

Efecto citogenético de la Colchicina sobre yemas vegetativas de *Physalis peruviana* L.

DIANA E. DÍAZ S.*
DIANA C. GONZÁLEZ C.*
LEYDI Y. RACHE C.**
JOSÉ C. PACHECO M.***

* Bióloga.

** Bióloga, Joven Investigadora-COLCIENCIAS.

*** Dr. Biología. Profesor Titular Escuela de Ciencias Biológicas, director Laboratorio BIOPLASMA-UPTC. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. e-mail: jocpach@hotmail.com

Resumen

Yemas axilares de *P. peruviana* procedentes de microtallos multiplicados *in vitro* se trataron con 5, 8, 10, 15 y 20 g·L⁻¹ de colchicina durante 48 horas; posteriormente se cultivaron en medio MP (MS suplementado con 0.2 mg·L⁻¹ de BA y 0.05 mg·L⁻¹ de AIB). Las plántulas regeneradas de las yemas tratadas se subcultivaron cada 30 días en el mismo medio. Después de 5 subcultivos, (5 ciclos de multiplicación) de las plantas regeneradas en cada uno de los tratamientos, se tomaron ápices radicales para verificar la presencia de alteraciones cromosómicas numéricas. Con respecto al ciclo celular, en plántulas regenerantes mantenidas con fotoperíodo de 16 horas el mayor porcentaje de células en división se cuantificó entre las 13:00 y las 14:00, mientras que en aquellas mantenidas con luz continua, el mayor porcentaje se cuantificó entre las 15:00 y las 16:00. Además, se estableció que la mitosis ocupa el 26% del ciclo en células de plántulas mantenidas con fotoperíodo de 16 horas y luz continua. Con fotoperíodo de 16 horas, la profase ocupa un 25%, metafase 0.4%, anafase 0.03% y telofase 0.2%; con luz continua la profase ocupa un 25%, metafase 0.5%, anafase 0.2% y telofase 0.5%. El procedimiento utilizado para el procesamiento de los ápices radicales permitió obtener células libres con cromosomas metafásicos adecuados para su respectivo conteo; determinándose que la aplicación de diferentes concentraciones de colchicina induce la formación de células con una carga cromosómica mayor a la normal. Además, se constató que al aumentar la concentración de colchicina también se produjo un aumento del número de cromosomas de las células tratadas.

Abstract

P. peruviana axillary buds from shoots multiplied *in vitro* were treated with colchicine, 5, 8, 10, 15 and 20 g·L⁻¹, during 48 hours and then, they were cultured in MP medium (MS supplemented with BA 0.2 mg·L⁻¹ and AIB 0.05 mg·L⁻¹). Regenerated plantlets from treated buds were subcultured, 5-times every 30 days, in the same medium. To verify the presence of numerical chromosomal alterations, radical tips were taken of regenerated plantlets from each colchicine treatment. Regarding to cell cycle in regenerated plantlets maintained under 16-hour-photoperiod the highest percentages of cell division were quantified between 13:00 and 14:00, while in those maintained under continuous light the highest percentages were quantified between 15:00 and 16:00. In addition, it was established that mitosis occupies 26% of the cell cycle in plantlets maintained under 16-hours-photoperiod and continuous light. Under 16-hours-photoperiod prophase occupies 25%, metaphase 0.4%, anaphase 0.03% and telophase 0.2%; under continuous light prophase occupies 25%, metaphase 0.5%, anaphase 0.2% and telophase 0.5%. The procedure to radical tips processing produced cells with adequate metaphasic chromosomes for counting; it was evident that the application of different colchicine concentrations induce formation of cells with chromosomal number greater than normal number. Moreover, it was observed that increasing the colchicine concentration also increased the chromosome number of treated cells.

Palabras Clave: Uchuva, cromosomas, cultivo *in vitro*, ciclo celular.

Key words: Uchuva, Chromosome, *In vitro* culture, Cell cycle.

Introducción

La uchuva se adapta a una gran variedad de condiciones agroecológicas; en Colombia crece entre 1800 y 2800 msnm y desde hace algunos años se viene explotando comercialmente como producto de exportación. Está clasificada como una especie muy tolerante debido a su adaptabilidad a una gran variedad de climas y suelos (García, 2003) y aunque se puede propagar por vía sexual o asexual, la producción de materiales vegetativos para el establecimiento de plantaciones comerciales se realiza casi exclusivamente a partir de semilla sexual. Para mantener y/o aumentar su rentabilidad se requiere disponer de una fuente de variabilidad genética amplia, utilizable en programas de selección y multiplicación de individuos que muestren caracteres fenotípicos mejorados relacionados con hábito de crecimiento, producción, calidad de frutos y resistencia a condiciones de estrés, entre otros.

Una alternativa para ampliar la variabilidad genética y producir individuos con características morfológicas modificadas, es la inducción de alteraciones cromosómicas numéricas, aplicando a los tejidos sustancias mitodepresoras como la colchicina. El éxito en el desarrollo de este proceso tendría una amplia repercusión sobre el cultivo de la uchuva en Colombia.

La inducción de cambios cromosómicos numéricos utilizando colchicina ha sido poco estudiada en cultivo *in vitro* de uchuva; algunas investigaciones realizadas están relacionadas con estudios citogenéticos en uchuva sometida a concentraciones de colchicina para originar

colchiploides (Wenzel, 1973) y caracterización cariotípica de cinco ecotipos de uchuva (Rodríguez, 2004).

En este trabajo se evaluó el efecto de la aplicación de colchicina a yemas axilares de segmentos nodales sobre la inducción de alteraciones cromosómicas numéricas.

Materiales y métodos

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, BIOPLASMA, de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC)-Tunja.

Recolección y caracterización del material vegetal. Los explantes utilizados para el desarrollo de los ensayos fueron segmentos caulinares con yemas axilares, obtenidos de microtallos mantenidos en cadenas proliferativas establecidas *in vitro*, a partir de rebrotes de plantas seleccionadas de huertos comerciales del municipio de Arcabuco-Boyacá.

Establecimiento *in vitro* de cultivos. El medio utilizado para cultivo fue MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$): glicina 2.0, tiamina 0.1, piridoxina 0.5, ácido nicotínico 0.5, mio-inositol 100, sacarosa 30.000, agar (oxoid) 6500, BA (6-bencilaminopurina) 0.2 y AIB (Ácido-3-indol butírico) 0.05 (medio para *Physalis*, MP). El pH de todos los medios fue ajustado a 5.6 con NaOH ó HCl 1N y se esterilizaron en autoclave a una presión de 1 Kg/cm² y 121 °C durante 20 minutos. Los cultivos se incubaron en cuarto de crecimiento a 23±1 °C con fotoperíodo de 16 horas ó luz continua (70-80

$\text{imol.m}^2/\text{s}$), suministrada por tubos fluorescentes Silvania de 75W.

Asepsia superficial de rebrotes procedentes de plantas de campo. Los rebrotes se escindieron en segmentos nodales, se enjuagaron con agua destilada más Tween 20 (Merck), (0,25 ml/100 ml) durante 5 minutos, con agitación constante y luego se sumergieron en etanol al 70% durante 15 segundos; posteriormente, se trataron con hipoclorito de sodio (NaClO 5.25%, p/v) al 20% (v/v) durante 15 minutos y, finalmente, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

Cultivo de yemas y mantenimiento de cadenas proliferativas. De los segmentos nodales asépticos se escindieron yemas axilares y se cultivaron en MP durante 45 días. De los microtallos regenerados, a partir de las yemas apicales y axilares, se obtuvieron nuevos segmentos nodales, los cuales se utilizaron para establecimiento de cadenas proliferativas.

Tratamiento con colchicina. Se utilizaron segmentos nodales con yemas axilares, tomados de microtallos mantenidos en cadenas proliferativas para estimular la actividad de las yemas axilares; los segmentos nodales se cultivaron en MP durante 8 días. Posteriormente, los segmentos nodales fueron tratados mediante inmersión, con soluciones acuosas de colchicina (previamente esterilizadas por filtración) de 5, 8, 10, 15 y 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, dosificadas en viales de 10 ml, en los cuales los segmentos nodales fueron tratados individualmente durante 48 horas.

Regeneración de plántulas y obtención de raíces. Después de las 48 horas de tratamiento, para eliminar los residuos de colchicina, los segmentos nodales se enjuagaron 3 veces consecutivas con agua destilada estéril; luego se cultivaron en MP. Para disponer continuamente de raíces, las porciones apicales de las plántulas regeneradas se subcultivaron cada 30 días en el mismo medio.

Endurecimiento de plántulas. Las plántulas regeneradas en cada uno de los ensayos realizados, se extrajeron de los recipientes de cultivo y las raíces se enjuagaron con abundante agua corriente, para eliminar los restos de agar. Estas plántulas se colectaron en un recipiente con agua y en invernadero; fueron transferidas a vasos plásticos de 200 ml con tierra, arena y cascarilla en proporciones 2:1:1 respectivamente, previamente humedecido. Finalmente se ubicaron en un módulo cerrado y con riego por nebulización.

En plántulas regeneradas y mantenidas *in vitro*, durante 5 meses, se realizó un seguimiento de caracteres macromorfológicos y tasa de crecimiento; en las plántulas transferidas a invernadero se registró la viabilidad.

Determinación de la hora, índice mitótico y del índice de fases del ciclo celular. El protocolo para el estudio citogenético se basó en el trabajo realizado por Rodríguez (2004) en *P. peruviana* con algunas modificaciones.

Hora mitótica. Para la colecta de raíces, de plántulas mantenidas en cuarto de crecimiento con fotoperiodo de 16 horas y luz continua, se colectaron raíces entre las 8:00 y las 18:00 horas, con intervalos de 2 horas; de cada plántula se tomaron 2 raíces primarias en crecimiento activo, de 2–5 cm de longitud y de ellos se escindieron los ápices radicales.

Pretratamiento. Los ápices escindidos, se enjuagaron con agua destilada y, luego, se transfirieron a una solución de colchicina al 0.5% durante 5 horas, a 4° C.

Fijación. Despues del pretratamiento los ápices se enjuagaron con agua destilada y se transfirieron inmediatamente a solución carnoy (etanol 96%: ácido acético glacial, 3:1); en esta solución los ápices se mantuvieron a 4° C durante 24 horas (Sharma y Sharma, 1980). Las raíces que no se utilizaron inmediatamente, después de la fijación se conservaron en etanol al 70% a 4 °C (Fukui y Nakayama, 1996).

Hidrólisis. Para obtener células en un sólo plano y facilitar la identificación de las fases del ciclo celular, los ápices se trataron con las soluciones ácidas, enzimáticas y ácido-enzimáticas registradas en la tabla 1. Después de realizada la hidrólisis enzimática, para interrumpir el proceso hidrolítico los ápices se enjuagaron con agua destilada. La hidrólisis enzimática se realizó en tubos de ensayo oscuros

para evitar la degradación de las enzimas por efecto de la luz.

Para la selección del agente hidrolítico más efectivo y la mejor concentración del mismo se tuvo en cuenta la severidad de la degradación de láminas medias y paredes celulares, dispersión de cromosomas y obtención de células libres.

Tabla 1. Agentes hidrolíticos usados para degradación de pared celular

| Hidrólisis | Agente Hidrolítico | CN (% p/v) | T (°C) | Tiempo de exposición (min) |
|---|--------------------|---|----------|----------------------------|
| Ácida (Moscone, 1990) | HCl | 1 N | 60 | 10, 15, 20, 25. |
| Enzimática (Fukui y Nakayama, 1996) | C+P | 1.5 – 4.0; 0.5 - 1.5 | 37 | 10, 15, 20, 25, 30 |
| | C+M | 1.5 – 4.0; 0.5 - 1.5 | 37 | 10, 15, 20, 25, 30 |
| | C+P+M | 1.5 – 4.0; 0.5 - 1.5; 0.5 - 1.5 | 37 | 10, 15, 20, 25, 30 |
| Ácida – enzimática (Rodríguez, 2004) | HCl+ C+P+M | 1 N; 1.5-4.0; 0.5-1.5; 0.5-1.5 | 60 37 | 10, 15, 20 15, 20, 25 |

CN: concentración; T: Temperatura; HCl: Ácido clorhídrico; C: celulasa; P: pectinasa; M: macerozima.

Coloración. Despues de realizada la hidrólisis, se ensayó la coloración de cromosomas con los colorantes que se indican en la tabla 2.

Tabla 2. Colorantes para teñir cromosomas

| Colorante | Exposición (min.) |
|--------------------|-------------------|
| Orceína acética 2% | 10, 15, 20, 25 |
| Acetocarmín 2% | 20, 25 |
| Azul de toluidina | 10, 15, 20, 25 |

Los ápices radicales se enjuagaron en agua destilada y se colocaron sobre un portaobjeto, se les eliminó parte de la raíz dejando solamente la zona meristemática sobre la cual se adicionaron 2 gotas de colorante durante diferentes tiempos; luego, la preparación se flameo 3 veces sin permitir la ebullición del colorante.

Aplastamiento y observación. Para disgregar los tejidos y obtener células en un sólo plano, después de flameada la muestra, se colocó el cubreobjetos y con una barra de goma se propinó un golpe seco sobre los tejidos; luego, la placa se toma entre papel absorbente y utilizando los dedos pulgar e índice se presiona sin deslizar las láminas. Finalmente, con barniz para uñas se sella la placa. Para la observación y conteo de células en cada fase del ciclo celular se utilizó un microscopio Carl Zeiss, Jena Jenamedz.

Determinación del índice mitótico e índice de fases del ciclo celular. Los índices de fases parciales (IF) y el índice mitótico parcial (IM) se calcularon mediante las ecuaciones propuestas por López y Sáenz (1965). Este IM se utilizó para determinar el número de células que se encuentran en mitosis en una determinada hora del día.

$$IF = \frac{\text{número de células en cada fase}}{\text{número total de células}} \times 100$$

$$IM = IF_p + IF_m + IF_a + IF_t; p = \text{profase}; m = \text{metafase}; a = \text{anafase}; t = \text{telofase}.$$

Conteo de cromosomas metafásicos. Este procedimiento persigue facilitar la observación de células metafásicas con cromosomas dispersos en las cuales se pueda realizar conteo para determinar los cambios cromosómicos numéricos de las plántulas regeneradas de yemas, sometidas a las diferentes concentraciones de colchicina y establecer sus diferencias con el testigo. Para esto, se siguió el protocolo descrito anteriormente, con algunas modificaciones: la colecta de raíces se realizó entre las 13:00 y las 14:00 horas tomando de 2-

4 raíces primarias de plántulas tratadas con colchicina. Los ápices radicales se sometieron a la acción enzimática compuesta por celulasa 3%, pectinasa 1.5% y macerozima 1.0%, a 37 °C durante 25 minutos en baño de maría, posteriormente, se les adicionaron 2 gotas de orceina acética al 2% durante 25 minutos.

La observación de cromosomas, al microscopio se realizó con objetivo de 25x, seleccionando las placas con buena dispersión de células y de cromosomas; posteriormente, el conteo de cromosomas se realizó con el objetivo de 100x. Los registros fotográficos se tomaron utilizando un microscopio Carl Zeiss, Jena Jenamedz, con objetivo de 100x, proyectivos de 16x y 20x y película fotográfica ASA 100 y una cámara digital Kodak easy c333 5x megapíxeles.

Resultados y discusión

Recolección y caracterización del material vegetal. Los brotes con yemas apicales y axilares seleccionados en huertos comerciales fueron materiales adecuados para establecimiento de cultivos, multiplicación y mantenimiento *in vitro* de cadenas proliferativas.

Establecimiento *in vitro* de cultivos

Asepsia superficial de rebrotos. El protocolo de asepsia utilizado para la desinfección de los rebrotos, fue efectivo para eliminar los contaminantes superficiales de los explantes y facilitó el establecimiento de cultivos *in vitro*, a partir de explantes tomados de plantas de campo.

Cultivo de yemas y mantenimiento de cadenas proliferativas. Las yemas apicales y axilares de los rebrotos reaccionaron favorablemente y produjeron microtallos que se mantuvieron en cadenas proliferativas en MP con transferencia a medio fresco cada 30 días. George, (1993/96) indica que el BA es utilizado frecuentemente para la fase de multiplicación y el AIB para la fase de enraizamiento de los brotes.

Regeneración de plántulas. A pesar de las medidas de asepsia mantenidas durante los tratamientos con colchicina, se presentó contaminación de explantes, o, simplemente algunos murieron; sin embargo, de los explantes viables fue posible regenerar microtallos y con ellos establecer cadenas proliferativas. La viabilidad de los explantes tratados dependió, en gran parte, de la concentración de colchicina, como se evidenció en los tratamientos con 15 y 20 g·L⁻¹. En los demás tratamientos la mortalidad de explantes se debió, principalmente, a contaminación con bacterias y hongos.

Aspectos morfológicos cuantificados en plantas regenerantes de yemas tratadas con colchicina. Después del 5º subcultivo (5 meses de cultivo, tabla 3), al comparar las características morfológicas de las plántulas testigo con las tratadas con colchicina, no se apreciaron diferencias significativas; el desarrollo radicular generalmente fue escaso, a excepción del observado en plántulas regeneradas de las yemas tratadas con 15 y 20

g·L⁻¹. El desarrollo de hojas y tallos anormales se presentó en todas las plántulas regeneradas de yemas tratadas con colchicina y, en menor cantidad, en los testigos; sin embargo, en las tratadas con 15 y 20 g·L⁻¹ de colchicina estas características fueron más notorias. Las hojas anormales se caracterizaron por ser de forma ovalada, romboide y acorazonada deformes; algunas fusionadas y con bordes dentados. Los tallos múltiples o anormales fueron más gruesos (2.0–3.0 mm de diámetro) que los normales (0.5–1.0 mm). La longitud de tallos y desarrollo foliar en todos los tratamientos fue muy similar. Según Wenzel (1973), la inducción de alteraciones cromosómicas numéricas con colchicina en *P. peruviana* no produce una morfología degenerativa; por esta razón, no se puede asegurar que las anomalías morfológicas observadas en las plántulas regeneradas en yemas tratadas se hayan producido por acción de la colchicina; no obstante, el desarrollo de las plántulas se vio retrasado, principalmente en las procedentes de las yemas tratadas con las concentraciones de colchicina más elevadas, 15 y 20 g·L⁻¹.

Tabla 3. Aspectos morfológicos cuantificados en plántulas regenerantes de yemas tratadas con colchicina, después del 5º subcultivo (150 días de cultivo *in vitro*).

| Tto. (g·L ⁻¹) | D.R. (%) | TALLO (%) | | HOJAS (%) | | L.T. (Xcm) | HOJAS (X) |
|------------------------------|-------------|-----------|---------|-----------|---------|---------------|--------------|
| | | Normal | Anormal | Normal | Anormal | | |
| 5 | 30 | 80 | 20 | 48 | 52 | 4,6 | 4,2 |
| 8 | 40 | 80 | 20 | 59 | 40 | 6,45 | 3,7 |
| 10 | 30 | 80 | 20 | 49 | 51 | 6,35 | 4,1 |
| 15 | 80 | 80 | 20 | 25 | 75 | 9,75 | 7,1 |
| 20 | 100 | 90 | 10 | 13 | 87 | 6,21 | 7,9 |
| Testigo | 40 | 100 | 0 | 80 | 20 | 5,25 | 5 |

D. R.= Desarrollo rizogénico; L.T.= Longitud del tallo

Endurecimiento de plántulas. En invernadero, la viabilidad de las plántulas procedentes de las yemas tratadas con las diferentes concentraciones de colchicina fue variable ($\bar{X}=55.6\%$); algunas de ellas murieron debido al escaso desarrollo caulinar, radicular y foliar.

Determinación de la hora e índice mitótico y del índice de fases del ciclo celular. Se determinó que, para el análisis citogenético las raíces preferiblemente deben ser jóvenes y de máximo 5 cm de longitud porque presentan mayor número de células en división y facilitan

los procedimientos para observación de cromosomas.

Hidrólisis

- Hidrólisis ácida. En los tejidos tratados con HCl durante 10 y 15 minutos no se observó ablandamiento de tejido ni dispersión celular; cuando el HCl fue aplicado durante periodos de 20 y 25 minutos los tejidos se degradaron sin permitir la observación de células; esta observación no concuerda con lo reportado por Coral y Gutiérrez (1987) en sus prácticas con *Brugmansia sanguinea*, ni con lo reportado por Rodríguez (2004), en estudios con *P. peruviana*, quienes indican que la hidrólisis ácida es suficiente para la obtención de células en un solo plano y cromosomas libres.
- Hidrólisis enzimática. La mezcla enzimática con las enzimas a las concentraciones más bajas no degradó las paredes celulares ni las láminas medias, mientras que las concentraciones más altas degradaron completamente los tejidos. La aplicación de la mezcla enzimática durante periodos de 10 y 15 minutos no fue efectiva y cuando se aplicó durante 30 minutos la hidrólisis provocó degradación de los tejidos.

El tratamiento de hidrólisis que mostró resultados más adecuados fue la combinación de celulasa al 3%, pectinasa al 1.5% y macerozima al 1.0%, a 37 °C, durante 25 minutos; la celulasa, actuando directamente sobre la pared celular degradó la celulasa, su principal componente; la pectinasa degradando la lámina media del tejido actuó sobre las sales pécticas. La macerozima que es una combinación de celulasa y pectinasa, contribuyó a la degradación de paredes y láminas medias de los tejidos. Con la aplicación de estas enzimas se produce dispersión de células en una sola capa, ruptura de las láminas medias y paredes celulares, así como dispersión de cromosomas metafásicos.

- Ácido-enzimática. En tejidos de *P. peruviana*, la acción de este tipo de hidrólisis no produjo los resultados esperados, contrario a los reportados por Rodríguez (2004) y Wenzel (1973) en sus estudios con *P. peruviana* y Rondón (2006) en trabajos realizados con *E. muiska*. Por tanto, es evidente que los materiales vegetales se comportan de diferente manera aún siendo de la misma especie, siendo necesario tener en cuenta factores fisiológicos y morfológicos como la edad y la procedencia de los tejidos.

Coloración. Cuando se utilizó acetocarmín los tejidos no colorearon adecuadamente; el azul de toluidina coloreó bien los cromosomas pero también coloreó el citoplasma, lo cual dificultó la diferenciación de cromosomas; por el contrario, la orceína acética al 2% coloreó bien los cromosomas y débilmente el citoplasma, provocando un buen contraste de los cromosomas. Cuando solo se realizó hidrólisis ácida, 10 minutos en orceína fueron suficientes, pero cuando se realizó hidrólisis doble ó solo la enzimática fue necesario dejar actuar el colorante durante al menos 25 minutos. Darlington y la Cour (1969) confirman la eficacia de este reactivo en la coloración de tejidos vegetales.

Hora mitótica. Los conteos de células realizados entre las 8:00 y las 18:00 horas indicaron que la actividad mitótica en este intervalo de tiempo, para las plántulas mantenidas en fotoperiodo de 16 horas, tiene un pico máximo a las 14:00; después de esta hora se evidenció una disminución en el porcentaje de células en división (figura 1 A). Para las plántulas mantenidas en luz continua se observó un pico máximo de células en división a las 16:00 y una disminución posterior, (figura 1 B). Estas observaciones no concuerdan con lo reportado por Rodríguez (2004), quien asegura que para *P. peruviana* la actividad mitótica está entre las 9:00 y 10:00 y Fukui y Nakayama (1996) quienes aseguran haber

observado una alta actividad mitótica alrededor de las 9:00 en una gran variedad de especies vegetales. Debe tenerse en cuenta que las condiciones de incubación, fotoperíodo de 16 horas, luz continua y temperatura de 23 ± 1 °C, pueden influir sobre la duración del ciclo

celular y sobre la hora mitótica por su acción sobre el reloj biológico de las plantas, el cual se ajusta o sincroniza con alguna característica del entorno, principalmente en plantas que están bajo condiciones ambientales constantes (Salisbury y Ross, 2000).

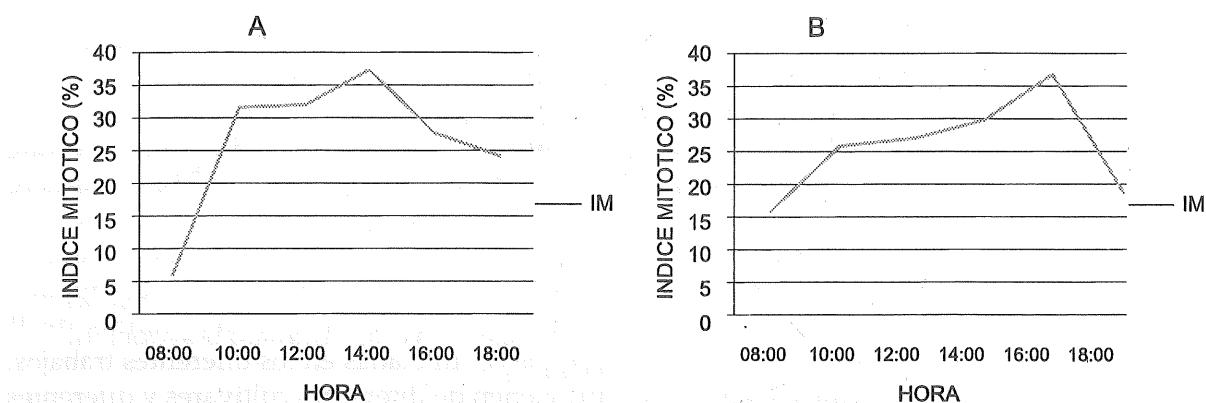


Figura 1. Variación del índice mitótico en ápices radicales de *P. peruviana*, tomados en diferentes horas del día, de plántulas mantenidas con A) fotoperíodo de 16 horas y B) luz continua.

Índice de fases del ciclo celular. El índice de fases permitió cuantificar el porcentaje de células en cada fase de división para el ciclo celular y, así determinar su duración relativa en el mismo. La cuantificación de células en los diferentes estadios mitóticos en *P. peruviana* indicaron que la profase es el estadio más largo en células de plántulas mantenidas con fotoperíodo y con luz continua, con un valor de 25% (tabla 4). De acuerdo con Sharma y Sharma (1980), el encontrar una fase con un porcentaje más alto, se debe a la necesidad de un tiempo más largo para atravesarla.

Para las plántulas mantenidas con fotoperíodo se cuantificó 0.37% de células en metafase, 0.2% en telofase y 0.03% en anafase, siendo esta última la más corta de la mitosis (tabla 4); en plántulas en luz continua se cuantificó 0.5% de células en metafase, 0.4% en telofase y 0.1% en anafase, siendo, esta última la más corta de la mitosis (tabla 4). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Matos y Molina (1996) en *Aloe Vera* y Vosa y Marchi (1979), quienes proponen a la profase como la fase más larga y a la anafase como la más corta.

Tabla 4. Frecuencia de células en cada fase de mitosis e índices de fases totales en células de ápices radicales de *P. peruviana* tomados de plántulas mantenidas con fotoperíodo de 16 horas y luz continua.

| | | Interfase | Profase | Metafase | Anafase | Telofase | Total células |
|-------------------------|--------------------|-----------|---------|----------|---------|----------|---------------|
| Fotoperíodo de 16 horas | Células observadas | 19306 | 6463 | 96 | 8 | 53 | 25926 |
| | Índice de fase (%) | 74 | 25 | 0,37 | 0,03 | 0,2 | 100 |
| Luz continua | Células observadas | 13986 | 4806 | 102 | 32 | 92 | 19018 |
| | Índice de fase (%) | 74 | 25 | 0,5 | 0,1 | 0,4 | 100 |

Índice mitótico total. El índice mitótico total hallado para *P. peruviana* fue del 26% tanto para las plántulas mantenidas en fotoperíodo de 16 horas como para las mantenidas en luz continua, (figuras 3 A y B), contrario a lo indicado por Rodríguez (2004) en estudios similares realizados en *P. peruviana*, en los que afirma que el índice mitótico es de 5.22%. Esta discrepancia puede deberse, principalmente, al origen del material vegetal utilizado en cada trabajo. Los resultados obtenidos tampoco concuerdan con lo reportado por Talledo et al., (1993), quienes afirman que la mitosis ocupa del 10 al 14 % del total del ciclo celular, ni con Vosa y Marchi (1979) los que asignan a la mitosis una ocupación del 5 al 10% del total del ciclo celular. Sin embargo, García (1977), afirma que las condiciones de fotoperíodo y luz continua pueden influir en la duración del ciclo celular, la hora e índice mitótico total, ya que estos pueden ser afectados por factores ambientales.

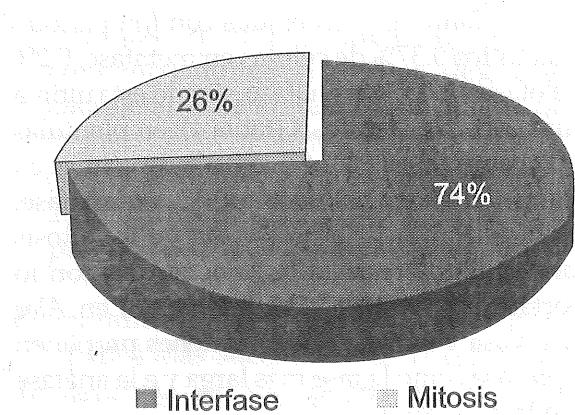


Figura 3. Composición porcentual del ciclo celular en ápices radicales de *P. peruviana* tomados de plántulas mantenidas con fotoperíodo de 16 horas y luz continua.

Obtención de cromosomas metafásicos para la determinación de números cromosómicos. El aplastamiento de los tejidos fue efectivo utilizando, para golpear, una barra de goma, lo cual garantizó una buena dispersión celular. Al microscopio fue posible identificar las células con cromosomas metafásicos libres y realizar el posterior conteo; los filtros verde y violeta

utilizados fueron apropiados para aumentar el contraste de los cromosomas y para la toma de fotografías.

Determinación de números cromosómicos

Testigos. Para los testigos se realizó un conteo de cromosomas en 820 células, encontrando 5 metafases con 24 cromosomas, (12 pares), diferente a lo reportado por Rodríguez (2004) quien indica que *P. peruviana* variedad Colombia, posee $2n=2x=32$; según Sinha, (1951) citado por Wenzel, (1973), el número cromosómico para *P. peruviana* es $2n=2x=24$ y según Menzel, (1951) citado por Wenzel, (1973), es $2n=48$. Estas diferencias pueden deberse al hecho de que las plantas de *P. peruviana*, utilizadas en los diferentes trabajos, provienen de diferentes cultivares y diferentes variedades. Por ejemplo, Rodríguez (2004), indica que la variedad Colombia usada en sus ensayos es producto del cruzamiento de la variedad Kenia con una variedad nativa; y la usada para este trabajo es una de las variedades comerciales cultivadas en huertos del municipio de Arcabuco-Boyacá.

Tratamiento con 5 g·L⁻¹ de colchicina. En ápices radicales de regenerantes de este tratamiento se observaron 4392 células cuantificándose 62 metafases; en 42 de estas fue posible realizar el conteo de cromosomas. Los resultados (tabla 5 y figura 4) mostraron tres células con 24 y cuatro con 48 cromosomas.

Tratamiento con 8 g·L⁻¹ de colchicina. En ápices radicales tomados de regenerantes de este tratamiento de 10265 células contadas, se observaron 88 metafases de las cuales en 22 fue posible realizar el conteo de cromosomas. Los resultados (tabla 5 y figura 4) mostraron una célula con 24 y una con 48; las demás células presentaron números cromosómicos entre 24 y 48.

Tratamiento con 10 g·L⁻¹ de colchicina. En este tratamiento, entre 2372 células contadas, se encontraron 50 metafases de las cuales en

24 fue posible realizar el conteo de cromosomas. Los resultados, (tabla 5 y figura 4) mostraron una célula con 24 y una con 60 cromosomas; las demás células presentaron números cromosómicos entre 24 y 60, entre las cuales se observaron 2 con 48 cromosomas.

Tratamiento con 15 g·L⁻¹ de colchicina. En ápices radicales a los cuales se aplicó este tratamiento se observaron 1346 células, cuantificándose 32 metafases; en 10 de las cuales fue posible realizar conteo de cromosomas. Los resultados (tabla 5 y figura

4) mostraron una célula con 24 y una con 72 cromosomas; las demás células presentan números cromosómicos entre 24 y 72.

Tratamiento con 20 g·L⁻¹ de colchicina. En ápices radicales tomados de regenerantes de este tratamiento se observaron 2070 células, cuantificándose 44 metafases de las cuales a 35 se les pudo realizar el conteo de cromosomas. Los resultados, (tabla 5 y figura 4), mostraron que el menor número de cromosomas observado fue 30 y el mayor 78, observándose 3 células con 48 y 1 con 72.

Tabla 5. Número de cromosomas y número de células cuantificadas en ápices radicales tomados de plántulas procedentes de yemas axilares tratadas con 5, 8, 10, 15 y 20 g·L⁻¹ de colchicina.

| COLCHICINA (g·L ⁻¹) | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|--|
| 5 | | 8 | | 10 | | 15 | | 20 | | |
| Cr | Cl | Cr | Cl | Cr | Cl | Cr | Cl | Cr | Cl | |
| 24 | 3 | 24 | 1 | 24 | 1 | 24 | 1 | 30 | 6 | |
| 28 | 3 | 28 | 2 | 30 | 4 | 30 | 2 | 32 | 5 | |
| 32 | 2 | 30 | 2 | 32 | 4 | 32 | 1 | 34 | 2 | |
| 36 | 9 | 32 | 3 | 34 | 6 | 36 | 2 | 36 | 7 | |
| 38 | 4 | 34 | 6 | 36 | 3 | 40 | 2 | 40 | 4 | |
| 40 | 6 | 36 | 4 | 40 | 3 | 54 | 1 | 42 | 1 | |
| 42 | 10 | 42 | 1 | 48 | 2 | 72 | 1 | 48 | 3 | |
| 44 | 1 | 44 | 2 | 60 | 1 | | | 60 | 3 | |
| 48 | 4 | 48 | 1 | | | | | 68 | 1 | |
| | | | | | | | | 70 | 1 | |
| | | | | | | | | 72 | 1 | |
| | | | | | | | | 78 | 1 | |

Nº Cr: Número de cromosomas; Nº Cl: Número de células.

Los datos de la tabla 6 indican que en un número variable de células para cada tratamiento, la colchicina afectó la formación del huso durante la división celular, provocando la aparición de células con alteraciones cromosómicas numéricas. A medida que aumentó la concentración de colchicina también aumentó el número de células con una mayor carga cromosómica, concordando con lo reportado por Rodríguez (2004) para *P. peruviana* y por Rubuluza et. al., (2007) en estudios con *Colophospermum mopane*, durante

la obtención de tetraploides mediante la aplicación de colchicina a sus semillas. Sin embargo, se observó que las duplicaciones cromosomales no ocurren en todas las células tratadas ni en todos los pares de cromosomas produciéndose también mixoploides, que según Koutoulis et. al., (2005) son quimeras las cuales contienen tejidos con células con diferentes números cromosómicos y diferentes grados de ploidía: diploides, tetraploides y aneuploides que según Takamura y Miyajima, (1996) son autopoloides que surgen desde los

diploides. En este trabajo los mixoploides se presentaron con regularidad en todos los

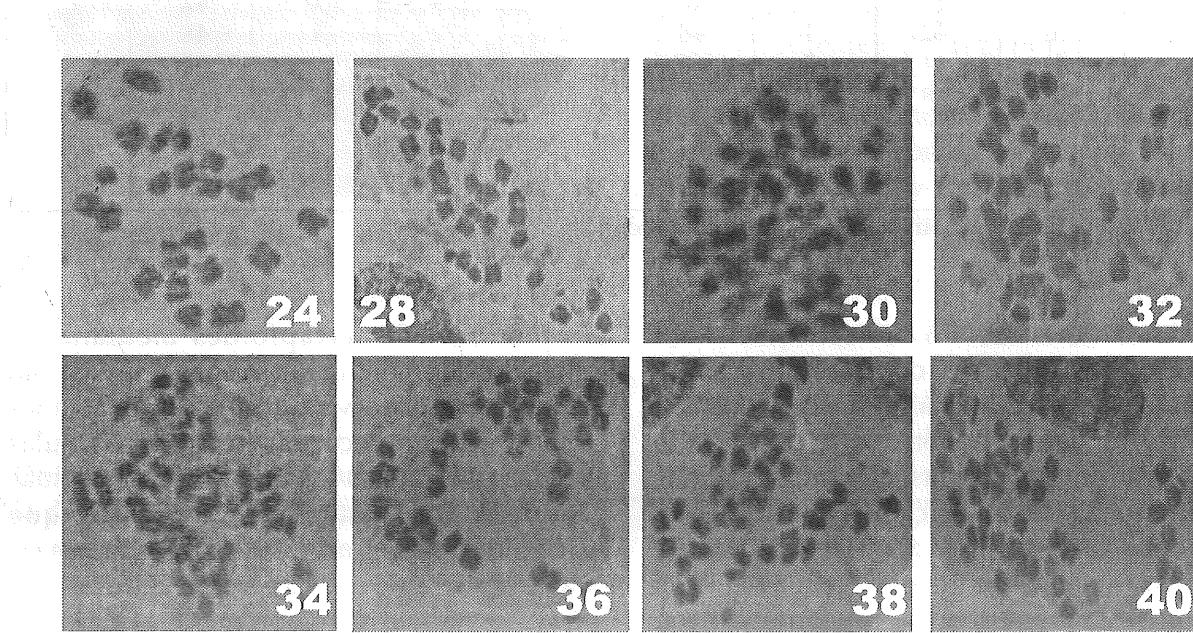
tratamientos con colchicina, siendo más frecuentes los aneuploides que los euploides.

Tabla 6. Grado de ploidía y números cromosómicos encontrados en células de ápices radicales tomados de plántulas procedentes de yemas tratadas con colchicina.

| Tto. | Diploides | Tri-ploides | Tetra-ploides | Penta-ploides | Hexa-ploides | Aneuploides | | | | |
|----------------------|-----------|-------------|---------------|---------------|--------------|-------------|---------|---------|---------|---------|
| | 24 | 36 | 48 | 60 | 72 | 25 - 35 | 37 - 47 | 49 - 59 | 61 - 71 | 73 - 80 |
| Testigo | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 g·L ⁻¹ | 3 | 9 | 4 | 0 | 0 | 5 | 21 | 0 | 0 | 0 |
| 8 g·L ⁻¹ | 1 | 4 | 1 | 0 | 0 | 13 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 10 g·L ⁻¹ | 1 | 3 | 2 | 1 | 0 | 14 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 15 g·L ⁻¹ | 1 | 2 | 2 | 0 | 1 | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| 20 g·L ⁻¹ | 0 | 7 | 3 | 3 | 1 | 13 | 5 | 0 | 2 | 1 |

Wenzel, (1973), tratando explantes de *P. peruviana* con diferentes concentraciones de colchicina obtuvo un aneuploide con 97 cromosomas. En otros estudios, (Takamura y Mayajima, 1996), también se han reportado aneuploides obteniéndose aneu-tetraploides en *Cyclamen persicum*, con 2n= 90, 92, 94 y 95 cromosomas. Koutoulis et. al., (2005) en estudios con *Humulus lupulus*, mediante

aplicación de colchicina, obtuvieron plantas tetraploides y mixoploides y Geoffriau et. al., (1997) en *Allium cepa* obtuvieron mixoploides en los cuales los procesos de regeneración se vieron afectados. Chen y Gao, (2007) también indujeron formación de mixoploides a partir de tejidos tetraploides de *Astragalus membranaceus*, mediante adición de colchicina a yemas vegetativas.



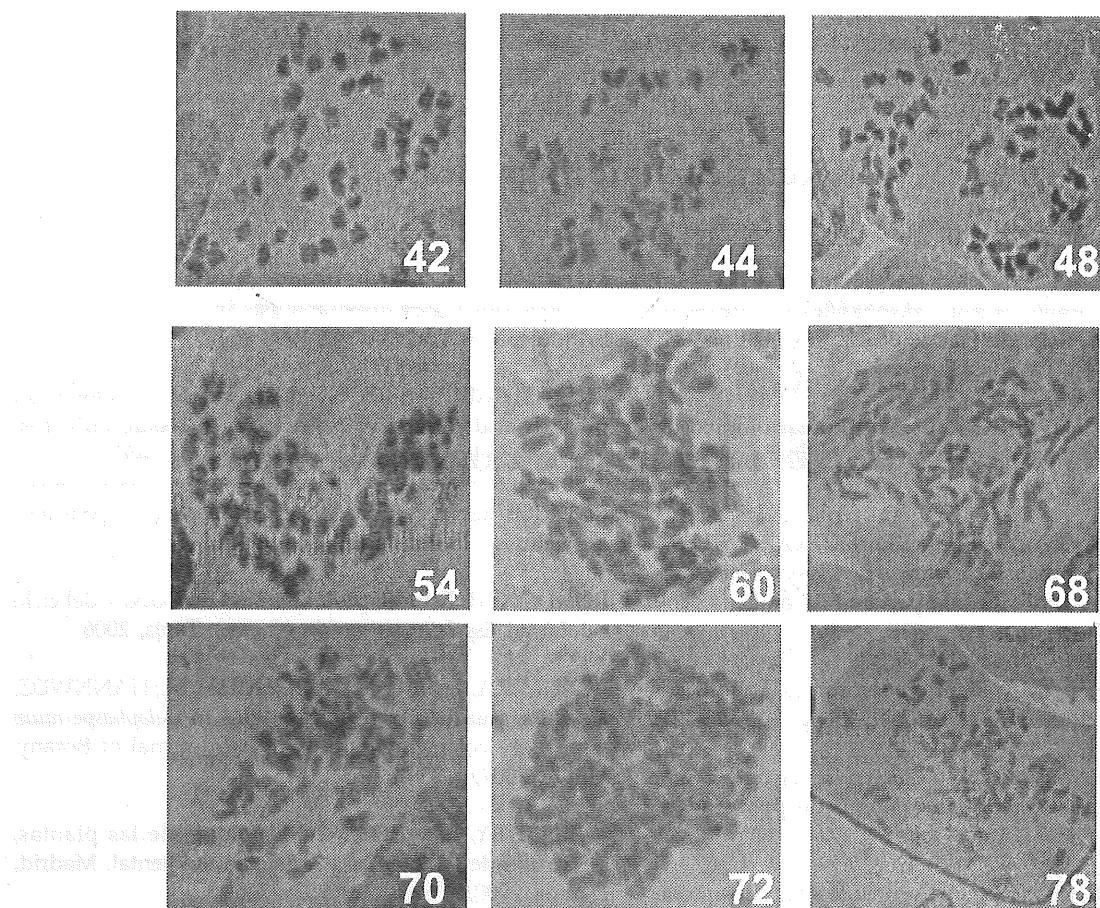


Figura 4. Números cromosómicos cuantificados en células de ápices radicales tomados de plántulas regeneradas de yemas axilares tratadas con 5, 8, 10, 15 y 20 g·L⁻¹ de colchicina (datos registrados después de 150 días de realizado el tratamiento).

Agradecimientos

Los autores de este trabajo agradecen a la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia - Dirección de Investigaciones (DIN) el apoyo financiero y a los integrantes del Grupo

de Investigación BIOPLASMA-UPTC por su continua colaboración. Este trabajo contiene parte de los resultados del trabajo de grado titulado "Desarrollo de procesos organogénicos y estudio del efecto de la colchicina sobre yemas vegetativas de *Physalis peruviana* L".

Referencias bibliográficas

- CHEN, L. y GAO, S. *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploides in *Astragalus membranaceus*. *Scientia Horticulturae China*. Vol. 112, 2007, p. 339 – 344.
- CORAL, C. y GUTIERREZ, B. Estudio cariológico de *Quercus humboldtii* B. En: *Agronomía Colombiana*. Bogotá. Vol. 6, 1987, p. 42 – 44.
- DARLINGTON y LA COUR. 1969. En: GUEVARA, SILES y BRACAMONTE. Análisis cariotípico de *Capsicum pubescens* (Solanáceas) "rocoto". *Revista peruana de biología*. Vol. 7, 2000, p. 1 – 7.
- FUKUI y NAKAYAMA. Plant chromosomes. Laboratory methods, New York. CRC press, Inc. 1996, p. 1-19,123-125.
- GARCÍA, A. Manual de técnicas de citogenética. Laboratorio de citogenética, colegio de postgrados. México. 1977.
- GARCÍA, M. Uchuva cosecha y poscosecha. Mosquera. 2003, p. 9 – 26.
- GARDNER, E.; SIMMONS, M. y SNUSTAD, D. Principios de genética. Cuarta edición. México. 2002, p. 525 – 526.
- GEOFFRAU, E.; KAHANE, R.; BELLAMY, C.; RANCILLAC, M. Ploidy stability and *in vitro* chromosome doubling in gynogenic clones of onion (*Allium cepa* L.). *Plant Science*. France. Vol. 122, 1997, p. 201 – 208.
- GEORGE, E. Plant propagation by tissue culture. Part 2. In Practice. Exegetics Limited. 2 ed, England. 1993/96.
- KOUTOULIS, A.; ROY, A.; PRICE, A.; SHERRIFF, L.; LEGGETT, G. DNA ploidy level of colchicine-treated hops (*Humulus lupulus* L.). *Scientia Horticulturae Tasmaniae*, Vol. 105, 2005, p. 263 – 268.
- LÓPEZ, A y SÁENZ, J. 1965. Alteraciones de los índices de fases y mitótico en meristemos de *Allium cepa*, inducidas por extractos de *Leidium meyenni* "maca". Facultad de medicina humana, universidad Ricardo Palma. Vol. 3, 2002, p. 21-23.
- MATOS, A. y MOLINA, J. Estudio citogenético en células radicales de *Aloe vera* L. Universidad de Zulia, departamento de Biología. Laboratorio de citogenética, Venezuela. 1996, p. 14 – 23.
- MOSCONE, E. Chromosome studies on *Capsicum* (Solanáceas) I. karyotype analysis in *C. chacoense*, En: Brittonia, New York. Vol. 42, 1990, p. 147 – 154.
- MURASHIGE T. y SKOOG P. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. Vol. 15, 1962, p. 437-497.
- RODRÍGUEZ, N. Estudio citogenético en *Physalis peruviana* L. "uchuva" (Solanáceas). Bogotá. 2004.
- RONDÓN, H. Estudio preliminar del cariotipo y del ciclo celular en *Espeletiopsis muiska* (Cuátr.). Tunja, 2006.
- RUBULUZA, T.; NIKOLOVA, R.; SMITH, M.; HANNWEG, K. *In vitro* induction of tetraploides in *Colophospermum mopane* by colchicine. *South African Journal of Botany*. Vol. 73, 2007, p. 259 – 261.
- SALISBURY, B. y ROSS, W. Fisiología de las plantas, desarrollo de las plantas y fisiología ambiental. Madrid, España, 2000, p. 696 – 723; 752 – 755.
- SHARMA, K Y SHARMA, A. Chromosome techniques, theory and practice. Butterworths y Co. London, 1980, p. 90 – 110.
- SINHA, P. 1951, Chromosome number and morphology in *Physalis*. En: WENZEL, W. G. 1973. A cytological study of colchic平 Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). Agroplantae. № 5, p. 79 – 84.
- TAKAMURA, T.; MIYAJIMA, I. Colchicine induced tetraploids in yellow-flowered cyclamens and their characteristics. *Scientia Horticulturae*, Japón. Vol. 65, 1996, p. 305 – 312.
- TALLEDO, D.; ESCOBAR, C.; ALLEMAS, V. Introducción al análisis cromosómico en vegetales. Perú, Universidad Ricardo Palma. 1993, p. 141.
- VOSA, C. y MARCHI, P. Estudio citogenético en células radicales de *Aloe vera*. Giorn. Botany, Italy. 1979, p. 45 – 52.
- WENZEL, W. G. A cytological study of colchic平 cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). Agroplantae. № 5, 1973, p. 79 – 84.