

Efecto de la colchicina sobre la morfología foliar y los estomas de *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H.Perrier (Crassulaceae)

Effect of colchicine on *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H.Perrier (Crassulaceae) leaf morphology and stomates

SEIR ANTONIO SALAZAR M.^{1, 2}
GUILLERMO JAVIER VALDERRAMA R.¹
JESÚS DAVID QUINTERO C.¹



***Kalanchoe daigremontiana* e hijuelos
tratados con colchicina**

Foto: J.D. Quintero C.

RESUMEN

El presente estudio evaluó el efecto de diferentes concentraciones y tiempo de exposición de colchicina, sobre la morfología foliar y los estomas de *Kalanchoe daigremontiana*. Inicialmente, se recolectaron y se sometieron las plántulas de *K. daigremontiana* a concentraciones de 0,025% y 0,1% (p/v) de colchicina y a dos tiempos de exposición (24 y 48 horas). Posteriormente, se realizaron estudios morfológicos como la altura de la planta (AP), anchura de la hoja (AH), número de hojas (NH), longitud foliar (LH), espesor de hoja (EH) y volumen foliar (VH) cada 15 días, durante 16 semanas después de la siembra. Luego, se caracterizaron los estomas, teniendo en cuenta el ancho, el largo, índice estomático y el número de cloroplasto por estoma. Se encontró un incremento significativo en la morfología foliar y estomática, en los tratamientos con colchicina de 0,025% a 24 y 48 horas. Lo que demuestra que el uso de la colchicina logra un mayor crecimiento en poco tiempo y aumento de la biomasa en la planta medicinal *K. daigremontiana*.

Palabras clave adicionales: morfogénesis, índice estomático, ploidía, planta medicinal, volumen foliar.

¹ Facultad de Ciencias Agrarias y del Medio Ambiente, Programa de Ingeniería Agronómica, Universidad Francisco de Paula Santander, Cúcuta (Colombia). ORCID Salazar M., S.A.: 0000-0002-3287-703X; ORCID Valderrama R., G.J.: 0000-0001-7432-9667; ORCID Quintero C., J.D.: 0000-0002-2011-2638

² Autor para correspondencia. salazar663@hotmail.com

ABSTRACT

The current study evaluated the effect of different concentrations and exposure times of colchicine on *Kalanchoe daigremontiana* leaf morphology and stomates. Initially, *K. daigremontiana* seedlings were harvested at concentrations of 0.025% and 0.1% (w/v) of colchicine and at two exposure times (24 and 48 hours). Subsequently, morphological studies, such as plant height (PH), leaf width (LW), number of leaves (NL), leaf length (LL), leaf thickness (LT) and leaf volume (LV), were done every 15 days for 16 weeks after sowing. Afterwards, the stomates were characterized, taking into account the width, length, stomatal index and number of chloroplasts per stomate. A significant increase in foliar and stomatal morphology was found in treatments with colchicine of 0.025% at 24 and 48 hours. This shows that the use of colchicine achieves greater growth in a short time and increased biomass in medicinal *K. daigremontiana* plants.

Additional key words: morphogenesis, stomatal index, ploidy, medicinal plant, leaf volume.

Fecha de recepción: 12-07-17 Aprobado para publicación: 30-01-2018

INTRODUCCIÓN

El género *Kalanchoe* pertenece a la familia crasulácea (crasa o suculenta), tiene alrededor de 125 especies descritas. Se encuentran principalmente en África, Madagascar, América tropical y Australia (Abdel-Raouf, 2012). Actualmente está distribuido por todo el mundo (Mora-Pérez y Hernández-Medel, 2016). Son comúnmente usadas en la medicina natural y farmacéutica, por producir metabolitos secundarios ricos en alcaloides, triterpenos, glucósidos, flavonoides, esteroides (bufadienolides) y lípidos (Majaz *et al.*, 2011), que ayudan a tratar problemas de salud como la bronquitis, quemaduras, dolores de oído, picaduras de insectos, infecciones respiratorias, tuberculosis, problemas de la piel, infecciones bacterianas y fúngicas, problemas intestinales, cáncer (linfoma), epilepsia, varicela, tratamientos clínicos del corazón, entre otros (Okwu y Nnamdi, 2011; Tkalec *et al.*, 2012; Salahdeen y Yemitan, 2006; Kolodziejczyk-Czepas *et al.*, 2017).

Kalanchoe daigremontiana Raym.-Hamet & H. Perrier (espinazo del diablo) es una hierba suculenta, nativa de zonas semiáridas de Madagascar (Herrera, 2011). Su característica principal es producir pequeñas plántulas o hijuelos, que nacen entre los dientes del margen aserrado del foliolo (Garcês *et al.*, 2007; Puertas *et al.*, 2014). Produce sustancias bioactivas con propiedades antioxidantes, antitumorales, antihistamínicas, antiinflamatorias e inmunomoduladora (Tkalec *et al.*, 2012). Además, se ha utilizado tradicionalmente para la cura de heridas y como relajante o calmante,

se ha estudiado su eficacia para controlar células cancerígenas de pulmón, cuello de útero y en carcinoma hepatocelular, debido a la presencia de compuestos bufadienolides en hojas y raíces (Saz-Peiró y Tejero-Lainez, 2016).

El uso de *K. daigremontiana* como planta medicinal se ha incrementado específicamente en los tratamientos del cáncer, en donde se ve como una alternativa viable, a las moléculas químicas que produce (Puertas *et al.*, 2014; Majaz *et al.*, 2011). Sin embargo, la extracción y purificación de dichos compuestos, requiere una gran cantidad de material vegetal para obtener cantidades significativas del compuesto de interés (Foley y Moore, 2005). Por lo tanto, es necesario desarrollar un sistema o metodología de cultivo, que garantice una producción sostenible de estos metabolitos (Arias *et al.*, 2009). Esto ha desarrollado alternativas para la obtención de mayores volúmenes de producción, a través de programas de selección y mejoramiento genético (Quintero *et al.*, 2009; Sattler *et al.*, 2016). La utilización de la colchicina ha sido exitosa, demostrando un mayor crecimiento y aumento en la producción de biomasa en diferentes plantas (Urwin, 2014), ya que permite un incremento de sus partes vegetativas ocasionadas por la poliploidía (Sánchez y Matos, 2012; Matos, 2014; Sadat *et al.*, 2017). La colchicina es probablemente, el producto químico más ampliamente utilizado para la inducción de poliploidía en plantas (Urwin, 2014), debido a que es un agente inhibidor eficaz de la mitosis, que impide la

polimerización de la tubulina durante la formación del huso mitótico, lo que causa el bloqueo de la metafase y dispersión de los cromosomas en la célula (Planchais *et al.*, 2000). La ventaja más importante de la poliploidía, es que las plantas suelen tener mejor rendimiento y características morfológicas, como la altura y el tamaño de los órganos vegetales (Hannweg *et al.*, 2016), y el aumento de la biomasa en general (Urwin, 2014).

Para identificar plantas poliploides, se realizan métodos indirectos como caracteres morfológicos (Sánchez y Matos, 2012), métodos citológicos midiendo el tamaño y densidad estomática, el número de cloroplastos en las células guardas de los estomas (Standring *et al.*, 1990; Choque *et al.*, 2007; Orrillo y Bonierbale, 2009; Sadat *et al.*, 2017) y mediante el conteo de cromosomas (Poggio *et al.*, 2008; Matos, 2014). Por lo anterior, teniendo en cuenta la importancia medicinal, y que no se han realizado investigaciones sobre la utilización de la colchicina en *K. daigremontiana*, el siguiente estudio tiene como objetivo evaluar el efecto de diferentes concentraciones, y tiempo de exposición de colchicina sobre la morfología foliar y los estomas de *K. daigremontiana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones del cultivo

Las plántulas (hijuelos) de *Kalanchoe daigremontiana*, se recolectaron de una planta madre, adquirida en el municipio de Villa del Rosario de Norte de Santander (Colombia). Se tomaron 60 hijuelos, con una altura promedio de 1 cm y un sistema radicular desarrollado (Imery y Cequea, 2001). Posteriormente, en cámara oscura las plántulas fueron sometidas a diferentes concentraciones (0,025 y 0,1%: p/v) y tiempos de exposición (24 y 48 h) con colchicina, tomando como control el agua destilada (Tab. 1). Seguidamente, fueron sembrados en bolsas de polietileno de 1 kg en un sustrato compuesto de lombrinaza, cascarilla de arroz y suelo de perfil arcilloso en proporción 1:1:1, bajo condiciones climáticas de la zona, caracterizada por ser un bosque seco tropical a 320 msnm, temperatura promedio de 28,3 °C, humedad relativa del 60% y precipitación promedio anual de 450 mm año⁻¹ (Ramírez, 2007). El estudio se realizó en el laboratorio de fitomejoramiento de la Universidad Francisco de Paula Santander.

Tabla 1. Tratamientos de *Kalanchoe daigremontiana* con diferentes concentraciones y tiempos de exposición con colchicina.

Tratamientos	Concentraciones de colchicina (%)	Tiempo de exposición (h)
T1	0,1	24
T2	0,025	24
T3	Control (H ₂ O)	24
T4	0,1	48
T5	0,025	48
T6	Control (H ₂ O)	48

Estudio morfológico

Para el análisis de la morfología se tuvieron en cuenta las plantas tratadas y los hijuelos que se formaron en los tratamientos. Se calculó el volumen foliar (V) empleando la fórmula empleada por Matos (2014):

$$V = \pi \times LH \times AH \times EH/12 \quad (1)$$

consideraron aspectos como altura de la planta (AP), largo de las hojas (LH), ancho de las hojas (AH), número de hojas (NH), espesor (EH). Las anteriores variables fueron tomadas con una regla milimetrada a excepción del EH, para este se utilizó un calibrador pie de rey. Las mediciones se realizaron cada 15 d, durante 16 semanas después de la siembra. Los hijuelos formados se evaluaron a las 8 semanas.

Características de los estomas

Para las características estomáticas como el ancho, el largo y el número de cloroplasto, se implementó y se modificó la metodología realizada por Ganem *et al.* (2014), donde se utilizó cinta adhesiva transparente, para retirar la epidermis de la zona abaxial de la parte central de la hoja (1 cm² aproximadamente). La cinta se fijó en un porta objeto, posteriormente se colocó la muestra al microscopio compuesto LEICA modelo DME 500 (Leica Microsystems, Buffalo, NY, USA). Al elegir los estomas, se enfocó con el objetivo 100X, esto se repitió 10 veces por accesión. Las fotos obtenidas se analizaron con el *software* Infinity Analyze 6.5 (Release 5.0.3, Lumenera, Ottawa, Canada).

En la determinación del índice estomático (IE), se contó el número de estomas por célula epidérmica

donde el campo de observación contaba con un aumento total de 400X. El IE se calculó utilizando la fórmula implementada por Wilkinson (1979):

$$IE = \frac{NE}{CE + NE} \times 100 \quad (2)$$

donde *NE* es el número de estomas por campo de observación y *CE* número de células epidérmicas en el campo visual. Se hicieron 10 réplicas por tratamiento.

Diseño experimental y análisis estadístico

Consistió en un diseño factorial 3×2 completamente al azar (tres concentraciones y dos tiempos de exposición), con 10 repeticiones por tratamiento, para un total de 60 unidades experimentales. Los datos obtenidos en el análisis morfológico y estomático, se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA). Posteriormente, las medias se compararon utilizando la prueba de rangos múltiples de *HSD* (Diferencia Significativa Honesta) de Tukey, para determinar las diferencias significativas a un nivel de $P \leq 0,05$ (Tukey, 1953). Para el análisis estadístico se utilizó el *software Statgraphic Centurión v. 16.0* (Statpoint, Herndon, VA) y para graficar se implementó el *software KyploT v. 2.0* (Kyence Lab. Tokyo).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio morfológico

De acuerdo a la evaluación de las características morfológicas en *K. daigremontiana*, se encontró variación en los tratamientos implementados (Figs. 1 y 2). En la valoración final (semana 16: Tab. 2), se observó diferencias estadísticamente significativas en el tratamiento con colchicina 0,025% por 24 h (T2) causando un mayor incremento en el largo de la hoja (LH), ancho de la hoja (AH) y volumen foliar (VF), con respecto a los tratamientos control y las demás plantas tratadas, de igual manera el tratamiento 0,025% por 48 h (T5) mostró diferencias significativas en el espesor de la hoja (EH), en la altura de la planta (AP) y número de hijuelos (NHT; Tab. 2; Fig. 2). Del mismo modo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de control (T3, 24 h y T6, 48 h), con medias muy por debajo del resto de los tratamientos en el análisis morfológico (Tab. 2). Es de destacar que solo en los tratamientos 2, 4 y 5

formaron hijuelos en el transcurso de las 16 semanas (Tab. 3 y Fig. 2B). Según lo anterior, los tratamientos T2 y T5 (colchicina 0,025% a 24 y 48 h, respectivamente de exposición) fueron más efectivos, ya que el incremento en la morfología foliar fue más rápido y mayor que los demás tratamientos (Tab. 2 y Figs. 2A, B, C y D). Sin embargo, en los hijuelos del tratamiento 0,025% por 48 h (T5) se encontró mejor desarrollo morfológico y volumen foliar (Tab. 3). Estos resultados difirieron de los encontrados por Sánchez y Matos (2012) y Matos (2014), en donde encontraron que el tratamiento con colchicina 0,10% por 48 h en *Aloe vera* causó incrementos significativos en altura de las plantas (AP), longitud de las hojas (LH) y volumen foliar de los hijuelos. En una investigación realizada por Sadat *et al.* (2017) el tratamiento en el cual se halló mayor altura de la planta en *Trachyspermum ammi* aplicando colchicina, fue al 0,1% durante 6 h. En cuanto a la longitud de la hoja el mejor tratamiento fue de 0,5% por 48 h de colchicina. Además, la aplicación de colchicina generó diferentes tamaños y hojas en las plantas medicinales de *Trachyspermum ammi* y *Tetradenia riparia*, algo similar ocurrió en las hojas de *K. daigremontiana* (Fig. 2D). Según Hannweg *et al.* (2016), la ventaja más importante de la poliploidía inducida es que las plantas obtenidas suelen tener mejor rendimiento y características morfológicas tales como altura, mayor tamaño de hojas, rizoma o raíz. Asimismo, incrementa la biomasa, la capacidad fotosintética, el tamaño de los frutos y semillas (Urwin, 2014). En este estudio, se registraron diferencias altamente significativas en plantas tratadas con colchicina en cuanto a la morfología foliar se pudo apreciar un cambio en las proporciones de las hojas de acuerdo a cada tratamiento esto se puede constatar comparando las medias de variables como largo de hoja (LH) y ancho de la hoja (AH) entre los tratamientos T2 y T5, tomando estos como referencias puesto que presentaron mayor desarrollo (Tabs. 2 y 3; Figs. 1 y 2). Lo anterior representa un indicio muy fuerte de poliploidía (Sadat *et al.*, 2017; Hannweg *et al.*, 2016; Urwin, 2014). Sánchez y Matos (2012), señalaron que en plantas de *A. vera* tratadas con colchicina al 0,05% y 0,10% durante 48 h se logró inducir cambios a nivel morfológico, citogenético y anatómicos. Según Matos (2014), si se expone a mayor tiempo las plantas de *A. vera* con colchicina hasta 48 h, estas inducen cambios morfológicos en las plantas. Debido a que aumenta el número de células meristemáticas en contacto con colchicina, favoreciendo la penetración del alcaloide a las capas celulares durante la actividad mitótica de la misma.

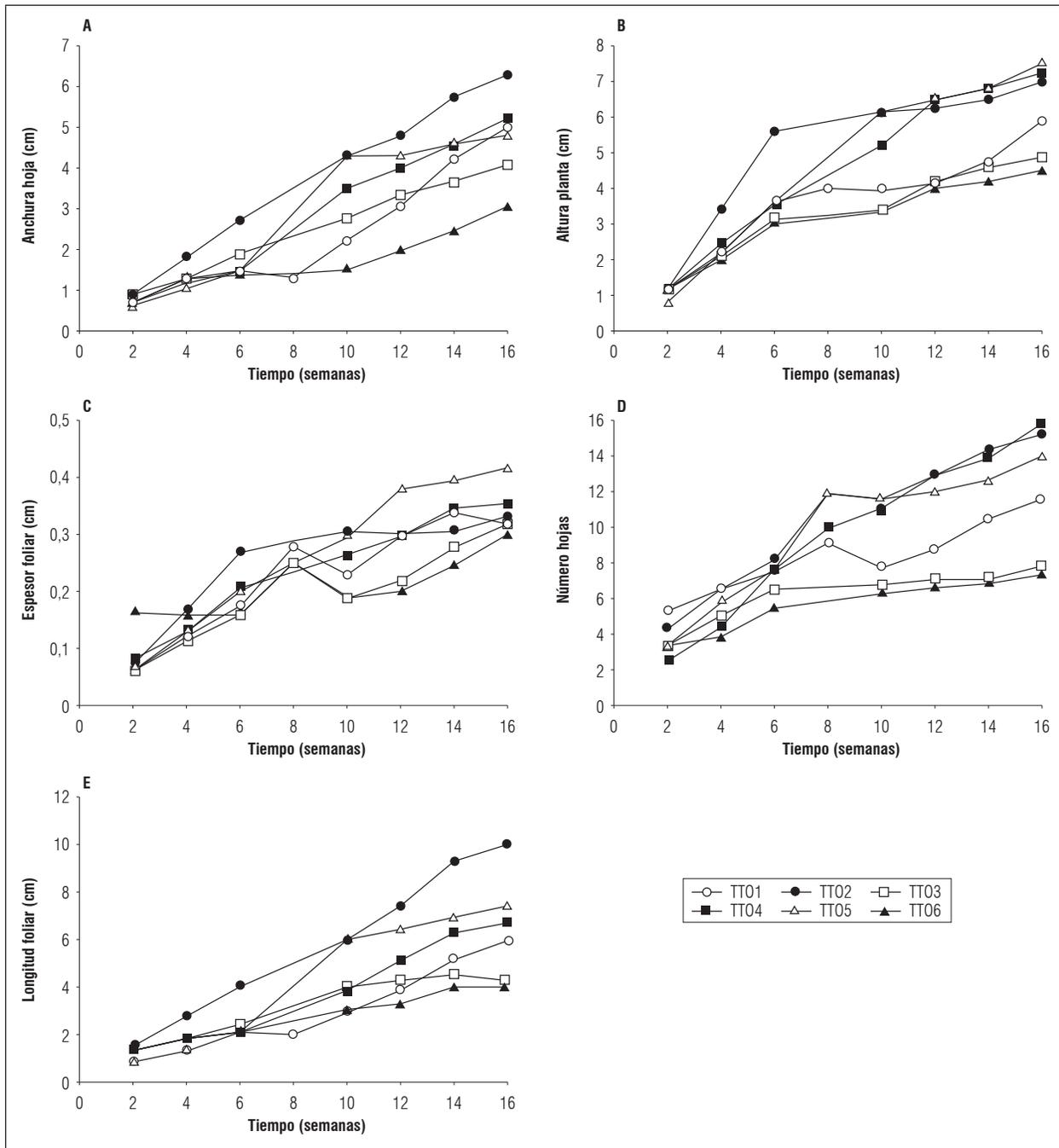


Figura 1. Estudio morfológico de *Kalanchoe daigremontiana*. A. Anchura de la hoja (AH); B. Altura de la planta (AP); C. Espesor foliar (EH); D. Número de hojas (NH); E. Longitud foliar (LH). T1: 0,1% de colchicina por 24 h; T2: 0,025% de colchicina por 24 h; T3: Control (H₂O) por 24 h; T4: 0,1% de colchicina por 48 h; T5: 0,025% de colchicina por 48; T6: Control (H₂O) por 48 h.

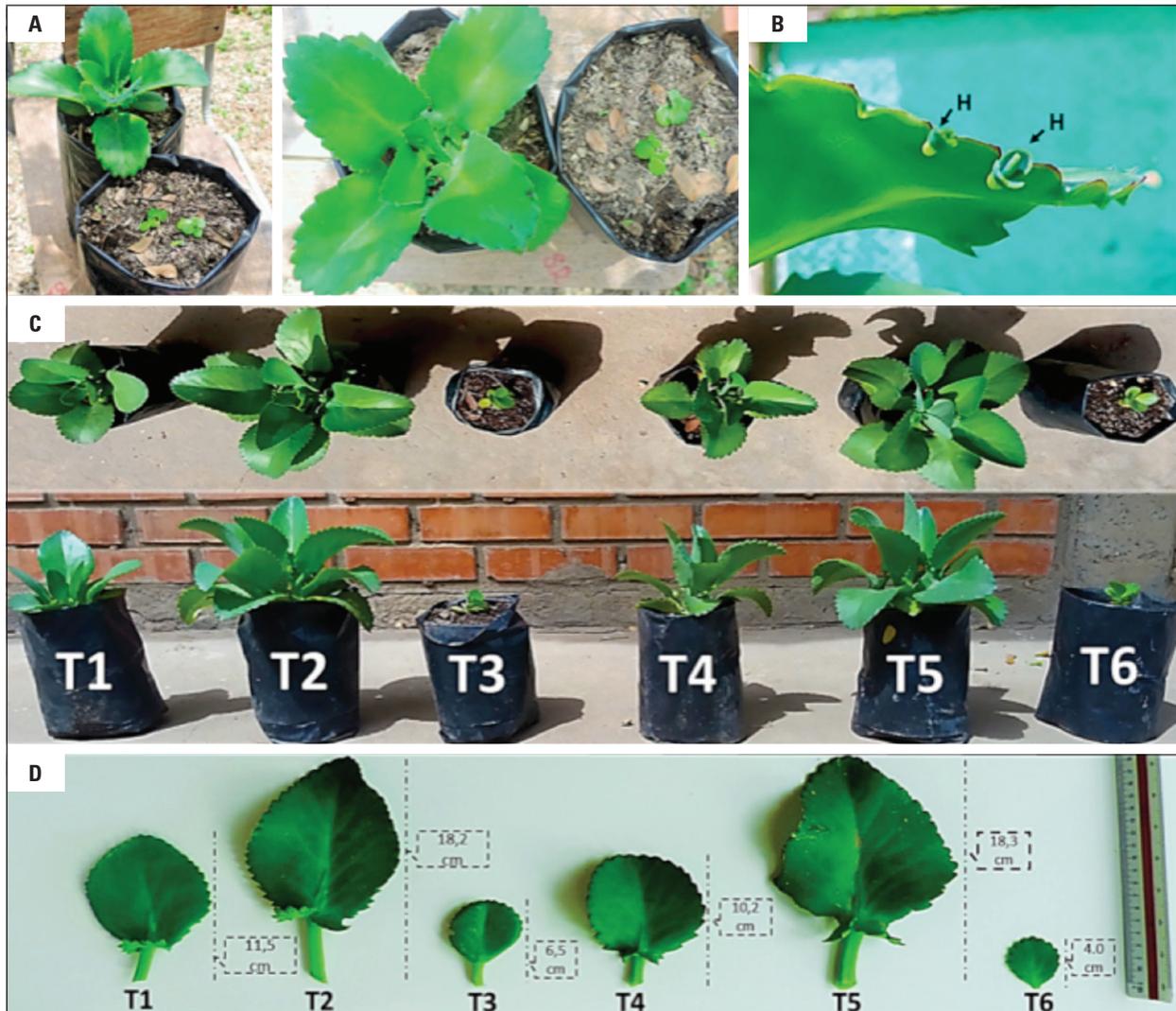


Figura 2. Efecto de la colchicina sobre la morfología foliar de *Kalanchoe daigremontiana*. A. Comparación del T2 con T3 a las 8 semanas; B. Hijuelos formados; C. Comparación de los tratamientos en la semana 16; D. Hojas a las 16 semanas. T1: 0,1% de colchicina por 24 h; T2: 0,025% de colchicina por 24 h; T3: Control (H_2O) por 24 h; T4: 0,1% de colchicina por 48 h; T5: 0,025% de colchicina por 48 h; T6: Control (H_2O) por 48 h.

Tabla 2. Efecto de la colchicina sobre la morfología foliar de *Kalanchoe daigremontiana*. Evaluación realizada a las 16 semanas después de la siembra.

Tratamientos	AP (cm)	NH	LH (cm)	AH (cm)	EH (cm)	VF	NHT
T1: 0,1% colchicina, 24 h	5,9 ab	11,6 b	6,0 ab	4,9 a	0,322 a	2,52 b, c	0
T2: 0,025% colchicina, 24 h	7,0 b	15,4 c	10,1 c	6,3 d	0,33 ab	5,47 e	7
T3: Control (H_2O), 24 h	4,9 a	7,8 a	4,3 a	4,05 ab	0,32 a	1,65 ab	0
T4: 0,1% colchicina, 48 h	7,3 b	16,0 c	6,84 b	5,20 cd	0,36 b	3,37 cd	4
T5: 0,025% colchicina, 48 h	7,5 b	14,0 c	7,4 b	4,8 bc	0,42 c	3,87 d	19
T6: Control (H_2O), 48 h	4,5 a	7,4 a	4,2 a	3,08 a	0,3 a	1,02 a	0

AP: altura de la planta; NH: número de hojas; LH: longitud foliar; AH: anchura de la hoja; EH: espesor foliar; VF: volumen foliar; NHT: número de hijuelos por tratamiento.

Promedios con letras distintas, en cada columna, indican diferencia significativa según la prueba de Tukey HSD ($P \leq 0,05$).

Tabla 3. Efecto de la colchicina sobre la morfología foliar de los hijuelos producidos por *Kalanchoe daigremontiana*. Evaluación realizada a las 8 semanas.

Hijuelos	AP (cm)	NH	LH (cm)	AH (cm)	EH (cm)	VF
HT2	1,30 a	6,5 a	0,97 a	0,87 a	0,45 a	0,09 a
HT4	2,48 a	8,25 a	2,51 b	1,69 a	1,30 b	1,72 a
HT5	5,25 b	12,0 b	3,96 c	2,79 b	2,00 b	5,79 b

HT2: hijuelos del tratamiento con 0,025% de colchicina por 24 h; HT4: hijuelos del tratamiento con 0,1% de colchicina por 48 h; HT5: hijuelos del tratamiento con 0,025% de colchicina por 48 h.

Abreviaturas de las variables como en tabla 2.

Promedios con letras distintas, en cada columna, indican diferencia significativa según la prueba de Tukey HSD ($P \leq 0,05$).

Características de los estomas

En las características estomáticas la concentración de colchicina de 0,025% y 0,10%, en los tiempos de exposición (24 y 48 h), tuvieron un aumento en el tamaño de los estomas (largo y ancho), la cantidad de cloroplastos y en las células guardas de los estomas (Figs. 3 y 4; Tab. 4).

Estos resultados coinciden con los observados por Sadat *et al.* (2017) y Tambong *et al.* (1998) en donde mostraron coeficientes de correlación positivos y significativos, entre el largo y ancho de los estomas y el número de cloroplastos en las células guardas de los estomas. La morfología de los estomas es determinante para controlar la pérdida de agua, lo que posibilita la adaptación de muchas especies vegetales a condiciones ambientales muy diversas (Hetherington y Woodward, 2003). La modificación de las características de los estomas podría ejercer una tarea sustancial en el proceso de aclimatación de una especie al ambiente. Investigaciones anteriores en plantas tetraploides inducidas con colchicina, se ha observado repetidamente que el largo y ancho, como el número de estomas y el número de cloroplastos existentes dentro de las células guardas, cambian significativamente en caso de duplicación del cromosoma, en comparación con el estado diploide (Beck *et al.*, 2003; Urwin *et al.*, 2007). Los cloroplastos son organelos donde se realiza el proceso de la fotosíntesis, por tanto, a mayor número de estos es probable que haya una mayor actividad fotosintética en la planta, sintetizando mayor contenido de materia orgánica (Gordillo *et al.*, 2008). Sadat *et al.* (2017) en una comparación de las características de los estomas en plantas tetraploides y diploides de *Trachyspermum ammi*, mostraron el aumento del largo y ancho de los estomas en plantas tetraploides inducidas con colchicina, en contraste con sus pariente diploides. Igualmente, Zhang *et al.* (2008), encontraron

un mayor número de estomas en plantas tetraploides que en diploides en *Phlox subulata*. En otro estudio, Aryavand *et al.* (2003) concluyeron que el tamaño y el número de los estomas pueden utilizarse para distinguir las plantas tetraploides de las hexaploides en *Aegilops neglecta*. En otras especies, como *Vitis vinifera*, *Triticum monococcum*, *Triticum durum* y *Triticum aestivum* se obtuvieron diferencias significativas en las características estomáticas en plantas poliploides y diploides (Yang *et al.*, 2006; Khazaei *et al.*, 2010).

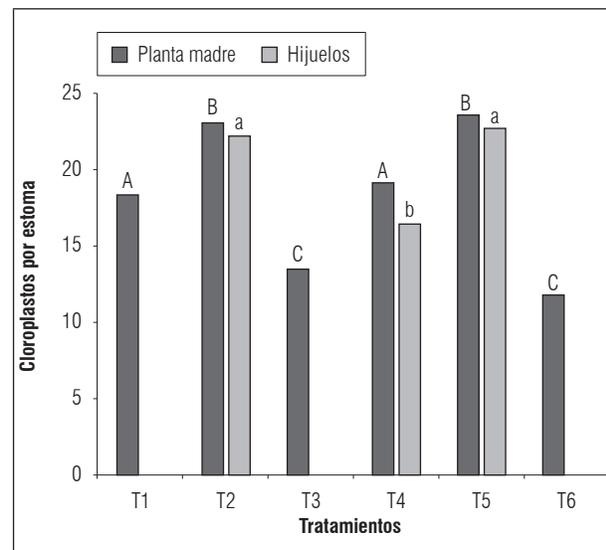


Figura 4. Número de cloroplastos por estoma en *Kalanchoe daigremontiana* tratadas con colchicina a diferentes concentraciones y tiempos de exposición. T1: 0,1% de colchicina por 24 h; T2: 0,025% de colchicina por 24 h; T3: Control (H_2O) por 24 h; T4: 0,1% de colchicina por 48 h; T5: 0,025% de colchicina por 48 h; T6: Control (H_2O) por 48 h. Promedios con letras distintas, para cada planta madre e hijuelos independientes, indican diferencia significativa según la prueba de Tukey HSD ($P \leq 0,05$).

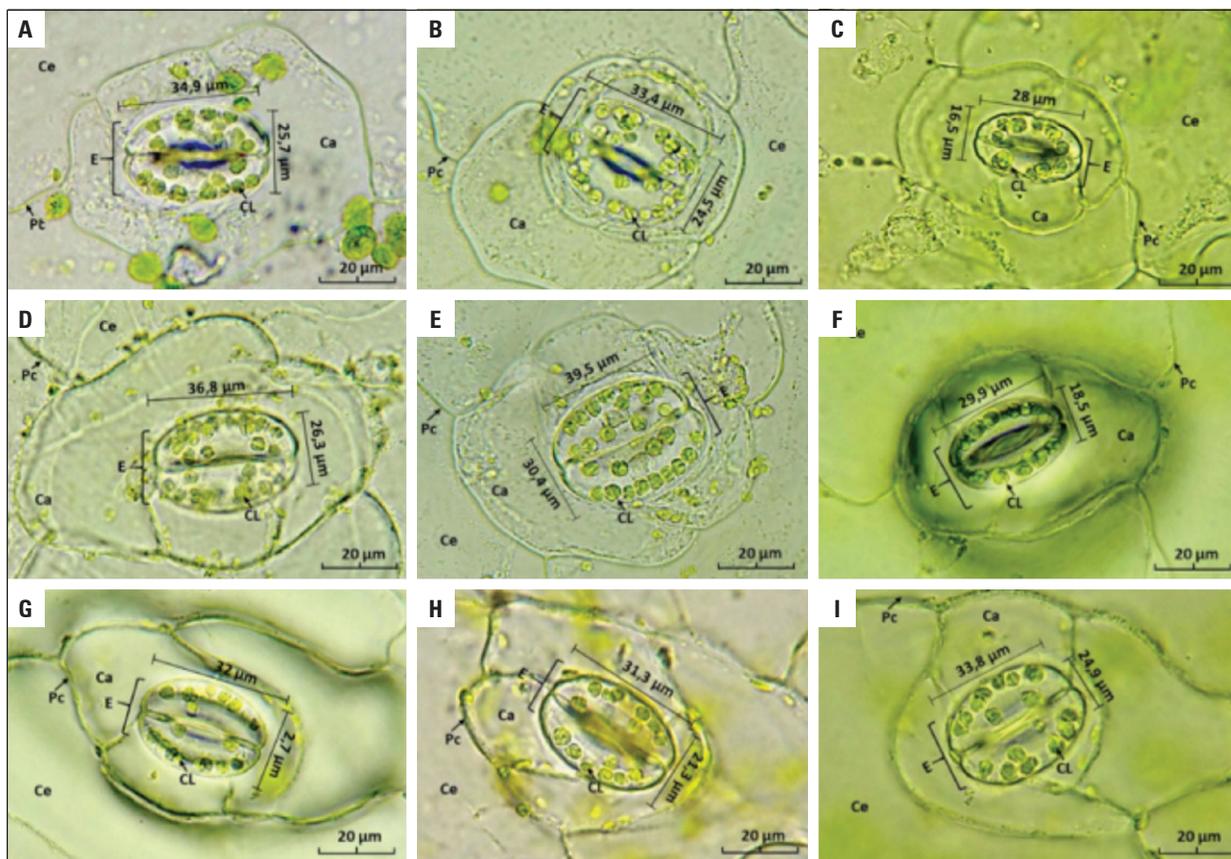


Figura 3. Características de los estomas anisocíticos de la epidermis abaxial de la lámina foliar de *Kalanchoe daigremontiana*. Los tratamientos correspondieron a T1: 0,1% de colchicina por 24 h; T2: 0,025% de colchicina por 24 h; T3: Control (H₂O) por 24 h; T4: 0,1% de colchicina por 48 h; T5: 0,025% de colchicina por 48 h; T6: Control (H₂O) por 48 h. A. Estoma del T1 con 20 cloroplastos (CL); B. Estoma del T2 con 30 CL; C. Estoma del T3 con 10 CL; D. Estoma del T4 con 25 CL; E. Estoma del T5 con 27 CL; F. Estoma del T6 con 11 CL; G. Estoma del hijuelo del tratamiento 2 (HT2) con 18 CL; H. Estoma del HT4 con 15 CL; I. Estoma del HT5 con 17 CL. Ca: célula acompañante; Ce: célula epidérmica; CL: cloroplasto; E: estoma; Pc: pared celular. Aumento total 1.000x. Escala de la barra = 20 μm.

Tabla 4. Características estomáticas de *Kalanchoe daigremontiana* tratadas con colchicina.

Tratamientos	Índice estomático	Largo de estomas (μm)	Ancho de estomas (μm)
T1: 0,1% colchicina, 24 h	22,5 ac	34,9 ac	25,7 ac
T2: 0,025% colchicina, 24 h	22,1 ac	33,4 a	24,5 ac
T3: Control (H ₂ O), 24 h	11,8 b	28 b	16,5 b
T4: 0,1% colchicina, 48 h	19,946 a	36,8 c	26,3 c
T5: 0,025%, colchicina, 48 h	21,652 a	39,5 e	30,4 d
T6: Control (H ₂ O), 48 h	11,78 b	29,9 bd	18,5 bd
HT2: Hijuelos T2	32,402 d	32 d	22,7 ae
HT4: Hijuelos T4	22,148 ac	31,3 d	21,3 de
HT5: Hijuelos T5	28,37 cd	33,8 a	24,9 ac

Promedios con letras distintas, en cada columna, indican diferencia significativa según la prueba de Tukey HSD ($P \leq 0,05$).

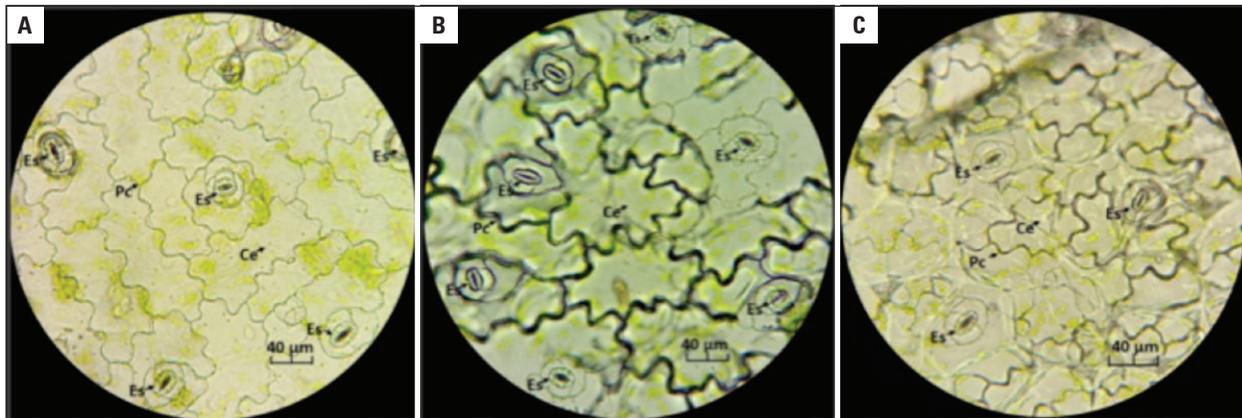


Figura 5. Epidermis abaxial de la lámina foliar de *Kalanchoe daigremontiana* tratada con colchicina. A. Índice estomático a 0,1% de colchicina por 24 h (T1); B. Índice estomático a 0,025% de colchicina por 24 h (T2); C. Índice estomático del control (H2O) por 24 h (T3). Aumento total 400x. Escala de la barra = 40 µm. Ce: célula epidérmica; Es: Estomas; Pc: pared celular.

En el T5 y T2 se hallaron la mayor cantidad de cloroplastos, con una media de 23,6 y 23,0 cloroplastos, respectivamente (Figs. 3 y 4). A diferencia, en los tratamientos control, el cual se observó la menor cantidad de cloroplastos (T3: 13,5 y T6: 11,5). Respecto a los hijuelos de los tratamientos T2 y T5, no presentaron diferencias significativas (HT2: 22,3 y HT5: 22,8). Standring (1990), planteó que el uso de variaciones en el número de cloroplastos de las células oclusivas del estoma, es una manera segura de predecir el nivel de ploidía en algunos o diferentes géneros. Se debe agregar que las modificaciones de los niveles de ploidía presentan una relación con los cloroplastos; si se modifica el número de juegos de cromosomas, estos pueden modificar la cantidad de cloroplastos que presentan las células guardas de los estomas (Orrillo y Bonierbale, 2009).

Con respecto al índice estomático, se observó en el campo visual que los tratamientos T1 y T2 (Figs. 5A y B), una menor cantidad de células epidérmicas dándose un aumento en el número de estomas, posiblemente al aumento en el largo y ancho del estoma. A diferencia del T3 (Fig. 5C) en la cual existe una mayor cantidad de células epidérmicas, con menor número de estomas. Estos hallazgos difirieron de los encontrados por Sadat *et al.* (2017), en cuanto a la densidad estomática, ya que los investigadores demostraron una disminución en el número de estomas por campo visual para plantas tetraploides con respecto a las plantas diploides de *Trachyspermum ammi*. Según Foschi *et al.* (2013) es posible determinar el nivel de ploidía, a través del tamaño y densidad de los estomas, siendo la medición estomática un aspecto muy importante

para determinar los diferentes niveles de ploidía en la mayoría de las especies.

CONCLUSIONES

La aplicación de colchicina a *Kalanchoe daigremontiana* al 0,025% por 24 y 48 h (tratamientos T2 y T5), mejora los rasgos morfológicos como altura de la planta, largo, ancho, y número hojas, espesor y volumen foliar y las características estomáticas. Lo que demuestra que el uso de la colchicina favorece el crecimiento en poco tiempo y aumenta la biomasa en la planta *K. daigremontiana*. Es importante comparar el análisis morfológico y estomático con el conteo de cromosomas y el análisis de citometría de flujo, para determinar el nivel de ploidía (Sadat *et al.*, 2017). Por tal motivo, se plantea la necesidad de realizar estudios adicionales en donde se pueda determinar específicamente el nivel de ploidía en la planta medicinal de *K. daigremontiana*.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Francisco de Paula Santander por su valiosa colaboración. A Margarita Caballero y Virginia Ramírez por su asistencia técnica. A Daniela Gómez Rodríguez y Paola Gómez Rodríguez por su apreciable colaboración.

Conflicto de intereses: el manuscrito fue preparado y revisado con la participación de los autores, quienes declaran no tener algún conflicto de interés que

coloquen en riesgo la validez de los resultados aquí presentados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Raouf, H.S. 2012. Anatomical traits of some species of *Kalanchoe* (Crassulaceae) and their taxonomic value. *Ann. Agric. Sci.* 57(1), 73-79. Doi: 10.1016/j.aos.2012.03.002
- Aria, M., M. Angarita, A. Aguirre, J. Restrepo y C. Montoya. 2009. Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín* 62(1), 4881-4895.
- Aryavand, A., B. Ehdai, B. Tran, J.G. Waines. 2003. Stomatal frequency and size differentiate ploidy levels in *Aegilops neglecta*. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 50, 175-182. Doi: 10.1023/A:1022941532372
- Beck, S.L., R.W. Dunlop y A. Fossey, 2003. Stomatal length and frequency as a measure of ploidy level in black wattle, *Acacia mearnsii* (de Wild). *Bot. J. Linn. Soc.* 141, 177-181. Doi: 10.1046/j.1095-8339.2003.00132.x
- Choque, E., R. Espinoza, X. Cadima, J. Zeballos y J. Gabriel. 2007. Resistencia a helada en germoplasma de papa nativa de Bolivia. *Rev. Latinoam. Papa* 14(1), 24-32.
- Foley, W. y B. Moore. 2005. Plant secondary metabolites and vertebrate herbivores-from physiological regulation to ecosystem function. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 8(4), 430-435. Doi: 10.1016/j.pbi.2005.05.009
- Foschi, M., L. Martínez, M. Ponce, C. Galmarini y B. Bohanec. 2013. Effect of colchicine and amiprofos-methyl on the production of *in vitro* doubled haploid onion plants and correlation assessment between ploidy level and stomatal size. *Rev. Fac. Cienc. Agrar.* 45(2), 155-164.
- Ganem, D., M. Equiza, M. Lorenzo y J. Tognetti. 2014. Cambios en la anatomía epidérmica foliar de cereales de clima templado en respuesta al frío. *Rev. Fac. Agron. Univ. Nac. La Plata* 113(2), 157-164.
- Garcês, H., C. Champagne, B. Townsley, S. Park, R. Malhó, M. Pedroso, J. Harada y N. Sinha. 2007. Evolution of asexual reproduction in leaves of the genus *Kalanchoë*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104(39), 15578-15583. Doi: 10.1073/pnas.0704105104
- Gordillo, F., F. Zárate, C. Mejía, L. Rivera y H. Calderón. 2008. Análisis de la actividad fotosintética de plantas de café utilizando la técnica fotoacústica. *Rev. Colomb. Física* 40(1), 186-189.
- Hannweg, K., G. Visser, K. Jager y I. Bertling. 2016. *In vitro*-induced polyploidy and its effect on horticultural characteristics, essential oil composition and bioactivity of *Tetradenia riparia*. *S. Afr. J. Bot.* 106, 186-191. Doi: 10.1016/j.sajb.2016.07.013
- Herrera, I., N. Chacón, S. Flores, D. Benzo, J. Martínez, B. García y J. Hernández-Rojas. 2011. La planta exótica *Kalanchoe daigremontiana* incrementa el reservorio y flujo de carbono en el suelo. *Interciencia* 36(12), 937-942.
- Hetherington, A. y F. Woodward. 2003. The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* 424, 901-908. Doi: 10.1038/nature01843
- Imery, J.H. y H. Cequea. 2001. Colchicine-induce autotetraploid in *Aloe vera* L. *Cytologia* 66, 409-413. Doi: 10.1508/cytologia.66.409
- Khazaei, H., P. Monneveux, S. Hongbo y S. Mohammady. 2010. Variation for stomatal characteristics and water use efficiency among diploid, tetraploid and hexaploid Iranian wheat landraces. *Genet. Resour. Crop Evol.* 57, 307-314. Doi: 10.1007/s10722-009-9471-x
- Kolodziejczyk-Czepas, J., M. Sieradzka, B. Moniuszko-Szajwal, L. Peciob, M. Ponczek, P. Nowak y A. Stochmal. 2017. Bufadienolides from *Kalanchoe daigremontiana* as thrombin inhibitors: *In vitro* and *in silico* study. *Int. J. Biol. Macromol.* 99, 141-150. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.02.051
- Majaz, Q., S. Nazim, S. Afsar, S. Siraj y P. Siddik. 2011. Evaluation of antimicrobial activity of roots of *Kalanchoe pinnata*. *Int. J. Pharmacol. Bio. Sci.* 5(1), 93-96.
- Matos, Á. 2014. Efecto de diferentes concentraciones y tiempos de exposición de la colchicina en plantas de zábila [*Aloe vera* (L.) Burm. f.] *in vivo*. *Multiciencias* 14(4), 382-388.
- Mora-Pérez, A. y M.R. Hernández-Medel. 2016. Actividad anticonvulsivante del extracto metanólico de tallo y raíz de *Kalanchoe pinnata* Lam. en ratones: comparación con diazepam. *Neurología* 31(3), 161-168. Doi: 10.1016/j.nrl.2015.06.008
- Okwu, D.E. y F.U. Nnamdi. 2011. Two novel flavonoids from *Bryophyllum pinnatum* and their antimicrobial activity. *J. Chem. Pharm. Res.* 3(2), 1-10.
- Orrillo, M. y M. Bonierbale. 2009. Manual técnico biología reproductiva y citogenética de la papa. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú.
- Planchais, S., N. Glab, D. Inzé y C. Bergounioux. 2000. Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. *FEBS Letters* 476(1-2), 78-83. Doi: 10.1016/S0014-5793(00)01675-6
- Poggio, L., S.M. Espert y R. Fortunato. 2008. Citogenética evolutiva en leguminosas americanas. *Rodriguésia* 59(3), 423-433.
- Puertas, M., J. Tobón y V. Arango. 2014. *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet. & H. y su potencial uso como fuente de antioxidantes y colorantes naturales. *Rev. Cubana Plant. Med.* 19(1), 61-68.
- Quintero, M., R. Behar, C. García, D. Pupo, M. Hernández, J. Díaz y F. Pérez. 2009. *Aloe gel viscoso*® en el tratamiento de pacientes con úlcera duodenal y *Helicobacter pylori* positivo. *Rev. Cubana Plant. Med.* 14(4), 1-6.

- Ramírez L., Y.A. 2007. Cúcuta. pp. 135-155. En: Hermelín, M. (ed.). Entorno natural de 17 ciudades de Colombia. Ediciones Universidad EAFIT, Medellín, Colombia.
- Sadat, S., M. Norouzi, G. Karimzadeh, K. Shirkooy y M. Niazian. 2017. Effect of colchicine-induced polyploidy on morphological characteristics and essential oil composition of ajowan (*Trachyspermum ammi* L.). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 130, 543-551. Doi: 10.1007/s11240-017-1245-0
- Salahdeen, H.M. y O.K. Yemitan. 2006. Neuropharmacological effects of aqueous leaf extract of *Bryophyllum pinnatum* in mice. *Afr. J. Biomed. Res.* 9. 101-107. Doi: 10.4314/ajbr.v9i2.48782
- Sánchez, A. y Á. Matos. 2012. Efectos del uso de la colchicina como inductor de poliploidía en plantas de zábila (*Aloe vera* L.) *in vivo*. *Rev. Univ. Zulia* 3(6), 119-139.
- Sattler, M., C. Carvalho y W. Clarindo. 2016. The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta* 243(2), 281-296. Doi: 10.1007/s00425-015-2450-x
- Saz-Peiró, P. y M.C. Tejero-Lainez. 2016. Fitoterapia en la prevención y tratamiento del cáncer. *Medicina Naturalista* 10(2), 88-99.
- Standring, L., G. Pringle y B. Murray. 1990. The control of chloroplast number in *Solanum muricatum* Ait. and *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. and its value as an indicator of polyploidy. *Euphytica* 47(1), 71-77. Doi: 10.1007/BF00040366
- Tambong, J., V. Sapra y S. Garton. 1998. *In vitro* induction of tetraploids in colchicine-treated cocoyam plantlets. *Euphytica* 104, 191-197. Doi: 10.1023/A:1018609020397
- Tkalec, M., D. Car, J. Gospočić, I. Križaić, K. Duž y Ž. Vidaković-Cifrek. 2012. Response of *Kalanchoe daigremontiana* to wounding and infection with *Agrobacterium tumefaciens*. *Period. Biol.* 114(1), 83-90.
- Tukey, J.W. 1953. The problem of multiple comparisons. pp. 1-300. En: Braun, H.L. (ed.). The collected works of John W. Tukey. Vol. 8. Multiple comparisons: 1948-1983. Chapman and Hall, New York, NY, USA.
- Urwin, N.A.R. 2014. Generation and characterisation of colchicine-induced polyploid *Lavandula* × *intermedia*. *Euphytica* 197(3), 331-339. Doi: 10.1007/s10681-014-1069-5
- Urwin, N.A.R., J. Horsnell y T. Moon. 2007. Generation and characterisation of colchicine-induced autotetraploid *Lavandula angustifolia*. *Euphytica* 156, 257-266. Doi: 10.1007/s10681-007-9373-y
- Wilkinson, H. 1979. The plant superface (mainly leaf). pp. 97-165. En: Metcalfe, C.R. y L. Chalk (eds.). Anatomy of dicotyledons. Clarendon Press, Oxford, UK.
- Yang, X.M., Z.Y. Cao, L.Z. An, Y.M. Wang y X.W. Fang. 2006. *In vitro* tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Euphytica* 152, 217-224. Doi: 10.1007/s10681-006-9203-7
- Zhang, Z., H. Dai, M. Xiao y X. Liu. 2008. *In vitro* induction of tetraploids in *Phlox subulata* L. *Euphytica* 159, 59-65. Doi: 10.1007/s10681-007-9457-8