

Short Note [Nota Corta]



**INDUCCIÓN DE TETRAPLOIDES EN *Agave marmorata* Roezl,
USANDO COLCHICINA COMO ESTRATEGIA DE
MEJORAMIENTO GENÉTICO †**

**[INDUCTION OF TETRAPLOIDS IN *Agave marmorata* Roezl, BY
USING COLCHICINE AS A BREEDING STRATEGY]**

**Junea Alejandra Osorio-German¹, Amaury Martín Arzate-Fernández¹ *
and Tomás Héctor Norman-Mondragón¹**

¹*Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento.
Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México
(UAEMéx), Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km 11.5, SN, Cerrillo Piedras
Blancas, Municipio de Toluca, Estado de México, México, C.P. 50200.
Tel.7223012555. E-mail: amaury1963@yahoo.com.mx*

*Corresponding author

SUMMARY

Background: In Mexico, agaves are of economic and cultural importance. The "Agave Tepezate" (*Agave marmorata* Roezl), is a species that unfortunately its unregulated use makes it susceptible to extinction. Consequently, different methods of efficient genetic improvement and propagation for its conservation have been sought, for example, the artificial induction of polyploids as this process can increase genetic diversity, improve adaptability, and for the possible generation of individuals resistant to diseases or adverse environmental conditions. **Objective.** To evaluate the effect of colchicine as a mitostatic agent and promoter of ploidy variation in plants of *Agave marmorata* Roezl. **Methodology.** In the present study, 1000 seeds of *A. marmorata* were germinated *in vitro* to obtain the seedlings to be used, which were subjected to treatments with three exposure times (16, 24 and 48 h) and concentrations of colchicine Sigma-Aldrich (0.05, 0.10 and 0.15 % (w/v)). **Results.** As a result of the investigation, it was observed that polyploidization was possible by applying a concentration of 0.15 % of colchicine, with an immersion time of 24 h. At this concentration and immersion time the highest percentage of survival was obtained (60 %), in addition, a greater response was observed with respect to the number of regenerated shoots. Once the plants regenerated the root zone, the final chromosome count was carried out obtaining 120 chromosomes, which means that these plants are tetraploid ($4x=4n=120$). **Implications.** The chromosomal doubling of diploid to tetraploid individuals can generate positive changes in morphological characteristics, from the generation of larger organs, which can lead to a shortening of harvesting time and a greater amount of sugars produced in the stem due to the increased photosynthetic capacity derived from obtaining larger stalks. **Conclusion.** The effect of colchicine as a mitostatic agent for the induction of tetraploids of *A. marmorata* was effective; however, the time of exposure to the agent and its concentration is a fundamental factor for polyploidization.

Key words: Propagation methods; genetic improvement; polyploidization; mitotic agent; tetraploid.

RESUMEN

Antecedentes. En México, los agaves son de importancia económica y cultural. El "Agave Tepezate" (*Agave marmorata* Roezl), es una especie de uso no regulado lo que la hace susceptible a la extinción. En consecuencia, se han buscado distintos métodos de mejoramiento genético y de propagación que resulten eficientes para su conservación, ya que la inducción artificial de poliploides es un proceso que puede aumentar la diversidad genética, mejorar su adaptabilidad, y la posible generación de individuos resistentes a enfermedades o condiciones ambientales adversas. **Objetivo:** Evaluar el efecto de la colchicina como agente mitostático y promotor de variación de ploidía en plantas de *Agave marmorata* Roezl. **Metodología:** En el presente estudio,

† Submitted August 16, 2024 – Accepted March 5, 2025. <http://doi.org/10.56369/tsaes.5803>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ISSN: 1870-0462.

ORCID = A.M. Arzate-Fernández: <http://orcid.org/0000-0001-8603-0099>

1000 semillas de *A. marmorata* fueron germinadas *in vitro* para obtener las plántulas a utilizar, éstas fueron sometidas a tratamientos con tres tiempos de inmersión (16, 24 y 48 h) y concentraciones de colchicina Sigma-Aldrich (0.05, 0.10 y 0.15 % (p/v)). **Resultados:** Como resultado de la investigación se observó que la poliploidización fue posible aplicando una concentración de 0.15 % de colchicina, con un tiempo de inmersión de 24 h, con esta concentración y tiempo de inmersión se observó el mayor porcentaje de sobrevivencia (60 %) además, se observó una mejor respuesta con respecto al número de brotes regenerados. Una vez que las plántulas regeneradas formaron la zona radicular, se llevó a cabo el conteo cromosómico final obteniendo 120 cromosomas, lo que sugiere que estas plantas son tetraploides ($4x=4n=120$). **Implicaciones.** El doblamiento cromosómico de individuos diploides a tetraploides puede generar cambios positivos en las características morfológicas, a partir de la generación de órganos de mayor tamaño lo que puede implicar el acortamiento del tiempo de cosecha, mayor cantidad de azúcares producidos en la piña esto debido al incremento de capacidad fotosintética derivado de la obtención de pencas de mayor tamaño.

Conclusión. El efecto de la colchicina como agente mitostático para la inducción de tetraploides de *A. marmorata* resultó ser efectivo, sin embargo, el tiempo de exposición al agente y la concentración de este es un factor fundamental para la poliploidización.

Palabras clave: Agave; métodos de propagación; mejoramiento genético; poliploidización; agente mitostático; tetraploide.

INTRODUCCIÓN

Los *Agaves* son especies de América siendo México su centro de origen, son plantas de ambientes semiáridos pertenecientes al género de la familia *Agavaceae* (García-Mendoza, 2002). En México, los agaves son de importancia económica y cultural para numerosos pueblos indígenas que los han aprovechado durante siglos como materia prima para la elaboración de alimentos, bebidas, fibras, entre otros.

Actualmente la demanda principal en torno a la explotación del agave se ha centrado en la elaboración de bebidas alcohólicas, siendo las especies mezcaleras y tequileras las de mayor importancia económica para el país (Rivera-Lugo *et al.*, 2018). Entre las especies utilizadas para la elaboración del mezcal está el “Agave Tepezate” (*Agave marmorata* Roezl) la cuál es una especie silvestre, diplóide $2x=2n=60$. Según lo reportado por Flores-Maya *et al.* (2015), es considerada como endémica de algunas regiones de Puebla y colindancias con Oaxaca, se propaga a través de semillas e hijuelos, sin embargo, la reproducción de este agave se ve limitada debido a diferentes factores como la falta de polinizadores y el bajo porcentaje de viabilidad en la semilla, entre otros (Illsey Granich *et al.*, 2005). Además, se ha reportado que su periodo de maduración es el más largo de todas las especies de agaves mezcaleros, tarda entre 25 y 35 años de forma silvestre y aproximadamente 12 años de forma cultivada, aunado a su gran demanda comercial. La demanda de materia prima ha provocado la disminución de poblaciones de esta especie (SEMARNAT, 2010), lo cual pone su existencia en peligro de extinción. En consecuencia, se han buscado distintos métodos de mejoramiento genético y propagación que

resulten eficientes, a pesar de ello es poca la información reportada en el mejoramiento genético del *Agave*.

En África Oriental (Amaní, Tanzania) desde el año 1931 se estableció un programa para el desarrollo de agaves fuertes y resistentes para la producción de fibras (AGARED, 2017); por otra parte, de 1993 a 2006, en el Instituto de Investigaciones Hortícolas Liliana Dimitrova ubicada en La Habana, Cuba, se realizaron investigaciones de mejoramiento genético por medio de cruza híbridas con la finalidad de obtener una mayor producción de fibras (Serrano, 2009).

Dentro de las técnicas biotecnológicas empleadas para el mejoramiento genético de *Agave*, se ha reportado; la transformación genética mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens* y bombardeo de partículas, usando la especie de *A. salmiana*, con el fin de generar un transgénico, según lo reportado se obtuvieron siete clones de plantas resistentes al herbicida glufosinato de amonio (Gutiérrez-Mora *et al.*, 2014).

Por otra parte, se ha reportado que la poliploidía es un fenómeno natural que ocurre con frecuencia en las plantas, y se le considera un mecanismo fundamental en la evolución de las especies; este fenómeno ha contribuido a la aparición de novedades evolutivas tanto morfológicas, genéticas y fisiológicas, lo que ha permitido aumentar la capacidad competitiva, el éxito reproductivo y/o la tolerancia ecológica respecto a sus progenitores (Molero-Paredes and Matos, 2008).

Hay reportes que señalan que la poliploidía también puede ser inducida de manera artificial, es

un procedimiento que le brinda al fitomejorador la oportunidad de modificar una planta alterando el número de cromosomas y, en consecuencia, la proporción de genes alélicos que contribuyen a la emergencia de caracteres particulares ya reportados en varios trabajos de investigación, por ejemplo aumento en la variabilidad fenotípica, heterosis y alteraciones en los modos de reproducción (Fawcett, Maere and Van De Peer, 2009), también pueden presentarse órganos más grandes como por ejemplo en raíces, hojas, flores, frutos y semillas en comparación a los individuos diploides (Stebbins, 1950). No obstante, los efectos de este tratamiento son diversos e impredecibles, no siempre obteniendo resultados favorables, lo que requiere un trabajo arduo y minucioso para estudiar la consecuencia de la duplicación cromosómica en cada especie (Cubero Salmerón, 2013). Dicho fenómeno puede inducirse a través de distintos agentes mitostáticos tales como, orizalina y trifluralina (Ashton and Crafts, 1981).

Un ejemplo de la poliplodización como técnica de mejoramiento genético en el género, es el trabajo realizado por Ruvalcaba-Ruiz *et al.* (2012) quienes reportaron la producción de plantas trisómicas ($2n+1$) de *A. tequilana* mediante la adición de diversas concentraciones de para-fluorofenilalanina (TFP) al medio de cultivo, obteniendo resultados al utilizar de 8 a 12 mg L⁻¹; y Huijara-Vasconcelos (2015), quienes reportaron un trabajo para la inducción de poliploidía en *A. angustifolia* y *A. tequilana*, haciendo uso de la orizalina como agente mitostático, encontrando anomalías en la morfología de los explantes y también en los brotes.

Si bien existe una gama de agentes mitostáticos que pueden ser utilizados con el fin de inducir la poliploidización, la colchicina ha resultado ser el agente más efectivo para la duplicación cromosomal, ya que es un fármaco antimitótico que detiene la división celular en metafase o anafase, este es un compuesto que evita la distribución de las cromátidas de un cromosoma durante la mitosis, provocando la poliploidía en la célula filial, ya que no existe una división celular, pero si una duplicación previa del material genético (Urwin, 2014).

En consecuencia, el número cromosómico aumenta de diploide a tetraploide, aun cuando todos los cromosomas permanecen dentro de una célula individual (Poehlman, 1976). El empleo de agentes mitostáticos para inducir poliploidía, permite una mayor comodidad en el manejo de material vegetal, la obtención de resultados en un menor período de

tiempo, y con ello aumentar la disponibilidad de nuevo germoplasma (Molero-Paredes and Matos, 2008).

En función de lo anterior, el presente trabajo tuvo la finalidad de evaluar el efecto de la colchicina como agente mitostático y promotor de variación en la ploidía en plantas de *Agave marmorata* Roezl., buscando obtener individuos poliploides que permitan hacer comparaciones morfológicas y cromosómicas con el fin de evaluar las posibles ventajas que podrían presentar estos individuos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen del material vegetativo

Se emplearon 1000 semillas de *A. marmorata*, donadas por el Centro Regional Universitario Sur Oaxaca, Programa Maguey-Mezcal, de la Universidad Autónoma de Chapingo (UACH).

Desinfección de la semilla

Las semillas fueron colocadas en un saco de malla tul (20 semillas por saco) para ser sumergidas en una solución jabón líquido Antibenzil durante 5 min, adicionando tres gotas del surfactante Tween 20 y posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril por 15 minutos. Enseguida, las semillas fueron trasladadas a una campana de flujo laminar para trabajar en condiciones asépticas. Las semillas se colocaron en tubos Falcon de 50mL y se sumergieron en etanol al 70 % (v/v) durante un minuto, posteriormente se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % (v/v) por 15 minutos en agitación constante, y finalmente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se dejaron reposar por 24 h a 6 °C.

Establecimiento *in vitro*

Las semillas, una vez desinfectadas, fueron germinadas y cultivadas *in vitro* durante 45 días en recipientes de polipropileno con un volumen de 500 mL, los cuales contenían 75 mL de medio de cultivo MS (Murashige and Skoog, 1962) al 50 % de su concentración, con 30 g de sacarosa y 0.5 g de carbón activado. Todos los cultivos se incubaron a 25± 2°C con luz led blanca y un fotoperíodo de 16/8 h y una intensidad lumínica de 33 μmol m⁻² s⁻¹. Se establecieron 20 semillas por recipiente.

Organogénesis directa

A todas las plantas obtenidas, una vez que tenían dos o más hojas, y alcanzaron una altura de entre

5-7 cm, se les eliminaron las hojas y raíces para dejar únicamente el tallo con la zona meristemática (ZM), las cuales fueron tratadas en cuatro concentraciones de colchicina Sigma-Aldrich (Testigo, 0.05, 0.10 y 0.15% (p/v)), en tres tiempos de inmersión (16, 24 y 48 h), colocando 20 explantes (ZM) en cada uno de los tratamientos. Con el fin de evitar la oxidación o la necrosis en los tejidos vegetales, se consideró pertinente que las soluciones de colchicina permanecieran en constante agitación con la ayuda de agitadores orbitales (marca Allsheng 08-100), a una velocidad de 120 rpm. Posteriormente todas las ZM fueron sometidas a un proceso de organogénesis directa (OD) de acuerdo con la metodología propuesta por (Martínez and Arzate, 2022).

Para la OD, las ZM fueron cultivadas en un medio de cultivo MS al 50 % de su concentración, adicionándole 5 mg/L de BA (Benciladenina), y 30 g/L sacarosa, manteniendo los cultivos en las mismas condiciones que en la fase de establecimiento. Transcurridos 60 días se contabilizó el número de brotes de cada explante.

Los brotes regenerados fueron separados del explante original y enraizados en un medio MS al 50 %, adicionando 30 g de sacarosa, y 0.5 g/L de carbón activado. Pasados 30 días, las plántulas fueron extraídas del medio de cultivo, se realizó un lavado con agua para eliminar los restos de agar y para realizar el conteo cromosómico se utilizó la región meristemática de la raíz, cabe mencionar que se realizaron cerca de 10 observaciones por muestra (Alvarez-Aragón *et al.*, 2020)

La adaptación consistió en seleccionar las plántulas de mayor vigor (plántulas sanas, con mayor número de hojas, buen desarrollo radicular, etc.) para posteriormente colocarlas en charolas, las cuales previamente fueron sumergidas en una solución de fertilizante soluble Hydro-Solution al 25 % (v/v) y adicionando enraizador Phyto Raizon Plus (1 g/L), para favorecer la formación de raíces. Todas las plántulas regeneradas se colocaron por 21 días en un microtúnel con cubierta de plástico, a una HR (humedad relativa) de 60-70%.

Preparación de cromosomas mitóticos

Se recolectaron ápices radiculares jóvenes y de mayor vigor (entre 2-3 cm) tanto de plantas previas al tratamiento de organogénesis directa (para confirmar su número cromosómico original), como de las plantas obtenidas del mejor tratamiento (para el análisis de poliploidización); estas fueron recolectadas en un horario de 9 a 10 am. Con el fin

de detener el proceso de mitosis se trataron directamente con α -Bromonaftaleno 0.1 %, durante 24 h. Se desechó la solución de detención mitótica y se fijaron las raíces en la solución Farmer (Alcohol: Ácido acético 3:1) por 24 h a temperatura ambiente. Posterior a esto se llevó a cabo la hidrólisis de los ápices los cuales fueron lavados con agua destilada e hidrolizados en una solución de HCl 1 N a 60 °C, durante 8 min. El meristemo radicular se transfirió a un portaobjetos limpio, diseccionando el tejido meristemático con la ayuda de un bisturí. Se removió el exceso de agua con ayuda de un papel filtro e inmediatamente se agregó una gota aceto-orceína 1 % o de ácido acético al 45 % (v/v). Se colocó un cubreobjetos en la suspensión y se dispersó el tejido golpeando ligeramente con el lado posterior de una aguja. Posteriormente se colocaron algunas capas de papel de filtro sobre el portaobjetos y el cubreobjetos, presionando hacia abajo, evitando cualquier movimiento horizontal para dejar las células en un solo plano. Las preparaciones fueron observadas bajo los objetivos 10x, 40x y 100x en un microscopio de marca Leica modelo Olympus BX43 de contraste de fases.

Al finalizar la observación de las laminillas e identificar células en metafase se congeló el portaobjetos en nitrógeno líquido, retirando el cubreobjetos con una hoja de afeitar; posteriormente se enjuagó durante 5 min en etanol al 100 % dejando secar la muestra, esto con el fin de fijar las células en las laminillas y poder ser observadas posteriormente (García Velázquez, 1990).

Análisis estadístico

En cada tratamiento, los explantes fueron colocados en matraces de 50 ml y estos a su vez se colocaron en los agitadores orbitales, la disposición de los tratamientos fue totalmente al azar.

En el presente estudio, se evaluaron dos factores: **A**) la concentración de colchicina: 0 (testigo), 0.05 %, 0.10 % y 0.15 % y **B**) el tiempo de inmersión al agente mitostático (16, 24, y 48 h). En total, el número de tratamientos fueron 10, con cinco repeticiones.

Los datos obtenidos de los parámetros; concentración de colchicina, tiempo de inmersión y número de brotes regenerados después del tratamiento por Organogénesis Directa (OD), se sometieron a un análisis de varianza, además se realizó una prueba de rango múltiple de Tukey con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$, y se calculó el

error estándar de la media, utilizando el software Stathgraphics versión Centurion.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se logró constatar el efecto de la colchicina en explantes de *Agave marmorata* Roez, sometidos posteriormente a un proceso de OD.

Efecto de la concentración de colchicina

El análisis estadístico mostró que la variable "concentración de colchicina" por sí sola no presenta diferencias significativas en la regeneración de brotes ($P = 0.430$, datos no mostrados). Sin embargo, al analizar las medias de brotes regenerados por cada tratamiento (Tabla 1), se observó que la mayor regeneración ocurrió con la concentración de 0.15 % (30.0 ± 2.5 brotes por explante). La desviación estándar y el error experimental asociados a este tratamiento (2.5 y 1.44, respectivamente) indican una variabilidad moderada en la respuesta de los explantes, lo que sugiere que, aunque la concentración de colchicina no es un factor determinante por sí sola, sí influye en el proceso cuando se combina con el tiempo de inmersión adecuado. La falta de significancia estadística en la concentración de colchicina por sí misma podría deberse a la variabilidad en la respuesta de los explantes a diferentes concentraciones. Sin embargo, la tendencia observada sugiere que concentraciones más altas (0.15%) podrían estar asociadas con una mayor regeneración de brotes, siempre y cuando se combine con un tiempo de inmersión óptimo. Esto resalta la importancia de considerar la interacción entre ambos factores.

Efecto del tiempo de inmersión

El tiempo de inmersión tuvo un efecto significativo sobre la regeneración de brotes ($P = 0.041$, datos no mostrados), lo que indica que la duración del tratamiento con colchicina afecta directamente la respuesta de los explantes. Se observó que tiempos de exposición prolongados (48 h) resultaron letales para el tejido, causando necrosis, muerte celular (0 % de sobrevivencia) y ausencia total de regeneración. Por otro lado, un tiempo de inmersión de 24 h fue el más efectivo, especialmente cuando se combinó con una concentración de 0.15 % de colchicina, ya que resultó en la mayor producción de brotes ($30.0 \pm$

2.5 por explante) y una supervivencia del 60 %. El tiempo de inmersión es un factor crítico en el éxito del tratamiento con colchicina. Tiempos demasiado cortos pueden no inducir el efecto deseado, mientras que tiempos prolongados pueden ser tóxicos para los explantes. Este hallazgo sugiere que existe una ventana óptima de exposición (24 h en este caso) que maximiza la regeneración de brotes sin comprometer la viabilidad del tejido. La baja desviación estándar (2.5) y el error experimental (1.44) en este tratamiento indican que los resultados son consistentes y reproducibles.

Interacción entre concentración de colchicina y tiempo de inmersión

El efecto combinado de la concentración de colchicina y el tiempo de inmersión fue altamente significativo ($P = 0.016$, datos no mostrados), lo que indica que ambos factores interactúan y afectan de manera conjunta la regeneración de brotes. Este resultado resalta que no basta con analizar cada factor por separado, sino que su combinación determina el éxito del proceso de OD. Por ejemplo, mientras que con 0.15 % de colchicina por 24 h produjo el mayor número de brotes (30.0 ± 2.5), la misma concentración por 48 h resultó completamente letal. Esto confirma que la duración del tratamiento es un factor crítico que modula la efectividad de la colchicina. La interacción significativa entre la concentración de colchicina y el tiempo de inmersión sugiere que la respuesta de los explantes es altamente dependiente de la sinergia entre ambos factores. Esto implica que, para optimizar el proceso de OD, es necesario ajustar tanto la concentración como el tiempo de exposición de manera conjunta. Futuros estudios podrían explorar combinaciones intermedias para identificar condiciones aún más efectivas.

Análisis cromosómico

Como ya ha sido reportado previamente, se han logrado cambios significativos cuando se utilizan individuos diploides ya que permiten la persistencia de genotipos poliploides (Stebbins, 1950), por tanto, uno de los aspectos principales en el proceso de poliploidización de una especie, es la selección de explantes diploides. En la presente investigación, al seleccionar y realizar el conteo cromosómico del material antes del tratamiento con el agente mitostático, se observó que los individuos diploides fueron $2n=60$ (Figura 1, A).

Tabla 1. Tratamientos con colchicina y tiempos de inmersión para evaluar su efecto mitostático en explantes de *A. marmorata* Roezl.

Concentración de colchicina (p/v)	Tiempo de inmersión (h)	Sobrevivencia de explantes (%)	Media de brotes regenerados por OD y por explante	s.e.m.
Control (0%)	0	100 %	20.0 ± 1.5	0.87
T1 (0.05%)	16	50 %	5.0 ± 0.8	0.46
	24	30 %	10.0 ± 1.2	0.69
	48	0 %	0.0 ± 0.0	0.00
T2 (0.10%)	16	40 %	10.0 ± 1.0	0.58
	24	30 %	10.0 ± 1.5	0.87
	48	0 %	0.0 ± 0.0	0.00
T3 (0.15%)	16	20 %	10.0 ± 1.8	1.04
	24	60 %	30.0 ± 2.5	1.44
	48	0 %	0.0 ± 0.0	0.00

s.e.m. Error estándar de la media

Por otro lado, en las preparaciones cromosómicas de las plantas regeneradas mediante OD, de los explantes tratados con colchicina, se pudo observar el éxito de la poliploidización, cuyo número cromosómico fue de $2n=4x=120$ (Figura 1, B). En este sentido Gantait *et al.* (2011) en *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella reportaron que con una concentración de colchicina al 0.1 % durante 8 h, el 64 % de las plántulas recuperadas resultaron ser tetraploides; observando que para esta especie y con una menor concentración del agente mitostático resultó ser más eficiente. Mientras que Molero-Paredes and Matos (2008) en *Aloe Vera*, lograron observar que a una concentración de 0.15 % por 48 h, con las plantas tratadas mostraron tejido quimérico con un alto predominio de células poliploides. En contraste, con el mismo tiempo de inmersión, en nuestro procedimiento, resultó ser perjudicial para los explantes tratados, mientras que en nuestro mejor tratamiento no se observó la presencia de células quiméricas en las plantas regeneradas, lo cual es un aspecto favorable debido a que esto es indicativo de la estabilidad en el genotipo usado. De igual forma esto podría deberse a que en comparación con el trabajo realizado en *Aloe vera* se empleó el explante tratado directamente en el medio de cultivo, en este sentido podría resultar más favorable el empleo del explante original cuyas células individuales regenerarán una planta (como en el presente trabajo) en lugar de emplear plantas completas para su poliploidización.

Análisis morfológico de plántulas regeneradas de *Agave marmorata* Roezl

Como resultado de la observación a los 45 días en invernadero (21 días de adaptación y 24 días de endurecimiento), se hizo un comparativo de las

características morfológicas entre plantas diploides ($2n=2x=60$) (Figura 1, C y E) y de las plantas tetraploides ($2n=4x=120$) regeneradas *in vitro* con el tratamiento de colchicina a 0.15 % y 24 h de inmersión (Figura 1, D y F), en donde se puede observar que las plántulas tetraploides presentaron mayor cantidad de hojas (5) en comparación con las diploides (3), además las hojas de las plántulas tetraploides mostraron mayor vigor así mismo presentaron un desarrollo radicular mayor en comparación con plantas testigo como se puede observar en las Figura 1, E y F.

De igual forma con base en los resultados obtenidos en esta investigación se pudo constatar que la concentración de colchicina y el tiempo de inmersión son factores fundamentales para lograr la poliploidía ya que a medida que el porcentaje de concentración de colchicina aumentó del 0.05 % al 0.15 %, fue posible observar que el tamaño de los órganos vegetales aumentó considerablemente en comparación con las plántulas testigo. Resultados similares se obtuvieron en *Gymnostachyum Zeylanicum* en donde, el tratamiento con una concentración de 0.08 % y un tiempo de exposición 24 h produjo mejores resultados con base en el tamaño de los órganos (Khaing *et al.*, 2007); en *Dioscorea zingiberensis*, el tratamiento de 36 h con colchicina al 0.2 %, produjo un mayor porcentaje de inducción tetraploides (35.6 %) (Gao *et al.*, 2010); y en *Nicotiana glauca*, donde se realizó una comparación entre plantas diploides y tetraploides determinando que el tratamiento con colchicina produjo diferencias significativas en el aumento del número de pétalos y del diámetro de la flor, el tamaño del estigma y mostró mayor floración (Hiaba and Mohamed, 2009; Gao *et al.*, 2010). De esta forma se puede observar en diversas especies que el doblamiento del número cromosómico de

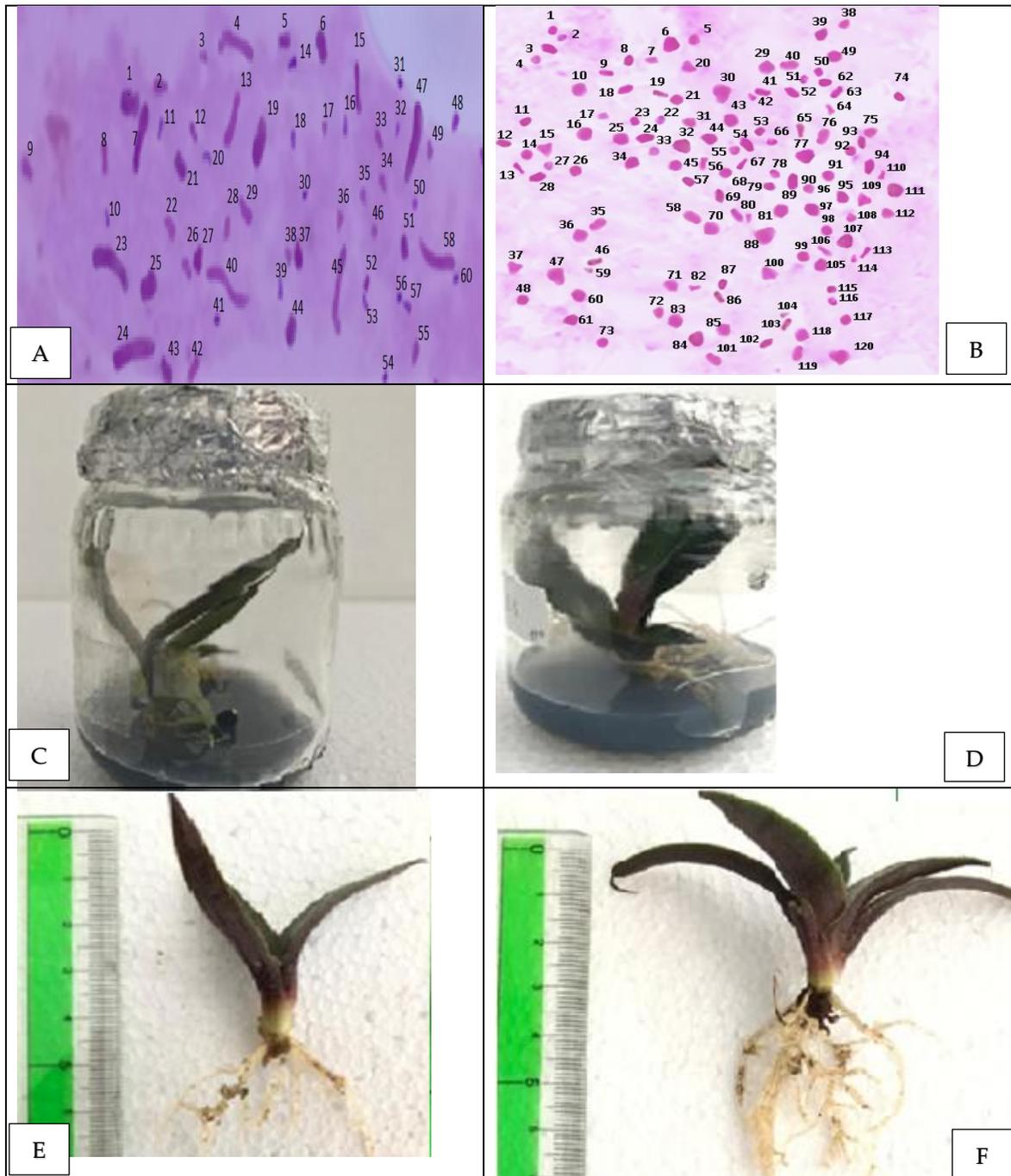


Figura 1. **A)** Número de cromosomas ($2n=2x=60$) observado en una célula de raíz de *A. marmorata*, sin haber tratado a la plántula previamente con colchicina (tratamiento Control). La plántula fue posteriormente sumergida 24 h en colchicina (0.15 %). Las observaciones citológicas se hicieron por medio de un microscopio de contraste de fases, utilizando el objetivo 100X. **B)** Número de cromosomas ($2n=4x=120$) observado en plantas regeneradas *in vitro* de *A. marmorata* Roezl previamente tratadas con colchicina (0.15 % y 24 h de inmersión en colchicina). **C)** Plántula diploide regenerada *in vitro*, **D)** Plántula tetraploide regenerada y cultivada *in vitro* a los 45 días por Organogénesis Directa (OD), **E)** y **F)** Plántula diploide y tetraploide, regeneradas *in vitro*, a los 45 días después del trasplante y adaptadas en invernadero.

individuos diploides a tetraploides puede cambiar sus características morfológicas, a pesar de lo anterior es importante seguir realizando investigaciones que puedan ayudar a determinar si la poliploidía generada en estas plántulas es capaz de permanecer en las siguientes generaciones, así como su efecto sobre el acortamiento del tiempo de cosecha, la cantidad de azúcares presentes en la piña, entre otros.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir que el mejor tratamiento para lograr la poliploidización de plantas diploides de *A. marmorata* ($2n=2x=60$) a tetraploides ($2n=4x=120$), fue con una concentración de colchicina al 0.15 % y un tiempo de inmersión de 24 h, obteniendo el 60 % de supervivencia y la mayor cantidad de brotes por explante. Así mismo se logró observar el aumento de características físicas como el número de hojas y tamaño de raíz, entre otros, en los explantes tetraploides, en comparación con los diploides. Se determinó que para *A. marmorata* resulta nocivo exponer los explantes a 48 h de tratamiento.

Funding. This research is part of the project "Production of *Agave* spp. plants from an *in vitro* germplasm bank" with code number 6624/2022/CIP, financed by the Autonomous University of the State of Mexico.

Conflict of interest. The authors declare that there is no conflict of interest associated with the results of this publication.

Compliance with ethical standards. The authors declare that this research was supervised by the Internal Bioethics Committee of the Autonomous University of the State of Mexico, under the authorization of project 6624/2022/CIP.

Data availability. The data presented in this study are available on request from the corresponding author (amaury1963@yahoo.com.mx).

Author contribution statement (CRediT). **J. A. Osorio-German** – conceptualization, methodology, writing–review and editing, formal analysis; **A.M. Arzate-Fernández** – methodology, resources, funding acquisition, conceptualization, writing–review and editing.

REFERENCES

- AGARED, 2017. *Estado del Arte publicado por AGARED, Red Temática Mexicana Aprovechamiento Integral Sustentable y Biotecnología de los Agaves*. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. – CONACYT, México.
- Alvarez-Aragón, C., Arzate-Fernandez, A.-M., Martínez-Martínez, S.-Y. and Martínez-Velasco, I., 2020. Regeneración de plantas DE *Agave marmorata* Roezl, vía embriogénesis somática. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 23(2), p.36. <https://doi.org/10.56369/tsaes.3117>
- Ashton, F.M. and Crafts, A.S., 1981. *Mode of action of herbicides*. 2d ed ed. New York ; Chichester [Eng.]: Wiley.
- Cubero Salmerón, J.I., 2013. *Introducción a la mejora genética vegetal*. Ediciones Mundi-Prensa.
- Fawcett, J.A., Maere, S. and Van De Peer, Y., 2009. Plants with double genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous–Tertiary extinction event. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(14), pp.5737–5742. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900906106>
- Flores-Maya, S., Vargas-Jurado, M.Á., Suárez-Mota, M.E. and Barrera-Escorcia, H., 2015. Análisis cariotípico de *Agave marmorata* y *A. peacockii* (Agavaceae) ubicados en las terrazas aluviales del río Zapotitlán, Puebla, México. *Polibotánica*, [online] 0(40). <https://doi.org/10.18387/polibotanica.40.7>
- Gantait, S., Mandal, N., Bhattacharyya, S. and Das, P.K., 2011. Induction and identification of tetraploids using *in vitro* colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. *Sciella. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 106(3), pp.485–493. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9947-1>
- Gao, S.-L., Chen, L.-L., Wei, K.-H. and Huang, H.-P., 2010. *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in *Dioscorea zingiberensis*. *Pharmacognosy Magazine*, 6(21), p.51. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.59966>

- García Velázquez, A., 1990. Técnicas y procedimientos de citogenética vegetal. Colegio de Posgraduados, México.
- García-Mendoza, A., 2002. Distribution of agave (Agavaceae) in México. *Cactus and Succulent Journal*, 74(4), pp. 177-188.
- Gutiérrez-Mora, A., Rodríguez-Garay, B., Contreras-Ramos, S.M., Kirchmayr, M.R. and González-Ávila, M., 2014. *Sustainable and integral exploitation of agave*. CIATEJ- CONACYT, México
- Hiaba, A.A. and Mohamed, A.Y., 2009. Comparative studies on diploid and tetraploid levels of *Nicotiana glauca*. *Academic Journal of Plant Sciences*, 2(3), pp.182–188.
- Huijara-Vasconcelos, J.J., 2015. *Estudio del proceso de poliploidización in vitro en Agave*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Tesis doctorado. <https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1003/560>
- Illsey Granich, C., Gómez Alarcón, T., Rivera Méndez, G., Morales Moreno, M. del P., García Bazán, J. and Ojeda Sotelo, A., 2005. Informe final del Proyecto. V028. Conservación in situ y manejo campesino de magueyes mezcaleros. <http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/InfV028.pdf>
- Khaing, T.T., Perera, A.L.T., Sumanasinghe, V.A. and Wijesundara, D.S.A., 2007. Improvement of *Gymnostachyum* species by induced mutation. *Tropical Agricultural Research*, 19, p. 265-272. <https://dl.nsf.gov.lk/items/aab7bd01-81a6-4f09-82ed-bfb31232bc25>
- Martínez, V.I. and Arzate-F., M.A., 2022. Analysis of the somaclonal variation in two *in vitro* regenerated agave species. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, [online] 25(2), p.050. <https://doi.org/10.56369/tsaes.3709>
- Molero-Paredes, T. and Matos, A., 2008. Efectos de la inducción artificial de la poliploidia en plantas de *Aloe vera* (L.). *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad del Zulia*, 42, pp.111–133.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), pp.473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Poehlman, J.M., 1976. *Mejoramiento genético de las cosechas*. [online] Limusa. Available at: <https://books.google.com.mx/books?id=mqiXngEACAAJ>
- Rivera-Lugo, M., García-Mendoza, A., Simpson, J., Solano, E. and Gil-Vega, K., 2018. Taxonomic implications of the morphological and genetic variation of cultivated and domesticated populations of the *Agave angustifolia* complex (Agavoideae, Asparagaceae) in Oaxaca, Mexico. *Plant Systematics and Evolution*, 304(8), pp.969–979. <https://doi.org/10.1007/s00606-018-1525-0>
- Ruvalcaba-Ruíz, D., Palomino, G., Martínez, J., Méndez, I. and Rodríguez-Garay, B., 2012. *In vitro* induction of a trisomy of *Agave tequilana* Weber var. Azul (Agavaceae) by para-fluorophenylalanine treatment. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 48(1), pp.144–152. <https://doi.org/10.1007/s11627-011-9405-0>
- SEMARNAT, 2010. Norma oficial mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. <https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4254/semarnat/semarnat.htm>
- Serrano, V.E., 2009. *Estrategia para el mejoramiento genético de Agaves en Cuba*. Instituto de Investigaciones Hortícolas “Liliana Dimitrova”.
- Stebbins, G.L., 1950. *Variation and Evolution in Plants*. [online] Columbia University Press. <https://doi.org/10.7312/steb94536>
- Urwin, N.A.R., 2014. Generation and characterisation of colchicine-induced polyploid *Lavandula* × intermedia.

Euphytica, 197(3), pp.331–339.
<https://doi.org/10.1007/s10681-014-1069-5>