55>
- Pourebab, N., R. Motafakkerzad., M. Kosari-Nasab., N. Farsad Akhtar y A. Movafeghi. 2015. **La influencia de las concentraciones de TDZ en el crecimiento *in vitro* y la producción de metabolitos secundarios por el cultivo de brotes y callos de Lallemania iberica.** Cultivo de Células, Tejidos y Órganos Vegetales, 122 (2): 331-339. doi: <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0769-4>
- Rameau, C., J. Bertheloot., N. Leduc., B. Andrieu., F. Foucher and S. Sakr. 2015. **Multiple pathways regulate shoot branching.** Frontiers in plant science, 5: 741. doi:10.3389/fpls.2014.00741
- Rodriguez Mata, O. A., A. I. Hofin y J. R. Davina. 2018. **Regeneración de bulbos de *Hippeastrum Striatum* y *Habranthus Brachyandrus* (Amaryllidaceae) sometidos a corte longitudinal.** Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, 53(4): 1-10. doi: <http://dx.doi.org/10.31055/1851.2372.v53.n4.21983>
- Rolli, E., M. Incerti., F. Brunoni., P. Vicini and A. Ricci. 2012. **Structure–activity relationships of N-phenyl-N'-benzothiazol-6-ylurea synthetic derivatives: cytokinin-like activity and adventitious rooting enhancement.** Phytochemistry, 74: 159-165. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.10.012>
- Rzedowski, R. J. y G. Calderón de 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. pp.1255-1258.
- Statistical OnDemand for Academics. **Resources/Sas Products and Solutions.** 2020. <https://welcome.oda.sas.com/unsupportedBrowserWarning>.
- Seyidoğlu, N., M. Zencirkıran and Y. Ayaşlıgıl. 2009. **Position and application areas of geophytes within landscape design.** African Journal of Agricultural Research 4(12): 1351-1357. <http://www.academicjournals.org/AJAR>
- Shapiro, S. and M. B. Wilks. 1965. **An analysis of variance test for normality.** Biometrika, 52: 591–611.
- Taiz, L. y E. Zeiger. 2013. **Translocação no Floema** Fisiologia Vegetal. 5ª Ed. Porto Alegre: Editora Artmed SA. pp. 221-249.
- Tu Parácuaro. 2022. <https://paracuaro.gob.mx/tumunicipio/medio-fisico>. 18 de Noviembre del 2022

- 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. doi: <http://dx.doi.org/10.21704/ac.v78i1.873>
- Vera Ramos, M. Á., C. E. Millones Chanamé y E. R. Vásquez Castro. 2020. **Inducción de bulbillos de azucena (*Lilium* sp.) a partir de escamas, empleando auxinas y citocininas.** *Scientia Agropecuaria*, 11(1): 75-81. doi: <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.01.09>

## CAPÍTULO II

### INDUCCIÓN DE POLIPLOIDÍA EN PLANTAS SILVESTRES DE *Zephyranthe fosteri*

#### RESUMEN

La geófito ornamental *Zephyranthes fosteri* es una planta silvestre nativa de México que se utiliza como planta en maceta o para adornar jardines; sin embargo, esta especie ha sido poco estudiada desde un enfoque de mejoramiento genético. El objetivo de esta investigación es determinar el método de aplicación, el tiempo de exposición y la concentración de colchicina para inducir variación fenotípica en bulbos de *Z. fosteri*. Se establecieron tres ensayos *in vitro*: 1) colchicina al 0.05 y 0.1 % incorporada en el medio de cultivo durante 30, 60, 90 y 120 días, 2) colchicina al 0.05 y 0.1 % sobre el medio de cultivo durante 60 días, 3) exposición recurrente de colchicina al 0.05 % y se expusieron 5 meses. Solo se calculó el porcentaje de supervivencia y el número de bulbillos por planta. La segunda parte se estableció *in vivo* y los bulbos se expusieron en colchicina al 0.1 % durante 6, 12, 18 y 24 horas. El diseño experimental fue al azar con arreglo factorial y las variables que se evaluaron fueron; el desarrollo vegetativo, el número, longitud y diámetro de los bulbillos. Los resultados indican que el mejor método *in vitro* es la exposición recurrente de plantulas a colchicina al 0.05 % durante 5 meses. En el invernadero los rasgos fenotípicos diferentes se presentaron con el tiempo de exposición de 12 h en colchicina al 0.1 %.

#### Palabras clave

Geófito, mejoramiento genético, colchicina, variación fenotípica.

## ABSTRACT

The ornamental geophyte *Zephyranthes fosteri* is a wild plant native to Mexico that is used as a potted plant or to decorate gardens; however, this species has been little studied from a breeding approach. The objective of this research is to determine the application method, exposure time and concentration of colchicine to induce phenotypic variation in bulbs of *Z. fosteri*. Three in vitro assays were established: 1) colchicine at 0.05 and 0.1 % incorporated in the culture medium for 30, 60, 90 and 120 days, 2) colchicine at 0.05 and 0.1 % on the culture medium for 60 days, 3) recurrent exposure of colchicine at 0.05 % and 5 months exposure. Only the survival percentage and the number of bulblets per plant were calculated. The second part was established in vivo and bulbs were exposed in 0.1 % colchicine for 6, 12, 18 and 24 hours. The experimental design was randomized with factorial arrangement and the variables evaluated were: vegetative development, number, length and diameter of bulblets. The results indicate that the best in vitro method is the recurrent exposure of seedlings to colchicine at 0.05% for 5 months. In the greenhouse, the different phenotypic traits were presented with the exposure time of 12 h in 0.1% colchicine.

### **Key words**

Geophyte, genetic improvement, colchicine, phenotypic variation.

## 2.1 INTRODUCCIÓN

La floricultura se ha convertido en una actividad rentable a nivel internacional, en 2014 el valor de la venta de ornamentales ascendió a más de 4.4 billones de euros, de los cuales 2.5 billones corresponden a las flores de corte (CBI Market Intelligence, 2016). En México el sector ornamental genera 188 mil empleos permanentes, 50 mil eventuales y más de un millón indirectos (SAGARPA, 2018).

Aunque el sector florícola internacional se ha visto favorecido por la obtención de variedades novedosas generadas a partir de germoplasma de plantas nativas mexicanas como los géneros *Dahlia*, *Euphorbia pulcherrima* y *Tagetes erecta*, estas especies se han mejorado en el extranjero y las variedades son importadas a nuestro país. Otros géneros como *Sprekelia*, *Hippeastrum* e *Himenocallis* han sido poco estudiados para obtener variedades con características morfológicas deseables como el tamaño y grosor de las hojas, flores más grandes con pétalos más gruesos, colores más intensos y con mayor duración poscosecha (Gámez-Montiel *et al.*, 2017).

*Zephyranthes fosteri* es una geófita herbácea, perenne, nativa de México, sus bulbos producen de uno a tres escapos con una flor de color rosa o blanca, que suelen durar de tres a siete días, su apariencia elegante le da el potencial para ser apreciada como elemento decorativo dentro del diseño de paisajes o como planta en maceta (Centeno-Betanzos *et al.*, 2021) pero se desconoce su manejo y el desarrollo de nuevas variedades ha sido poco explorado, por lo que este recurso fitogenético ornamental ha sido poco aprovechado de manera sostenible.

La poliploidía es un método que se emplea para la obtención de nuevas variedades, también puede ocurrir de forma natural, pero es un proceso lento. La poliploidía se produce cuando se duplica el número de cromosomas en las células somáticas de la planta, lo que ocasiona cambios en la expresión de los genes, reordenamientos cromosómicos, remodelaciones epigenéticas y modificaciones de jerarquías de regulación de genes (Manzoor *et al.*, 2019).

La inducción de poliploidía es más eficaz en comparación con los métodos de mejoramiento por mutación física y cruzamiento convencional debido a su fácil manejo en un periodo de tiempo corto y a que se obtiene mayor variación fenotípica. Además, las plantas poliploides aumentan el tamaño en sus estructuras vegetativas y reproductivas y también puede alterar sus hábitos de crecimiento (Manzoor *et al.*, 2019).

La poliploidía se puede inducir con inhibidores mitóticos como la colchicina que es un alcaloide venenoso extraído de toda la planta de azafrán (*Colchicum autumnale*) y se utiliza para

interrumpir el ciclo celular, ya que se une a las tubulinas, que son responsables de la estabilidad y la disposición de la estructura de los microtúbulos durante el ciclo celular; la colchicina impide que se formen los microtúbulos durante la mitosis y se detenga el ciclo celular en la metafase, para evitar que los pares de cromosomas se muevan a los polos opuestos durante la anafase, lo que provoca una reducción de la división celular y que la mitad de los gametos contengan el doble de cromosomas de lo normal, estos cambios en las células inducen diferencias en las características morfológicas en las plantas (Ade y Rai, 2010).

La colchicina es el mutágeno más usado en plantas, por su eficiencia; sin embargo, este agente antimitótico es altamente tóxico para las personas que lo manejan y para los tejidos vegetales (He *et al.*, 2016). En las plantas, los mejores resultados se obtienen cuando se utilizan concentraciones altas del agente antimitótico combinado con tiempos de exposición cortos; además, se debe de considerar que concentraciones superiores a la efectiva tienen un efecto letal en la supervivencia de las plantas y cuando se usan concentraciones bajas se debe prolongar el tiempo de exposición (He *et al.*, 2016).

La inducción de poliploidía se puede efectuar en cultivos *in vitro* donde se requiere una cantidad menor de agente antimitótico, es más rápida y sencilla en comparación con el método *in vivo* (Shariatpanahi *et al.*, 2021). En ambos casos, para desarrollar un protocolo eficiente se debe estandarizar para cada cultivo el tipo de agente antimitótico, la concentración óptima y el método de aplicación para cada cultivo, ya que los agentes antimitóticos promueven la duplicación de cromosomas que es un proceso biológico complejo y multivariable que interactúa con las características morfológicas y genéticas de las plantas, así como las señales ambientales que perciben (Khalili *et al.*, 2020).

En plantas geófitas ornamentales con importancia económica como aquellas de los géneros *Lilium*, *Tulipa*, *Hippeastrum* y *Narcissus*, la duplicación de cromosomas se ha logrado tratando diferentes tejidos de la planta (polen, flores, semillas y segmentos de escamas) con colchicina 0.01 a 0.5 % de 2 hasta 72 horas, con estos procedimientos se han mejorado características decorativas como tallos y escamas de los bulbos más gruesos, más hojas por planta, flores más grandes con nueva estructura, forma y color y larga vida de florero. La poliploidía también puede afectar la producción de metabolitos secundarios y proporcionar a las plantas mayor tolerancia al estrés, pero el efecto varía entre especies por lo que el método de inducción de poliploidia debe ser diferente para cada especie (Marasek-Ciolakowska *et al.*, 2021).



Actualmente no se ha determinado el método de aplicación, tiempo de exposición y la concentración de colchicina óptimos para establecer una metodología eficiente para inducir variación fenotípica en bulbos de *Z. fosteri*, por lo que la presente investigación se llevó a cabo con la hipótesis y objetivos siguientes:

#### Hipótesis

La exposición y dosis de colchicina *in vivo* e *in vitro* en bulbos de *Z. fosteri* genera plantas con variación fenotípica.

#### Objetivo

Determinar el método de aplicación, el tiempo de exposición y la concentración de colchicina para inducir variación fenotípica en bulbos de *Z. fosteri*.

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se efectuó en el periodo de marzo del 2021 a febrero del 2022. El material vegetal consistió en 452 semillas de *Z. fosteri* y 125 bulbos de plantas silvestres adultas recolectadas en el municipio de Parácuaro, Michoacán. Esta localidad se ubica en las coordenadas geográficas 19° 10' 00" de latitud Norte y los 102° 12' 31" de longitud Oeste. El clima dominante de la zona de recolecta es cálido húmedo (AWO), con 22 °C de temperatura media anual y 800 mm de precipitación acumulada anual (Tu Municipio, 2022). El suelo que predomina en el area de recolecta es vertisol pélico (Vp) (CONABIO, 1995). El uso de la vegetación y suelo en el área de estudio corresponde a agricultura de riego anual y permanente (RAP) (INEGI, 2016).

### 2.2.1 Inducción de variación fenotípica en condiciones *in vitro*

*Desinfección y siembra de semillas.* Las semillas se colocaron en bolsas de gasa pequeñas, dentro de un vaso de precipitados de 200 mL de capacidad y se desinfectaron durante 15 minutos con solución de hipoclorito de sodio (6 % de ingrediente activo) a 70 % v/v, 10 gotas de microdyn® y 1 g L<sup>-1</sup> de pentacloronitrobenzeno (300 g kg<sup>-1</sup> de i.a) y disulfuro de tetrametil tiuram (300 g kg<sup>-1</sup> de i.a) (Figura 1A). En la campana de flujo laminar las semillas se enjuagaron tres veces con agua estéril y se germinaron en medio Murashige y Skoog (MS) a 50 % de su concentración total de sales, sin fitohormonas y con 1 mg L<sup>-1</sup> de PPM®, sacarosa (30 g L<sup>-1</sup>), mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), tiamina (0.4 mg L<sup>-1</sup>) y agar (6 g L<sup>-1</sup>), el pH del medio se ajustó a 5.7 y se sirvió 20 mL de medio en cada frasco de vidrio de 100 mL de capacidad. Los frascos con medio se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 12 kg cm<sup>2</sup> de presión y 121 °C; en cada frasco se colocaron cuatro semillas (Figura 1B).



**Figura 1.** Metodología para la exposición al agente antimitótico colchicina en plántulas y bulbos de *Z. fosteri*. A) semillas, B) establecimiento *in vitro* de semillas, C) plántulas *in vitro* utilizadas para la exposición al agente antimitótico, D) bulbos utilizados para la exposición al agente antimitótico *in vivo*, E) exposición de bulbos en colchicina y F) bulbos en macetas con sustrato.

*Exposición en las plántulas de la colchicina incorporada en el medio de cultivo.* Dos meses después de la germinación, se utilizaron 360 plántulas, las cuales se sacaron de los frascos de cultivo, se les eliminó el ápice foliar y las raíces, y los bulbos se utilizaron como explantes. El medio de cultivo básico consistió en las sales minerales de MS con BA ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ), sacarosa ( $50 \text{ g L}^{-1}$ ), mio-inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), tiamina ( $0.4 \text{ mg L}^{-1}$ ) y agar ( $6 \text{ g L}^{-1}$ ). Para este ensayo, el medio basal se preparó con colchicina ( $1 \text{ mL}^{-1}$ ) a 0.05 y 0.1 % p/v, el pH se ajustó a 5.7 y la esterilización del medio se efectuó como se describió anteriormente; en cada frasco de cultivo se colocaron cuatro bulbos. Los bulbos tratados con colchicina se expusieron a este agente antimitótico durante 30, 60,

90 y 120 días, después las plantas se subcultivaron a medio MS básico fresco sin colchicina (Figura 1C). El diseño experimental fue al azar con arreglo factorial de tratamientos; nueve tratamientos se conformaron por la combinación de los factores concentración de colchicina (0.05 y 0.1 % p/v) y tiempo de exposición al agente antimitótico (30, 60, 90 y 120 días), el tratamiento testigo consistió en plántulas cultivadas *in vitro* sin colchicina. Cada tratamiento se repitió 10 veces, la unidad experimental consistió en un frasco de cultivo con cuatro plántulas.

*Exposición de plántulas a solución de la colchicina incorporada sobre el medio de cultivo.*

Los explantes consistieron en 48 bulbos de plántulas de 7 meses de edad de 0.5 a 1 cm de diámetro aproximadamente a los que se les efectuó un corte longitudinal, para estimular la formación de brotes sin llegar a afectar la placa basal. Estos explantes se cultivaron en frascos de vidrio con 20 mL de medio basal sólido MS y al momento de la siembra se adicionó 1 mL de colchicina a 0.05 y 0.1 % p/v por cada frasco, se consideró un tratamiento testigo sin colchicina al que se agregó sólo agua estéril; bajo estas condiciones los cultivos permanecieron durante 60 días, después las plántulas se subcultivaron a medio MS basal sin colchicina. El diseño experimental fue al azar, los tres tratamientos se repitieron cuatro veces y la unidad experimental consistió en un frasco con cuatro bulbos.

*Exposición recurrente de plántulas a la colchicina incorporada en el medio de cultivo.* Los explantes consistieron en 44 bulbos de plántulas de 10 meses de edad de 1 a 1.5 cm de diámetro aproximadamente a los que se les efectuó un corte longitudinal; estos tejidos se cultivaron en frascos de vidrio con 20 mL de medio MS basal. En el momento de la siembra y con una micropipeta, a cada frasco se le aplicó 1 mL de solución de colchicina 0.05 % p/v cada 8 días durante 1, 2 y 3 ocasiones, también se consideró un tratamiento testigo sin colchicina. Las plantas se mantuvieron en estas condiciones durante 5 meses, posteriormente se subcultivaron a medio sin colchicina y se les realizó un corte longitudinal para propagarlos vegetativamente.

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

En todos los experimentos *in vitro* se determinó el porcentaje de supervivencia de plantas y el número de bulbillos obtenidos.

### 2.2.2 Inducción de variación fenotípica en condiciones de invernadero

De la población silvestre de *Z. fosteri* ubicada en el municipio de Parácuaro, Michoacán se seleccionaron 125 bulbos con diámetro entre 0.5 a 3 cm. Los bulbos se lavaron con agua y jabón, se les retiró el primer catáfilo, las raíces y la parte apical, posteriormente se colocaron en un vaso de precipitado de 2 L de capacidad y se sumergieron en agua (tratamiento testigo) o solución de colchicina (0.1 % p/v) con 1 g L<sup>-1</sup> de pentacloronitrobenzeno (300 g de i.a kg<sup>-1</sup>) y disulfuro de tetrametil tiuram (300 g de i.a kg<sup>-1</sup>) durante 6, 12, 18 y 24 horas; la oxigenación de los bulbos se mantuvo constante (Figura 1D y E). Transcurrido el tiempo de exposición, los bulbos se retiraron de la solución de colchicina y se colocaron en macetas de plástico de 3” con sustrato compuesto por peat moss, vermiculita y perlita en proporción 2:2:1 (Figura 1F). Las macetas se colocaron en el invernadero a 25 °C de temperatura promedio en el día y 13 °C en la noche, humedad relativa de 60 % y fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. El diseño experimental fue al azar con cinco tratamientos y 25 repeticiones, la unidad experimental fue un bulbo. A los 30 días después de establecido el experimento (dde) con un vernier digital se evaluaron las siguientes variables: número, longitud y anchura de las hojas, número de hojas necróticas. A los 12 meses dde se evaluó la supervivencia de plantas, número y longitud de hojas, el número de bulbillos obtenidos por bulbo madre y longitud y diámetro de los bulbillos.

### 2.2.3 Análisis estadísticos

Para evaluar la normalidad de los datos obtenidos se utilizó la prueba de Shapiro Wilks (1965) y la prueba de Bartlett (1937) para determinar la homogeneidad de varianzas. Los datos longitud de hoja y longitud de bulbillos se normalizaron mediante la transformación  $x/2 + \log(x-1)$  y la variable diámetro de bulbillos se normalizó con  $1/x$ . Estas tres variables se procesaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) con el procedimiento GLM, se utilizó la prueba de Tukey ( $\alpha= 0.05$ ) para la comparación de medias entre tratamientos y la correlación de Pearson entre las variables. Aún cuando se hicieron transformaciones logarítmicas, matemáticas y trigonométricas no fue posible normalizar las variables supervivencia, número de hojas y número de bulbillos.

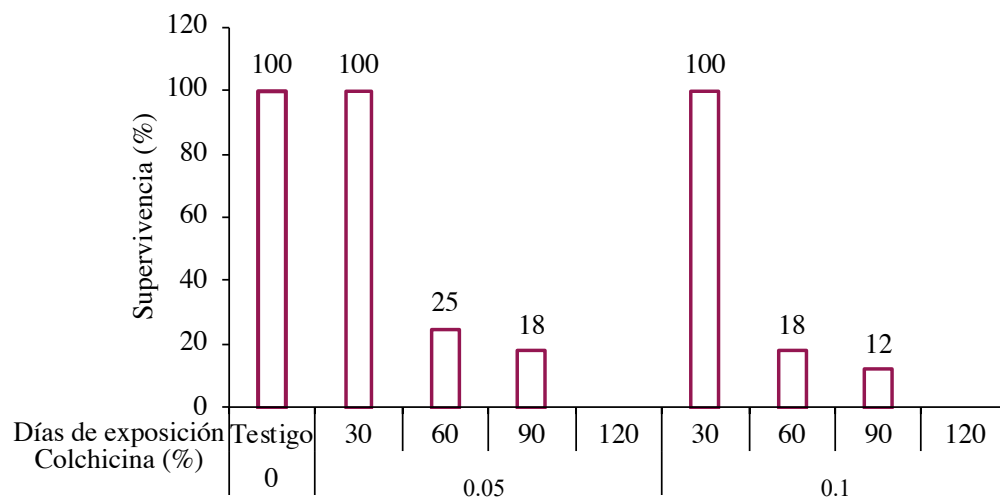
Los análisis estadísticos se efectuaron con el programa SAS® OnDemand for Academics (SAS, 2020).

## 2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

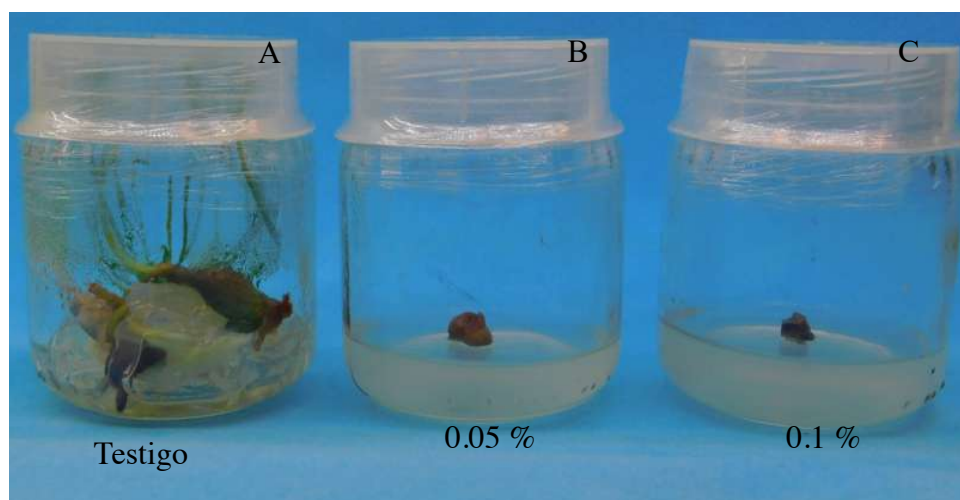
*Desinfección y siembra de semillas.* El 95 % de las semillas de *Z. fosteri* geminaron 3 días después establecido el experimento (dde). Dos días después, 20 % de las plántulas presentaron contaminación micelial, iniciando en la parte superficial del bulbillito y en las testas de las semillas que aún no geminaban. El micelio del hongo era color blanco y de textura algodonosa característico de *Fusarium* sp. La presencia de este tipo de microbiota edáfica en explantes de plantas geófitas representa un reto en su establecimiento *in vitro* (Juárez, 2021).

### 2.3.1 Inducción de variación fenotípica en condiciones *in vitro*

*Exposición en las plántulas de la colchicina incorporada en el medio de cultivo.* La incorporación de colchicina en el medio de cultivo sólido fue altamente tóxica para los tejidos de *Z. fosteri*, sobre todo cuando se prolongó el tiempo de exposición por más de 30 días. En el medio de cultivo con 0.05 % de colchicina sólo permanecieron vivos 25 y 18 % de los explantes a los 60 y 90 días después del inicio del experimento (dde); con 0.1 % del agente antimitótico, la supervivencia se redujo hasta 18 y 12 %. Ningún explante sobrevivió 120 dde a la exposición de colchicina (Figura 2), porque después de 30 dde los tejidos apicales de las hojas se empezaron a necrosar y 60 dde la necrosis tisular se extendió hacia los catáfilos y placa basal (Figura 3).



**Figura 2.** Efecto de la concentración y tiempo de exposición a la colchicina adicionada al medio de cultivo en plántulas de *Z. fosteri* propagadas *in vitro*



**Figura 3.** Bulbos de *Z. fosteri* con necrosis expuestos a colchicina 120 dde. A) testigo, B) colchicina a 0.05%, C) colchicina a 0.1 %.

La colchicina es un alcaloide venenoso que actúa como antitubulina, porque se forma un complejo tubulina-colchicina (TC) que evita el crecimiento de los microtúbulos al bloquear otros dímeros de tubulina. Este cambio puede ser la causa de la inestabilidad estructural de las células, por eso concentraciones altas de colchicina determinan si los microtúbulos siguen en crecimiento o comienzan a despolimerizarse (Chen *et al.*, 2009). El efecto tóxico y letal que tiene la colchicina en los tejidos vegetales dificulta establecer una dosis óptima generalizada para cada especie; por ejemplo, en explantes de callo *in vitro* de *Gladiolus tristis* tratado con colchicina se reportó sensibilidad alta a concentraciones de 0.01 y 0.05% aplicada sobre el medio de cultivo y en la especie *Echeveria* 'Peerless' se observó resistencia a los mutágenos ya que toleró hasta 0.8 % de colchicina durante 6 horas. Con base en estos datos, se puede considerar a *Z. fosteri* como muy sensible a la colchicina y por esto es necesario el establecimiento de ensayos para determinar la dosis, la tolerancia, el tipo de órgano y el tiempo óptimo para inducir poliploidía (Datta, 2020).

La sensibilidad de los tejidos vegetales a la colchicina es otro factor que está relacionada con la capacidad que tienen las células para soportar la duplicación de cromosomas, ya que, los genes derivados de una duplicación deberán tener la misma función y la acumulación de mutaciones de ambas copias a largo plazo da como resultado la pérdida funcional de una o de ambas copias; solo las plantas que soporten la poliploidía inducida se adaptarán a esas nuevas estructuras genéticas (Gu *et al.*, 2003). La posibilidad de obtener mutaciones es mayor si se logran

establecer dosis y tiempos de exposición a la colchicina que permitan una tasa de supervivencia de 50 % en poblaciones con gran número de individuos (Shu *et al.*, 2012).

En células humanas la diferencia entre la dosis terapéutica y la dosis tóxica de colchicina es muy estrecha y ocasionalmente los niveles se sobreponen (Stafford *et al.*, 2005); con una dosis óptima, el antimitótico es capaz de destruir células de tumores, pero una dosis excesiva puede causar efectos secundarios graves como necrosis tisular, coagulación intravenosa y muerte (Abdulbaqi *et al.*, 2018).

*Exposición de plántulas a solución de la colchicina incorporada sobre el medio de cultivo.* Con este método la colchicina afecta menos los tejidos de *Z. fosteri* en comparación con la incorporación del antimitótico en el medio de cultivo. El 62 y 68 % de las plántulas tratadas con 0.05 y 0.1 % de colchicina durante 60 días murieron. Las plantas sobrevivientes, 6 plantas tratadas con 0.05 % de colchicina y 5 plantas tratadas con 0.1%, produjeron 14 y 8 nuevos bulbillos en total, respectivamente; es decir las plantas tratadas con 0.05 % de colchicina produjeron el doble de bulbillos que las plantas sin colchicina (Cuadro 1); sin embargo, el crecimiento de estos bulbillos fue lento, porque las plantas poliploides inducidas tienen que pasar por un proceso de adaptación a su nueva estructura genética y su crecimiento es más lento, ya que la acción de la colchicina es inhibir la interacción con los enlaces disulfuro de la proteína del huso y la conversión de las proteínas fibrosas, que al final de los tratamientos vuelven a interactuar, de tal manera que el huso regresa a su modo normal y las células pueden volver a su división mitótica normal en las plantas generadas en el segundo y tercer ciclo de reproducción (Molero *et al.*, 2018). Se pudo observar que la heterogeneidad en el tamaño de los bulbos colectados de una población silvestre pudo influir en la supervivencia, como ocurrió en el ensayo de propagación vegetativa (Capítulo II) donde se observó que para poder reproducir 3 brotes en promedio, los bulbos originales deben presentar un diámetro mínimo de 19-26 mm.



**Cuadro 1.** Supervivencia de plántulas de *Z. fosteri* expuestas a colchicina aplicada sobre el medio de cultivo.

Colchicina (%)	Numero de plantas tratadas	Edad de las plántulas (Meses)	Plantas vivas		Número de bulbillos
			Número	(%)	
0	16	7	16	100	19
0.05	16	7	6	37	14
0.1	16	7	5	31	8

Con base en nuestros datos fue evidente que aplicar colchicina mezclada en el medio de cultivo fue más tóxica para los bulbos que aplicarla sobre los tejidos; aunque la exposición debe ser gradual y no exceder 5 meses.

En general, los principales medios de tratamiento con colchicina incluyen inmersión, inyección, recubrimiento, entre otros y el método de tratamiento empleado debe diseñarse específicamente de acuerdo con las características del material vegetal. En eucalipto al utilizar colchicina al 0.25 %, con el método de aplicación lento y con exposiciones recurrentes en las flores, se logró obtener individuos triploides con características morfológicas diferentes (Yang *et al.*, 2018), además estos autores sugieren que al utilizar temperaturas altas se puede aumentar rápidamente el tiempo que se necesita para el transporte de colchicina y evitar su toxicidad en los materiales vegetales, aumentando la inducción de plantas triploides.

*Exposición recurrente de plántulas a la colchicina incorporada en el medio de cultivo.* En el tercer ensayo 75 % de las plántulas sobrevivió y se obtuvieron 39 bulbillos. La madurez fisiológica de los bulbos fue importante para la supervivencia, aunque ésta no se presenta uniforme y dependerá de cada individuo (Cuadro 2). En diferentes plantas como en gladiolo, lili y gerbera, los investigadores han adaptado protocolos para el mejoramiento genético *in vitro* y han logrado mejorar las características ornamentales de estas plantas (Manzoor *et al.*, 2018; Balodé *et al.*, 20028; Khalili *et al.*, 2020.). No obstante, para llegar a estos resultados los investigadores tuvieron que generar la metodología adecuada para cada especie.

**Cuadro 2.** Supervivencia de plántulas de *Z. fosteri* expuestos de manera recurrente a colchicina 5 meses dde.

Método de aplicación de colchicina	Edad de las plántulas			Muertas (%)	Total de Número de bulbillos
	(Meses)	colchicina (%)	plantas vivas (%)		
Tres aplicaciones	10	0.05	75	25	39
Testigo	10	0	100	0	18

Se ha documentado que otras de las respuesta de la colchicina en los tejidos es que provoca toxicidad, debido a que no promueve la síntesis de etileno, inhibe el crecimiento celular, la absorción de solutos y la respiración en las plantas (Nooden, 1971), estos efectos se presentaron en esquejes de *Echeveria* tratados con 0.2 % de colchicina durante 6 horas, en los cuales se obtuvo una supervivencia del 50 %, en comparación con los esquejes tratados con 0.8 y 1.0 % de colchicina durante tiempos prolongados (9 y 12 horas), esta últimas no produjeron plantas mutantes y mostraron una tasa de supervivencia inferior 50 % (Cabahug *et al.*, 2021). En *Aloe vera* al exponer las plantas a colchicina 0.15 % durante 72 horas, se obtuvo un crecimiento normal de los brotes, los tallos y las hojas fueron más engrosadas y en roseta apiñadas; sin embargo, estos tejidos presentaron necrosis y problemas para desarrollarse *in vitro*, en comparación con las plantas tratadas con 0.05 % de colchicina durante 48 horas, donde su crecimiento fue normal y se obtuvieron pocos cambios citogenéticos, lo que indica que la concentración y el tiempo de exposición en ambas especies fue bastante alta y provocó toxicidad en los tejidos (Molero *et al.*, 2018).

### 2.3.2 Exposición de bulbos al agente antimetabólico *in vivo*

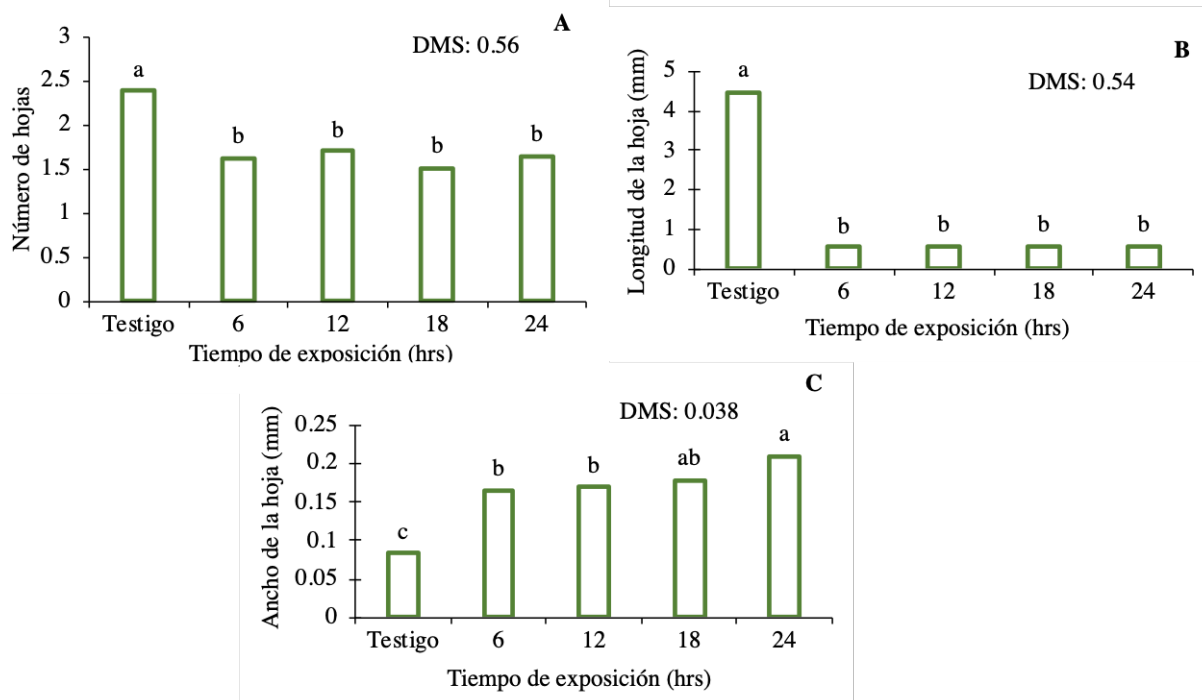
El tiempo de exposición a solución de colchicina 0.1 % (6, 12 18 y 24 h) influyó significativamente ( $P < 0.01$ ) en las variables número, longitud y anchura de las hojas en las plantas de *Z. fosteri* 30 dde.

El número y longitud de hojas disminuyó 34 y 87 % respectivamente, en las plantas tratadas con colchicina, valores estadísticamente superiores al testigo que en promedio desarrollan 2.4 hojas de 4.48 mm de largo (Figura 4A y B). Por el contrario la exposición por 24 h en colchicina, aumentó 62 % la anchura de las hojas, con respecto a las plantas testigo (Figura 4 C). Las hojas presentaron

diferencias morfológicas. Sin embargo después de 15 días éstas se tornaron necróticas, ya que la colchicina afectó su desarrollo normal. Además después de 30 días el crecimiento vegetativo disminuyó y las plantas entraron en estado de latencia durante 12 meses. Cuando las plantas sobrepasaron la latencia las característica de mayor anchura y longitud de hojas en las plantas tratadas con colchicina ya no fue notorio.

Los efectos tóxicos de la colchicina y los cambios morfológicos que provoca cuando se emplean concentraciones mayores de 0.1 % han sido documentados en otras especies ornamentales, por ejemplo, en *Heliconia bihai* L. donde se observó retraso en el crecimiento de las plantas y alteraciones como menor longitud en las hojas, mas estrechas y comprimidas en las plantas tratadas en comparación con las plantas testigo. Estos efectos están relacionados con la acción de la colchicina, que bloquea la formación de las fibras de huso acromático y altera o interrumpe por completo el ciclo mitótico, lo que produce perturbaciones fisiológicas en las células y resulta en la reducción de la tasa de división celular (Cavalcanti, 2011).

En la geófito *Rhodophiala montana*, se logró inducir la duplicación cromosómica, pero la exposición a la colchicina redujo la tasa de supervivencia en 20 % y su capacidad de reproducir brotes y raíces en 73 y 30 %, respectivamente (Jara *et al.*, 2006). En los géneros *Lilium* y *Tulipa* se ha inducido poliploidia con concentraciones de colchicina desde 0.01 a 0.1 % y tiempos de exposición que van desde 4 hasta 72 horas, se utilizaron como explantes escamas de los bulbos, semillas y polen. Con estas técnicas se ha logrado obtener cambios ornamentales deseables como hojas más gruesas y cortas, flores de mayor tamaño así como su forma y color de pétalos diferente. Algunas de estas alteraciones en las plantas pueden ser inviables y puede reducir la eficiencia para obtener plantas poliploides; sin embargo, se recomienda utilizar poblaciones grandes de plantas o explantes para aumentar la probabilidad de obtener mutaciones (Feng *et al.*, 2017).



**Figura 4.** Efecto del tiempo de exposición a la colchicina en el desarrollo morfológico de plantas *Z. fosteri*. A) número de hojas, B) longitud de hoja, C) anchura de la hoja 30 dde.

En nuestro estudio se hizo evidente el efecto de la colchicina en los bulbos de *Z. fosteri*, ya que se registraron coeficientes de correlación negativos y altamente significativos entre el tiempo de exposición y las variables número de hojas (-0.30) y longitud de hojas (-0.65). Por el contrario, se registró una correlación positiva entre tiempo de exposición a la colchicina y la anchura de las hojas (0.60) (Cuadro 3). Cambios similares se han obtenido al tratar otras plantas bulbosas con este agente antimitótico; en *Lilium* la exposición a colchicina al 1 % por 24 horas duplicó los cromosomas y produjo bulbos con escamas 50 % más anchas, mientras que los bulbos de *Dendrobium nobile* tratados con 0.01 % durante 96 horas redujeron su tamaño 64 % en comparación al testigo. Sin embargo, en ambas especies se lograron plantas con cambios en características morfológicas como mayor altura (125.81 mm), longitud de tallos (96.44 mm) y variaciones en el color blanco y forma de rosetas de las flores, lo que aumentó su valor ornamental y comercial (Balodé, 2008., Vichiato *et al.*, 2007).

Nuestros resultados indican que el método *in vivo* es más sencillo de utilizar para inducir la duplicación cromosómica, ya que se requiere de menos herramientas y costos. Sin embargo, la limitación de este método es que se necesita más tiempo para propagar y establecer una población

de poliploides, además de que los cambios morfológicos no siempre son homogéneos y estables entre generaciones (Eng y Ho, 2019), porque en la evaluación que se efectuó a los 365 dde el tiempo de exposición a la colchicina solo afectó de manera significativa a las variables longitud de hoja y diámetro de bulbillos.

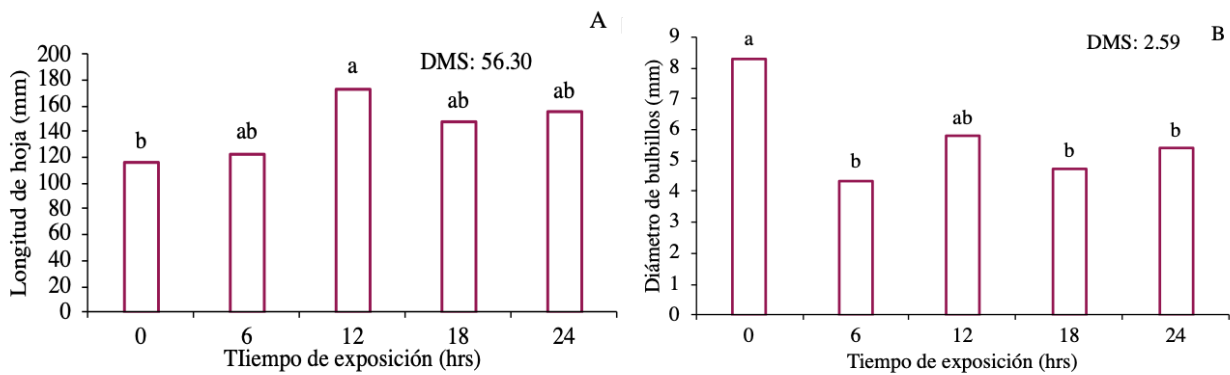
**Cuadro 3.** Correlación del efecto de la colchicina y tiempo de exposición para el desarrollo morfológico de *Z. fosteri*.

VARIABLES	1	2	3	4	5
1 Colchicina (h)	1.00	-0.30**	-0.65**	0.60**	0.098 <sup>ns</sup>
2 Número de hojas.		1.00	0.43**	-0.19*	-0.37**
3 Longitud de hojas (mm)			1.00	-0.54**	-0.21*
4 Anchura de hojas (mm)				1.00	0.20*
5 Hojas necróticas					1.00

(\*\*) altamente significativo, (\*) significativo, (ns) no significativo.

El ANDEVA determinó que la colchicina a 0.1% y el tiempo de exposición influyó significativamente ( $P < 0.01$ ) en la variable longitud de hoja y fue altamente significativo para el diámetro de bulbillos a los 12 meses dde.

Con 12 horas de exposición a colchicina, las hojas fueron 34 % mas largas que el testigo sin colchicina (Figura 5A); aunque el diámetro de los bulbillos fue mayor en las plantas testigo, que en promedio midieron 8.3 mm, es decir casi el doble del diámetro de los bulbillos de plantas expuestas a colchicina durante 6, 18 y 24 h (Figura 5B). El aumento en el largo y anchura de las hojas es muy común en las plantas poliploides; este efecto se ha observado en *Kalanchoe daigremotiana* tratado con 0.025 % de colchicina por 24 y 48 h junto con el incremento en el volumen foliar y el número de hijuelos (Salazar *et al.*, 2018). También en plantas de *Trachyspermum ammi* tratadas con 0.1 % de colchicina durante 6 h se aumentó 72 % la altura de la planta y con 0.05 % por 48 h se aumentó 1.13 cm la longitud de las hojas (Sadad *et al.*, 2017). Sin embargo, las ventajas mas importantes de generar plantas poliploides es que las plantas obtenidas suelen tener mejor rendimiento y características morfológicas como longitud, anchura de hoja, rizoma o raíz (Hannweg *et al.*, 2016); fisiológicamente también puede incrementar la biomasa y la capacidad fotosintética (Urwin, 2014).



**Figura 5.** Efecto del tiempo de exposición a la colchicina para el desarrollo morfológico de plantas de *Z. fosteri* 12 meses después. A) longitud de hoja y B) diámetro de bulbillos.

El efecto letal que causa la colchicina en los tejidos vegetales se mantuvo a los 360 dde, sobre todo en los bulbos expuestos desde 6 a 18 horas, que en promedio registraron 54 % de supervivencia; la excepción a esta tendencia se observó en los bulbos tratados con agente antimitótico por 24 horas, porque 84 % de los bulbos sobrevivieron y 60 % de las plantas generaron bulbillos nuevos, 8 % más que las plantas del tratamiento testigo. Otro efecto estimulante se registró en las plantas con colchicina durante 6 y 12 horas, en el primer caso se duplicó el número de hojas por planta y con ambos tratamientos las plantas produjeron cuatro bulbillos más en comparación con las plantas testigo (Cuadro 4). Pero este efecto benéfico no siempre se observa en las plantas con diferentes niveles de poliploidía (Vichiato *et al.*, 2007), en la especie *Bulbophyllum ipanemense* los individuos diploides y tetraploides visualmente no presentaron ningún cambio morfológico asociado a la poliploidía, ni aumentaron su tamaño (Farinaci, 2001). La poliploidía en plantas provoca efectos estimulantes que algunos autores denominan “giga”, es decir incrementos en algunas estructuras vegetativas, como en plantas tetraploides de gerbera obtenidas con colchicina 0.2% por 2 h tuvieron hojas de 2.53 cm de anchura y brotes 7.25 cm más largos. Estos efectos benéficos sólo se logran con dosis y tiempos de exposición óptimos, ya que dosis muy bajas de colchicina no tienen efecto y dosis extremadamente altas son letales para gerbera por que provocan necrosis tisular; además, existe correlación entre la concentración y la tasa de supervivencia de las plantas (Khalili *et al.*, 2020).

La variación del material vegetal, la concentración de colchicina, el tiempo de exposición y el método de aplicación son esenciales para un programa de mejoramiento genético; porque con dosis bajas no es posible inducir la poliploidía, pero las dosis altas se reduce la supervivencia de

las plantas y da como resultado toxicidad y la pérdida del material tratado es uno de los obstáculos de los fitomejoradores (Shariatpanahi *et al.*, 2021).

**Cuadro 4.** Efecto de la colchicina y el tiempo de exposición para el desarrollo morfológico de los bulbos de *Z. fosteri*.

Tiempo de exposición (h)	Supervivencia % (n= 25)	Número de hojas (Promedio)	Plantas con bulbillos % (n= 25)	Número de bulbillos por planta	Número total de bulbillos
0	100 (25)	4.1	52 (13)	1.7	23
6	56 (14)	6.7	28 (7)	5.1	36
12	56 (14)	10.3	24 (6)	4.8	29
18	52 (13)	4	24 (6)	2.6	16
24	84 (20)	4.7	60 (15)	1.9	29

## 2.4 CONCLUSIÓN

Se determinó que la inducción *in vitro* por exposición recurrente a 0.05 % de colchicina durante 5 meses en plantas de *Z. fosteri*, mostró una supervivencia del 71 %. En el cultivo *in vivo*, al exponer los bulbos 24 h en colchicina sobrevivieron 20 plantas en comparación con el tiempo más bajo de exposición 6 h, en el que solo sobrevivieron 14 plantas. En los bulbos expuestos por 12 h, las hojas fueron 34 % más largas y con mayor número de hojas en promedio 10.30; Sin embargo, estos rasgos fenológicos que se presentaron deben de ser estables en el próximo ciclo de crecimiento vegetativo de los bulbos y estar presentes en los bulbillos obtenidos. En ambos experimentos aun faltan hacer pruebas citológicas para comprobar si se indujo duplicación de cromosomas.



## 2.5 LITERATURA CITADA

- Ade, R. and M. K. Rai. 2010. **Colchicine, current advances and future prospects.** Nusantara Bioscience, 2(2): 90–96. doi: <https://doi.org/10.13057/nusbiosci/n020207>
- Abdulbaqi, I. M., Y. Darwis., R. A. Assi and N. A. K. Khan. 2018. **Transethosomal gels as carriers for the transdermal delivery of colchicine: statistical optimization, characterization, and *ex vivo* evaluation.** Drug design, development and therapy, 795-813. <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.2147/DDDT.S158018?needAccess=true&role=button>
- Balodé, A. 2008. **Aplicación de colchicina y orizalina en la poliploidización de *Lilium* L.** Agronomías Vestis , (11), 22-28. <http://llufb.llu.lv/enindex.htm>
- Cabahug, R. A. M., H. T. T. M. Khanh., K. B. Lim and Y. J. Hwang. 2021. **Phenotype and ploidy evaluation of colchicine-induced *Echeveria* ‘Peerless’.** Toxicology and Environmental Health Sciences, 13:17-24. doi: <https://doi.org/10.1007/s13530-020-00069-z>
- Cavalcanti, G. 2011. **Indução de poliploidia *in vitro* com aplicação de *Heliconia bihai*.** Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Federal de Pernambuco, Brasil.
- CBI Market intelligence. 2016. **CBI Trade statistics: cut flowers and foliage.** pp.1-9
- Centeno-Betanzos, L.Y., R. Reyes-Chilpa., N. B. Pigni., C. K. Jankowski., L. Torras-Claveria y J. Bastida. 2021. **Plantas del 'Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis' de México, 1552. *Zephyranthes fosteri* (Amaryllidaceae) Alcaloides.** Química y Biodiversidad , 18 (3): e2000834. doi: <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000834>
- Chen, J., Liu, T., X. Dong y Y. Hu. 2009. **Desarrollo reciente y análisis SAR de inhibidores del sitio de unión de colchicina.** Mini revisiones en química médica , 9 (10), 1174-1190. doi: <https://doi.org/10.2174/138955709789055234>
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 1995. **Edafología. Escalas 1:250,000 y 1:1,000,000.** México. Archivo vectorial shapefile. México, D.F., México.
- Datta, S. K. 2020. **Induced mutations: technological advancement for development of new ornamental varieties.** The Nucleus, 63(2):119-129. doi: <https://doi.org/10.1007/s13237-020-00310-7>
- Eng, W. H. and W. S. Ho. 2019. **Polyplodization using colchicine in horticultural plants: a review.** Scientia horticulturae, 246: 604-617. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.010>

- Farinaci, J. S. 2001. **Variabilidad genética en algunas especies de *Bulbophyllum Thouars* (Orchidaceae) de campos rupestres.** Universidade Estadual de Campinas.
- Feng, Y., L. Xu., P. Yang., H. Xu., Y. Cao., Y. Tang y J. Ming. 2017. **Producción e identificación de germoplasma tetraploide de *Lilium davidii* var. unicolor Salisb a través de la duplicación de cromosomas.** HortScience, 52 (7), 946-951. doi: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI12004-17>
- Gómez-Montiel O., E. Villavicencio-Gutiérrez., M. A. Serrato-Cruz., J. M. Mejía-Muñoz., M. G. Treviño-de Castro., H. L. Martínez- González., M. Rodríguez-Olvera., L. Granada-Carreto., M. Flores-Cruz., J. Reyes-Santiago., M. Á. Islas-Luna., E. Salomé-Castañeda., R. A. Menchaca-García., C. M. Espadas-Manrique., L. Hernández-Sandoval., L. M. Vázquez-García., M. T. B. Colinas-León., F. Martínez-Martínez., O. Vargas-Ponce y E. Ríos-Santos. 2017. **Conservación y aprovechamiento sostenible de especies ornamentales nativas de México.** Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas y Universidad Autónoma Chapingo. México. pp.152. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/172778/Conservaci\\_n\\_y\\_aprovechamiento\\_sostenible\\_de\\_especies\\_ornamentales\\_de\\_M\\_xico.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/172778/Conservaci_n_y_aprovechamiento_sostenible_de_especies_ornamentales_de_M_xico.pdf)
- Gu, Z., L. M. Steinmetz., X. Gu., C. Scharfe., R. W. Davis and W. H. Li. 2003. **Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations.** Nature, 421(6918), 63-66. doi: <https://doi.org/10.1038/nature01198>
- Hannweg, K., G. Visser., K. Jager and I. Bertling. 2016. **In vitro induced polyploidy and its effect on horticultural characteristics, essential oil composition and bioactivity of *Tetradenia riparia*.** South African Journal of Botany, 106, 186-191. doi: 10.1016/j.sajb.2016.07.013
- 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. <http://www.pubhort.org/.../index.htm>
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2016. **Uso del suelo y vegetación.** Escala 1:250 000. Serie VI (capa unión) Archivo vectorial Shapefile. México D.F., México.
- Jara, G., P. Seemann., M. Muñoz., R. Riegel., F. Schiappacasse., P. Peñailillo y V. Vico. 2006. **Respuesta in vitro de microbulbillos de *Rhodophiala montana* sometidos a inducción**

- de poliploidía en presencia de colchicina.** *Agro sur*, 34(1-2), 67-68. doi: <https://doi.org/10.4206/agrosur.2006.v34n1-2-39>
- Juárez C. V. 2021. **Uso de Plant preservative mexure en el establecimiento *in vitro* de *Sprekelia formosissima* (L.) Herb. Amaryllidaceae.** Tesis de licenciatura en biotecnología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michiacán.
- Khalili, S., M. Niazian., M. Arab and M. Norouzi. 2020. ***In vitro* chromosome doubling of African daisy, *Gerbera jamesonii* bolus cv.** *Mini Red. Nucleus* 63, 59–65. doi: <https://doi.org/10.1007/s13237-019-00282-3>
- 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. doi: <https://doi.org/10.3390/plants8070194>
- Manzoor, A., T. Ahmad., M. A. Bashir., M. M. Q. Baig., A. A. Quresh., M. K. N. Shah and I. A. Hafiz. 2018. **Induction and identification of colchicine induced polyploidy in *Gladiolus grandiflorus* ‘White Prosperity’.** *Folia Horticulturae*, 30:307–319. <https://doi.org/10.2478/fhort-2018-0026>
- Marasek-Ciolakowska, A., D. Sochacki and P. Marciniak. 2021. **Breeding aspects of selected ornamental bulbous crops.** *Agronomy*, 11(9): 1709. doi: <https://doi.org/10.3390/agronomy11091709>
- Molero Paredes, T., M. V. Narváez y E.V. Fernández. 2018. **Inducción de poliploidía con clochicina en vitroplantas de *Aloe vera* (L.).** *Revista Colombiana de Biotecnología.* doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.73762
- Nava, J. J. C., J. M. L. Morales., S. G. Morales., A. G. Mora., N. P. Rout., J. M. R. Dominguez y G. R. Enríquez. 2021. **Tópicos de Herramientas Biotecnológicas para el Desarrollo Agrícola.**
- Nooden, L. D. 1971. **Physiology and developmental effects of colchicine.** *Plant Cell Physiol*, 12:759–770.
- SAGARPA, Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2018. **Floricultura, cultivando belleza y ganancias.** [https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/floricultura-cultivando-belleza-y-ganancias?idiom=es.](https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/floricultura-cultivando-belleza-y-ganancias?idiom=es)

- Statistical OnDemand for Academics. **Resources/Sas Products and Solutions**. 2020. <https://welcome.oda.sas.com/unsupportedBrowserWarning>.
- Sadat, S., M. Norouzi., G. Karimzadeh., K. Shirkoob 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. 130, 543-551. doi: 10.1007/s11240-017-1245-0
- 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 Botani, 45(3): 1255-1258. [http://pakbs.org/pjbot/PDFs/45\(4\)/19.pdf](http://pakbs.org/pjbot/PDFs/45(4)/19.pdf)
- 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 (1), 212-222. doi: <https://doi.org/10.17584/rcch.2018v12i1.7059>
- Shariatpanahi, M. E., M. Niazian., B. Ahmadi. 2021. **Methods for Chromosome Doubling**. In: Segui-Simarro, J.M. (eds) Doubled Haploid Technology. Methods in Molecular Biology, vol 2287. Humana, New York, NY. doi: [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1315-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1315-3_5)
- Shapiro, S. and M. B. Wilks. 1965. **An analysis of variance test for normality**. Biometrika, 52: 591–611.
- Stafford, S. J., J. Schwimer., C. T. Anthony., J. L. Thomson., Y. Z. Wang and E. A. Woltering. 2005. **Colchicine and 2-methoxyestradiol inhibit human angiogenesis**. Journal of Surgical Research, 125(1), 104-108. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jss.2004.11.017>
- Shu, Q. Y., B. P. Forster., H. Nakagawa and H. Nakagawa. 2012. **Plant mutation breeding and biotechnology, CABI. Plant Breeding and Genetics Section**. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria. ISBN, 978-2.c
- Tu Parácuaro. 2022. <https://paracuaro.gob.mx/tumunicipio/medio-fisico>. 18 de Noviembre del 2022.
- Urwin, N. A. R. 2014. **Generation and characterisation of colchicine induced polyploid *Lavandula x inter-media***. Euphytica, 197(3), 331-339. doi: 10.1007/s10681-014-1069-5

- Vichiato, M. R. M., M. V. Pasqual., D. M de Castro y L. F Dutra. 2007. **Inducción e identificación de tetraploidia en *Dendrobium nobile* Lindl (Orchidaceae)**. Revista Ciencia Agronómica , 38 (4), 385.
- Yang, J., J. Wang., Z. Liu., T. Xiong., J. Lan., Q. Han and X. Kang. 2018. **Megaspore chromosome doubling in *Eucalyptus urophylla* ST Blake induced by colchicine treatment to produce triploids**. Forests, 9(11), 728. doi: <https://doi.org/10.3390/f9110728>

### CAPITULO III

#### CONCLUSIÓN GENERAL

De acuerdo a las hipótesis y objetivos planteados se concluye lo siguiente:

El tiempo de emergencia de los brotes se redujo a 4 dde en bulbos enteros o con corte longitudinal tratados con TDZ 0.57 y 1.14  $\mu\text{M}$ , para que los bulbos despierten de la latencia y comiencen la etapa de desarrollo vegetativo.

Se recomienda utilizar ambas concentraciones de TDZ por que favorecen un 50 % el desarrollo vegetativo en todos los tipos de corte.

Para *Z. fosteri* se determinó que su propagación vegetativa se debe relizar apartir de bulbos enteros con dos cortes longitudinales sin TDZ, ya que se obtuvieron 54 bulbillos en total.

Se establece que se debe de utilizar bulbos de calibre 19 a 26 mm, porque favorece el desarrollo de las plantas un 50 % y generamos mayor número de bulbillos, 3.72 en promedio.

El método de inducción de poliploidia *in vitro* no letal para *Z. fosteri*, es la exposición recurrente de colchicina a 0.05 % p/v, con tiempo de exposicion de 5 meses.

En los bulbos *in vivo*, se mostraron rasgos fenológicos diferentes cuando los bulbos se expusieron a la colchicina durante 12 horas. Sin embargo, aun falta comprobar si se indujo la poliploidia y si estos rasgos son estables.

## CAPITULO IV.

### LITERATURA CITADA COMPLEMENTARIA

- Balode, A. 2008. **Applying colchicine and oryzaline in *Lilium L* polyploidization.** *Agronomijas vestis* (11): 22–28.
- Barbier, F., T. Péron, M. Lecerf, M. D Perez-Garcia, Q. Barrière, J. Rolčík, S. Boutet-Mercey, S. Citerne, R. Lemoine, B. Porcheron, H. Roman, N. Leduc, J. Le Gourrierec, J. Bertheloot and S. Sakr. 2015. **Sucrose is an early modulator of the key hormonal mechanisms controlling bud outgrowth in *Rosa hybrida*.** *Journal of experimental botany*, 66 (9): 2569-2582. doi:10.1093/jxb/erv047.
- Bihmidine, S., C. Hunter, C. Johns, K. Koch and D. Braun. 2013. **Regulation of assimilate import into sink organs: update on molecular drivers of sink strength.** *Frontiers in Plant Science* 4 (177). doi:10.3389/fpls.2013.00177.
- Botelho, F. B. S., C. S Rodrigues and A. T Bruzi. 2015. **Ornamental plant breeding.** *Ornamental Horticulture* 2(1): 9–16.
- Corza M. A. 2019. **Morfogenesis *in vitro* en explantes de *Lisianthus (Esustoma gradiflorum)* tratados con colchicina y orizalina.** Tesis de licenciatura. Fac. de Agrobiología “presidente juarez”. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Uruapan Michoacán. 80 pp.
- Costa, M. A. P., B. M. J. Mendez and F. A. A. Mourão-Filho. 2003. **Somatic hybridization for improvement of citrus rootstock: production of five combinations with potential for improvement disease resistance.** *Australian Journal Experimental Agriculture* 43 (9): 11.
- Centeno-Betanzos, L.Y., R. Reyes-Chilpa., N. B. Pigni., C. K. Jankowski., L. Torras-Claveria y J. Bastida. 2021. **Plantas del 'Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis' de México, 1552. *Zephyranthes fosteri* (Amaryllidaceae) Alcaloides.** *Química y Biodiversidad* , 18 (3): e2000834. doi: <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000834>
- Dhooghe, E., S. Denis, T. Eeckhaut, D. Reheul and M. C. Van. 2009. ***In vitro* induction of tetraploids in ornamental *Ranunculus*.** *Euphytica* 168: 33-40.

- Dibyendu, T. 2010. **Cytogenetic characterization of induced autotetraploids in grass pea (*Lathyrus sativus* L.)**. *Caryologia* 63: 62–72.
- Du, X., Y. Sun, S. Yuan, Q. Li and Z. Gong. 2011. **Identification of colchicines induced polyploid plants in two species of *Impatiens balsamina***. *Acta Agriculturae* 20: 56–59.
- Ebrahimzadeh, H., H. Soltanloo, M. E. Shariatpanahi, A. Eskandari and S. S Ramezanzpour. 2018. **Improved chromosome doubling of parthenogenetic haploid plants of cucumber (*Cucumis sativus* L.) using colchicine, trifluralin, and oryzalin**. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 135 (3): 407-417.
- El-Nashar, Y.I. and M. H Ammar. 2015. **Mutagenic influences of colchicine on phenological and molecular diversity of *Calendula officinalis* L.** *Genetics and Molecular research* 15: 1–15.
- González, M. C., J. L. Fuentes., S. Cortés., y O. Sam. 2005. " **Delia**", **nueva variedad de violeta africana (*Saintpaulia* sp.) obtenida a partir del empleo de técnicas biotecnológicas y nucleares**. *Cultivos Tropicales* 26(1): 67-68.
- Hadlaczky, G., G. Bistrany, T. Parznovszky and D. Dudits. 1983. **Mass isolation of plant chromosomes and nuclei**. *Planta* 157 (3): 278-285.
- Hartmann, T. H., E. D. Kester and F. T. Jr. Davis. 1990. **Plant propagation principles and practices**. Prentice-Hall. New Jersey. 760 pp.
- Hernández-Muñoz, S., M. E. Pedraza-Santos, P. A. López, E. D. L. Cruz-Torres, S. P. Fernández-Pavía, A. Martínez-Palacios y M. Martínez-Trujillo. 2017. **Determinación de la DL50 Y GR 50 con rayos gamma (60Co) en protocormos de *Laelia autumnalis* in vitro**. *Agrociencia* 51(5): 507-524.
- Honfi, A. I. y J. R. Daviña. 2015. **Flora de Interés Forrajero y Ornamental de Campo San Juan. Reserva Natural Campo San Juan**. pp. 53-68.
- Hosseini, H., M. Chehrizi, M. M. Sorestani and D. Ahmadi. 2013. **Polyploidy and comparison of diploid and autotetraploid seedling of Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* cv. Alba)**. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences* 4(2) 402–406.
- Jadrná, P., O. Plavcová and F. Kobza. 2010. **Morphological changes in colchicine treated *Pelargonium x Hortorum* LH bailey greenhouse plants**. *Horticultural Science* 37(1): 27–33.



- Kannan, M., J. Vanitha, S. Jiang and S. Ramachandran. 2013. **Impact of colchicine treatment on Sorghum bicolor BT × 623**. *Molecular Plant Breeding* 4: 128–135.
- Kazi N. A. 2015. **Mutation breeding in flower crops**. *Asian Research Journal of Agriculture* 3: 228-230.
- Kumar, M.K. and M.U Rani. 2013. **Colchiploidy in fruit breeding**. *Horticulture* 2(6): 325–326.
- Lin, Y. S., B. E. Medlyn, R. A. Duursma, I. C. Prentice, H. Wang, S. Baig and L. Wingate. 2015. **Optimal stomatal behaviour around the world**. *Nature Climate Change* 5(5): 459-464.
- Moghbel, N., M. K. Borujeni and F. Bernard. 2015. **Colchicine effect on the DNA content and stomata size of Glycyrrhiza glabra var. Glandulifera and Carthamus tinctorius L. cultured in vitro**. *Journal of Genetic Engineerig and Biotechnology* 13(1): 1–6.
- Moreno-Pachón N. 2017. **Mechanisms of vegetative propagation in bulbs: a molecular approach**. Doi: 10.18174/423177
- Müller, D., P. G. Giménez, A. Travacio y M. Bueno. 2017. **Establecimiento in vitro de Zephyranthes spp**. *Bioteconología Vegetal* 17(1): 19-24.
- Nava, J. J. C., J. M. L. Morales., S. G. Morales., A. G. Mora., N. P. Rout., J. M. R. Dominguez y G. R. Enríquez. 2021. **Tópicos de Herramientas Biotecnológicas para el Desarrollo Agrícola**.
- Niu, L., Y. B Tao, M. S. Chen, Q. Fu, Y. Dong, H. He and Z. F. Xu. 2016. **Identification and characterization of tetraploid and octoploid Jatropha curcas induced by colchicine**. *Caryologia* 69: 58–66.
- Padilla-Sánchez, A., M. A. Rodríguez, I. Alia-Tejacal, O. G. Villegas-Torres y D. Guillén-Sánchez. 2016. **Propagación vegetativa y sexual de mayito (Zephyranthes fosteri Traub y Z. lindleyana)**. *Acta Agrícola y Pecuaria* 2(2): 34-42.
- Panteris, E., P. Apostolakos and B. Galatis. 1993. **Microtubules and morphogenesis in ordinary epidermal cells of Vigna sinensis leaves**. *Protoplasma* 174(3-4): 91-100.
- Pirkoohi, M.H., M. Keyvanloo and M. Hassanpur. 2011. **Colchicine induced polyploidy in mint by seed treatment**. *International International Research Journal of Applied and Basic Sciences* 3. 102–104.
- Ranney, T.G. 2006. **Polyploidy: From evolution to new plant development**. In *Combined Proceedings international plant propagators society* 56: 137–142.
- Sadhukhan R., A. Ganguly., P. K Singh and H. K Sarkar. 2014. **Study of induced polyploidy in African marigold Tagetes erecta L**. *Environ Ecol* 32:1219–1222.

- Skirvin R. M., K. D. McPheeters., and M. Norton. 1994. **Sources and frequency of somaclonal variation.** *HortScience* 29(11): 1232-1237.
- Slamet, A., S. H. Andarias, A. H. Bahrin and K. Mantja. 2018. **Induction of *Lili Hujan* polyploid (*Zephyranthes rosea* L.) with ethanolic extract of Tapak Dara leaf (*Catharanthus roseus* (L.) G. don.) to increase its economic value.** *Earth and Environment Science* 235(1): 12102.
- Suzuki, K., Y. Takatsu, T. Gonai, M. Kasumi. 2005. **Plant regeneration and chromosome doubling of wild *Gladiolus* species.** *Acta Horti* 673, 175–181.
- Tapia-Campos, E., Rodriguez-Dominguez, J. M., Revuelta-Arreola, M. M., J. M. Van Tuyl., and Barba-Gonzalez, R. 2012. **Mexican geophytes II. The genera *Hymenocallis*, *Sprekelia* and *Zephyranthes*.** *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 6(1), 129-139.
- Wu, Y., F. Yang, X. Zhao and W. D. Yang. 2012. **Cytogenetic characterization of induced tetraploids in medicinal plant (*Platycodon grandiflorus*).** *Caryologia* 65:182–186.
- Ye, Y. M., J. Tong, X. P. Shi, W. Yuan, G. R. Li. 2010. **Morphological and cytological studies of diploid and colchicine-induced tetraploid lines of crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.).** *Scientia Horticulturae* 124(1): 95–101.
- Zhu, Y., K. S. Liu and J. C. Yiu. 2004. **Effect of cutting method on bulb production of *Hippeastrum hybridum* in Taiwan.** In IX International Symposium on Flower Bulbs 673. pp. 531-535.