



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**

**Análisis citogenético y estomático  
para determinar los niveles  
de ploidía en camote de cerro  
(*Dioscorea* spp.)**

**Tesis  
que para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias en Biosistemática y Manejo  
de Recursos Naturales y Agrícolas**

**Presenta  
José Juvencio Castañeda Nava**

**Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba  
Director**

**Dr. Rodrigo Barba González  
Co-Director**

**Zapopan, Jalisco**

**12 de junio de 2012**

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la oportunidad de vivir.

A mi mamá, Aurora Nava por darme la vida y guiar mis primeros pasos.

A mi papá, Juvencio Castañeda por ser mi primer maestro.

A mis hermanos y sobrinos por ser una gran familia que hemos crecido juntos.

A Susana por ser mi compañera de de vida.

A Emmanuel por ser una gran luz en mi vida.

Al Dr. Fernando por su paciencia y dedicación a este trabajo.

Al Dr. Rodrigo por su enseñanza en el área de citogenética.

Al Dr. José de Jesús por su apoyo y tiempo dedicado a enriquecer este trabajo.

Al Dr. Lino por su apoyo y tiempo dedicado a enriquecer este trabajo.

Al Dr. Ángel Kato por su aporte de conocimientos en el área de citogenética y la realización de la estancia académica.

A mis compañeros de generación, Conchita, Gaby y Oscar.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo de beca durante los estudios de Maestría en Ciencias, a José Juvenio Castañeda Nava (Número de becario 57323).

# ÍNDICE

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Descripción del género <i>Dioscorea</i>	3
2.2. Distribución del género <i>Dioscorea</i> en el mundo	3
2.3. Usos y producción del género <i>Dioscorea</i>	5
2.4. Origen de los organismos poliploides	5
2.5. Citogenética	6
2.5.1 División celular	6
2.5.2. Inhibidores del huso acromático	8
2.5.3. Observación de los cromosomas	9
2.5.4. Preparaciones citogenéticas de meristemos de raíz y hojas jóvenes	9
2.5.5. Preparaciones citogenéticas de anteras florales	10
2.5.6. Técnicas para el análisis citogenético	10

2.6. Descripción citogenética del género <i>Dioscorea</i>	12
2.7. Relación de ploidía con cambios estructurales en la planta	14
2.7.1. Estomas	14
2.7.2. Relación de ploidía y características de los estomas	15
2.7.3. Densidad estomática de <i>Dioscorea</i>	16
3. HIPÓTESIS	17
4. OBJETIVOS	17
4.1. Objetivo general	17
4.2. Objetivos particulares	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS	18
5.1. Material vegetativo	18
5.2. Preparaciones citogenéticas	19
5.3. Densidad de estomas	20
5.4. Número de cloroplastos en los estomas	21
5.5. Tamaño de los estomas	21
5.6. Medición de las hojas	21
5.7. Índice de productividad	22
5.8. Variables y análisis estadístico	23
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25

6.1. Protocolo para preparaciones citogenéticas	25
6.2. Nivel de ploidía en las accesiones de 11 localidades de Jalisco	25
6.3. Análisis de varianza y comparaciones de medias entre localidades	28
6.4. Análisis de varianza, comparación de medias y correlaciones de los niveles de ploidía	42
6.5. Análisis de varianza y comparación múltiple entre especies	49
6.6. Análisis de las características de los estomas	50
6.7. Análisis de la hoja	52
6.8. Análisis de los tubérculos	54
6.9. Modelo matemático del área de la hoja	58
7. CONCLUSIONES	62
8. LITERATURA CITADA	63
APÉNDICE	70

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Número de accesiones por localidad	19
Cuadro 2. Niveles de ploidía de diferentes accesiones de <i>Dioscorea</i> presentes en las 11 localidades del estado de Jalisco	27
Cuadro 3. Cuadrados medios del análisis de varianza de localidades, especies y niveles de ploidía.	30
Cuadro 4. Análisis de varianza del índice de productividad entre localidades.	31
Cuadro 5. Comparación de medias del índice de productividad entre las localidades del Estado de Jalisco.	33
Cuadro 6. Análisis de varianza del ancho de los estomas entre las localidades	34
Cuadro 7. Comparación de medias del ancho de los estomas entre localidades.	36
Cuadro 8. Análisis de varianza para largo de los estomas entre localidades.	37
Cuadro 9. Comparación de medias del largo de los estomas entre localidades.	38
Cuadro 10. Análisis de varianza de la densidad de estomas entre localidades.	39
Cuadro 11. Comparación de medias de la densidad de estomas entre localidades.	40
Cuadro 12. Análisis de varianza del número de cloroplastos en los estomas entre localidades.	41
Cuadro 13. Comparación de medias del número de cloroplastos en los estomas entre las localidades.	42
Cuadro 14. Análisis de varianza del nivel de ploidía entre las localidades.	43
Cuadro 15. Comparación de medias para ploidía entre las localidades.	44

Cuadro 16. Análisis de varianza del número de cloroplastos en los estomas entre los niveles de ploidía.	45
Cuadro 17. Comparación de medias del número de cloroplastos en los estomas entre los niveles de ploidía.	45
Cuadro 18. Análisis de varianza del ancho de estomas entre los niveles de ploidía.	46
Cuadro 19. Comparación de medias del ancho de los estomas entre los niveles de ploidía.	46
Cuadro 20. Correlación de la ploidía con el peso de cosecha, índice de productividad, ancho de la hoja, largo de la hoja, área de la hoja, densidad de estomas, cloroplastos en los estomas, ancho de estomas y largo de estomas.	48
Cuadro 21. Análisis de varianza del número de cloroplastos en los estomas entre especies.	49
Cuadro 22. Comparación de medias del número de cloroplastos en los estomas entre especies.	50
Cuadro 23. Correlación de la densidad de estomas con el peso de la cosecha, índice de productividad, ploidía, ancho de la hoja, largo de la hoja, área de la hoja, cloroplastos en los estomas, ancho de estomas y largo de estomas.	51
Cuadro 24. Correlación del ancho de la hoja con el peso de la cosecha, ploidía, densidad de estomas, cloroplastos en los estomas, ancho de estomas y largo de estomas.	52
Cuadro 25. Correlación del largo de la hoja con el peso de la cosecha, ploidía, densidad de estomas, cloroplastos en los estomas, ancho de estomas y largo de estomas.	53



Cuadro 26. Correlación del área de la hoja con el peso de la cosecha, ploidía, densidad de estomas, cloroplastos en los estomas, ancho de estomas y largo de estomas.	54
Cuadro 27. Correlación del peso de siembra del tubérculo con el peso de cosecha e índice de productividad.	55
Cuadro 28. Correlación del peso de cosecha del tubérculo con el índice de productividad, ploidía, ancho de la hoja, largo de la hoja, área de la hoja, densidad de estomas, cloroplastos en los estomas, ancho de estomas y largo de estomas.	56
Cuadro 29. Correlación del índice de productividad del tubérculo con la ploidía, ancho de la hoja, largo de la hoja, área de la hoja, densidad de estomas, cloroplastos en los estomas, ancho de estomas y largo de estomas.	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución del género <i>Dioscorea</i> en México	4
Figura 2. Cromosomas, estomas y hojas de <i>Dioscorea</i> spp. diploide.	26
Figura 3. Hojas, cromosomas y estomas de <i>Dioscorea</i> spp. hexaploides.	29
Figura 4. Hojas, cromosomas y estomas de <i>Dioscorea</i> spp triploide.	32
Figura 5. Hojas, cromosomas y estomas de <i>Dioscorea</i> spp tetraploide.	35
Figura 6. Variación del tipo de hojas en <i>D. remotiflora</i> y <i>D. sparsiflora</i> .	61

## RESUMEN

El camote de cerro (*Dioscorea* spp.) es de gran importancia en las zonas rurales como fuente de alimento y de ingresos económicos, en la industria farmacéutica es utilizado para la síntesis de esteroides. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar niveles de ploidía en 100 accesiones de *Dioscorea* spp. provenientes de diferentes localidades del estado de Jalisco, mediante la caracterización citogenética y estomática. La metodología empleada para las preparaciones citogenéticas fue: se colectaron puntas de raíz entre las 7:00 y 9:00 h y se colocaron en una solución 2mM de 8-hidroxiquinoleína como inhibidor mitótico, a temperatura de 4 °C, para la fijación se utilizó la solución alcohol acético 3:1 y se tiñeron los cromosomas con aceto-orceína. Para la densidad estomática y número de cloroplastos en las células guardas de los estomas, se utilizaron cuatro hojas por accesión, la epidermis se tiñó con una gota de lugol (KI), se realizaron cinco observaciones por hoja. El tamaño de los estomas fue definido utilizando 10 hojas por accesión, de cada una se tomaron dos fotos de estomas dando un total de 20 estomas por accesión, los cuales se midieron con el programa AxioVision. La determinación del ancho, largo y área de hoja se llevó a cabo utilizando 10 hojas por accesión, se digitalizaron con un escáner, para su posterior análisis en el programa Adobe Acrobat 8 Professional. Se encontraron diferencias en los niveles de ploidía, existiendo: diploides, triploides, tetraploides y hexaploides. Se determinó entre las accesiones que provienen de diferentes localidades (localidades), que existen diferencias significativas para el índice de producción, ploidía, largo, ancho y número de cloroplastos en los estomas y la densidad de estomas. Las especies fueron significativas para el número de cloroplastos presentes en las células guardas de los estomas. El nivel de ploidía guarda una relación con el número de cloroplastos en los estomas y el ancho de los estomas. La cantidad de tubérculo plantado presentó diferencias significativas con el índice de productividad, de igual manera con el peso del tubérculo de la cosecha. Se observó que tanto el largo, ancho y área de las hojas presentan correlación con el largo y ancho de los estomas y únicamente el ancho de las hojas guarda una relación con el peso del tubérculo de la cosecha. Los promedios de densidades estomáticas que presentan las poblaciones de estudio se encuentran entre 15.75 y 68.4 estomas/campo visual 40X; y los cloroplastos en las células guardas entre 8.15 y 17.25 cloroplastos/estoma. Se

generó un modelo matemático para determinar el área de la hojas utilizando solamente el tipo de hoja, más su largo y ancho.

## ABSTRACT

The camote de cerro (*Dioscorea* spp.) is a tuber of great importance in rural areas as a source of food and income. In the pharmaceutical industry is used for the synthesis of steroids. This study aimed to determine ploidy levels in 100 accessions of *Dioscorea* spp. from different locations from Jalisco, by cytogenetic and stomatal characterization. In order to get the cytogenetic preparations, the root tips were collected between 7:00 and 9:00 A.M. and placed in a 2 mM of 8-hydroxyquinoline solution as a mitotic inhibitor, at 4 °C. We used alcohol-acetic as fixing solution and aceto-orcein to stain chromosomes. For stomatal density and number of chloroplasts in guard cells of stomata, we used four leaves per accession. The epidermis was stained with a drop of iodine (KI), five observations were taken per leaf. Stomatal size was defined using 10 leaves per accession. Two pictures of stomata were taken for each leaf (20 stomata per accession), and were measured with AxioVision software. Determination of the width, length and leaf area were carried out using 10 leaves per accession. These leaves were digitalized with a scanner for further analysis in Adobe Acrobat 8 Professional. We found some differences in ploidy levels (diploid, triploid, tetraploid and hexaploid). It was determined that among accessions from different locations there are significant differences for production index, ploidy, length, width and number of chloroplasts in stomata and stomatal density. The species were significant for number of chloroplasts present in guard cells of stomata. Ploidy level is related with number of chloroplasts in stomata and width stomata. Number of planted tuber showed significant differences with index of productivity and weight of the tuber crop. It was observed that the length, width and leaves area showed correlation with length and width of stomata, and only width leaves corresponds to half the weight of the tuber crop. The stomatal densities means were between 15.75 and 68.4 stomata / field of view 40X, and chloroplasts in guard cells between 8.15 and 17.25 chloroplast / stoma. A mathematical model was generated to determine the leaf area using only length, width and leaf type.

# 1. INTRODUCCIÓN

Al paso de la evolución del hombre, este ha dependido de los recursos naturales, en la cacería y la recolección de frutos, raíces y tubérculos, al domesticar especies de animales y vegetales para su utilización, el hombre dio paso a una nueva era. Actualmente, existen muchos cultivos entre los que destacan algunos cereales y tubérculos que son esenciales para la alimentación. Existen especies de plantas silvestres que pueden ser alternativas de cultivo como es el camote del cerro (*Dioscorea* spp.), que en México no se ha explotado como cultivo, a pesar de que puede ser una fuente de energía por presentar carbohidratos, también presenta proteínas, aminoácidos esenciales y muy buena fuente de minerales que permitan tener una dieta más completa. La familia Dioscoreaceae, a la que pertenece *Dioscorea* es exclusiva de zonas tropicales, es una planta trepadora con un tallo rizomatoso subterráneo con tendencias a mantenerse perenne; hojas opuestas en la base de los tallos y alternas en la parte superior de la planta (León 1987). En el mundo se producen 11'781,425 toneladas de tubérculos de *Dioscorea* en una superficie de 1'465,540 hectáreas con un rendimiento de poco más de 8 toneladas por hectárea (FAOSTAT 2009). En México siempre se ha utilizado en zonas rurales, se usa también desde hace mucho tiempo en culturas de África, Asia, el Caribe e incluso en Sudamérica (Rodríguez *et al.* 2008). En nuestro país el género sufre una gran presión debido a que solamente es recolectado, para el consumo propio y la venta, esta actividad abarca un período de recolección de noviembre a mayo (Mostul y Cházaro 1996). En algunas zonas rurales cuando escasea el maíz y el frijol que son producidos únicamente en temporal de lluvias, una alternativa como alimento o de ingreso económico es el camote de cerro, el cual es recolectado de áreas naturales, la sobreexplotación de este recurso forestal no maderable, disminuye el tamaño de las poblaciones en su hábitat natural. Las especies de *Dioscorea* son importantes para la industria farmacéutica debido a que presentan altos niveles de diosgenina que es base para la producción de esteroides. Hacia 1970, se explotó con gran medida este recurso, para la industria farmacéutica en la producción de hormonas sintéticas como anticonceptivos (Niño *et al.* 2007).

Existe una gran variación entre las diferentes especies del género *Dioscorea*, relacionada con un proceso evolutivo, en este proceso suceden cambios en el número de cromosomas (nivel de ploidía), que afecta a las especies presentando modificaciones en la producción de ciertas sustancias, así como la capacidad de adaptación a diferentes ecosistemas (Choque *et al.* 2007).

El realizar estudios citogenéticos en plantas de interés, puede ayudar a describir mejor a las especies, determinando el número cromosómico y su nivel de ploidía; pudiendo marcar un desarrollo evolutivo (Poggio *et al.* 2008). Los estudios en cromosomas identifican factores que intervienen para la especiación, los cuales forman barreras de aislamiento que permiten una divergencia evolutiva, siendo los poliploides especies altamente heterocigóticas (Solís y Fernández 2005). Las plantas con cambios en el nivel de ploidía presentan modificaciones en sus características con ventajas que son aprovechadas por el hombre, como mayor capacidad de adaptarse a distintos lugares o ser más resistentes a las sequías y heladas (Choque *et al.* 2007). El nivel de ploidía puede ser determinado por un conteo de cromosomas o por citometría de flujo y relacionarse con la densidad estomática, es decir el número de estomas por un campo ocular (Choque *et al.* 2007) y el número de cloroplastos en las células guardas de los estomas (Orrillo y Bonierbale 2009).

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Descripción del género *Dioscorea***

La familia Dioscoreaceae posee seis géneros y cerca de 850 especies; *Dioscorea* es el género mas abundante con 650 especies, en México se han reportado cerca de 65 especies de dicho género. Las dioscoreas son plantas herbáceas trepadoras con rizomas o tubérculos leñosos o carnosos, simples o agrupados, de corteza delgada, gruesa o suberosa. Tallos dextrovolubles o levovolubles, alados o lisos, rollizos o angulados, armados o inermes, glabros o pubescentes; con tricomas simples, unicelulares, engladulares. Hojas alternas, opuestas o verticiladas simples o palmado-compuestas, 3-15 nervadas, las secundarias usualmente reticuladas horizontalmente. Inflorescencias axilares, las estaminadas en racimos o panículas, las pistiladas en espigas o racimos, bien desarrolladas o con los ejes reducidos. Flores unisexuales, actinomórficas, perianto funeliforme o campanulado; tépalos seis, en dos vertiselos similares o diferenciados, libres o variadamente connatos. Flores estaminadas usualmente con seis estambres, en dos verticilos, todos fértiles o los tres más internos abortados, filamentos libres o connatos, cortos o tan largos como los tépalos, anteras introrsas, tecas coherentes; estaminodios presentes o ausentes. Flores pistiladas epíginas, estaminodios seis, tres o ausentes; estilos libres o en una columna, simple o ramificada. Frutos capsular o samaroides con dos cavidades abortadas, dehiscente o indehiscente, coriáceo o membranáceo; semilla aplanada u ocasionalmente esféricas, reticuladas, semi-lisa o verrugosas, aladas periféricas, lateralmente con o sin alas (Téllez 1996).

### **2.2. Distribución del género *Dioscorea* en el mundo**

Rodríguez (2000) señala que el género *Dioscorea* alcanzó su distribución mundial a finales del Cretácico y su evolución subsecuente ocurrió por la separación del Nuevo y Viejo Mundo. Existen secciones taxonómicas diferentes del género en los dos hemisferios pero ninguna de las dos está presentes en ambos hemisferios. La separación del ancestro



Asiático ocurrió posteriormente en el Mioceno. Las dioscoreas son tropicales y su crecimiento está limitado a 20° N y 20° S y altitud máxima de 1,000 msnm, distribuidas en los continentes Africano, Asiático y Americano.

De acuerdo con lo que señala Ramírez y Téllez (1992), en México se encuentran distribuidos en diferentes estados de la república desde Sinaloa a Chiapas en el Pacífico, de Tamaulipas a la Península de Yucatán en el golfo y de Chihuahua hasta Puebla y Querétaro en el centro del país (Figura 1). En el estado de Jalisco se encuentran presentes 29 especies del género *Dioscorea* (Ramírez *et al.* 2010) entre las que destacan *D. sparsiflora* y *D. remotiflora* por ser las más utilizadas para el consumo como alimento (Guízar *et al.* 2008).



Figura 1. Distribución del género *Dioscorea* en México

### **2.3. Usos y producción del género *Dioscorea***

Las dioscoreas son un importante grupo de especies que se cultivan en el mundo por que poseen un tubérculo comestible, siendo muy importante en África, Asia y parte de Sudamérica. El oeste de África se considera como la zona más productiva de tubérculos de *Dioscorea* en el mundo con un total de 48 millones de toneladas, siendo el 93% de la producción mundial (Asiedu y Sartie 2010). En México en 1960, se establecieron ensayos para la domesticación de las dioscoreas silvestres, debido a que se explotó de manera masiva este recurso para la obtención de diosgenina, las poblaciones naturales comenzaron a decaer, y por lo tanto fue decretado el control y la explotación racional, se sembraron 20 hectáreas, pero en 1980 se canceló el proyecto (Huerta 1998).

A nivel mundial son utilizadas como fuente de alimento (Asiedu y Sartie 2010), después de 1930 se utilizaron como fuente de diosgenina que sirve como base para la fabricación de productos hormonales (Hinke 2008), a partir de este compuesto se puede obtener más de 1200 fármacos (Huerta 1998). Existen trabajos donde se ha estudiado la diosgenina como inhibidor del desarrollo de las células de cáncer (Raju y Mehta 2009). Se ha hecho investigación para usarlo como un producto anti-envejecimiento y se señala que presenta eficiencia para utilizarse con este fin (Cronin y Draelos 2010).

En Jalisco se conoce a las dioscoreas comúnmente como camote de cerro, el cual es utilizado para consumo, es colectado a partir del mes de noviembre y hasta finales de mayo.

### **2.4. Origen de los organismos poliploides**

En las plantas, los poliploides se clasifican según su origen: los autopoliploides en los que el genoma es de la misma especie (duplicación del material genético) y los alopoliploides donde el material genético proviene de dos o más especies (híbridos interespecíficos) (Hegarty y Hiscock 2008). En las plantas angiospermas se estima entre un 30-35 % de frecuencia de poliploides, una vez formados nuevo poliploides, el establecimiento depende de su capacidad o bien de la habilidad para colonizar nuevos hábitats o que persistan con

las poblaciones parentales. Los poliploides recién formados probablemente sufren de desventaja de minoría (citotipo), por lo que las oportunidades de apareamiento con otros poliploides son raras, y la introgresión con uno o ambos taxones parentales es limitada por no ser totalmente compatibles con otras especies (Hegarty y Hiscock 2008). Sañudo y Ruiz (1975), en su trabajo señalan que la presencia de poliploides en la naturaleza es más común de lo que se piensa y el aumento del número de cromosomas ejerce un papel muy importante en la evolución, más importante de lo que se le ha atribuido, siendo una fuerza estabilizante y conservadora en los procesos de la evolución. Por su parte Wendel (2000), menciona que la creación de los poliploides en la naturaleza genera una estabilidad genética y una subsecuente evolución.

## **2.5. Citogenética**

La citogenética es la disciplina que se encarga de estudiar, la función, forma y comportamiento de los cromosomas. Es una herramienta muy utilizada para comprender problemas mutagénicos como algunas trisomías en el caso de humanos, en las plantas permiten entender el desarrollo evolutivo y especiación y sirve como una herramienta para el mejoramiento genético.

Existen diferentes niveles de ploidía como los siguientes: haploides, estos son células u organismos que presentan tan sólo un juego de cromosomas, este nivel de ploidía es muy común en las células gaméticas; diploides, presentan dos juegos de cromosomas y este nivel es muy común en todos los organismos y con mayor frecuencia en animales; los organismos con una ploidía igual o mayor de tetraploide se conocen como poliploides, estos organismos se presentan con frecuencia en algunas especies (Hegarty y Hiscock 2008).

### **2.5.1 División celular**

La célula es la unidad fundamental de la vida, porque es la estructura más pequeña que realiza las funciones bioquímicas vitales necesarias para que pueda mantenerse viva. Existen dos tipos de células, las eucariotas (que presentan un núcleo verdadero) y

procariotas (no presentan un núcleo verdadero). La división celular es el proceso por el cual las células se renuevan o se duplican, existen dos tipos de división celular la mitosis y la meiosis. La división celular es indispensable para la vida.

### *Mitosis*

Este tipo de división celular se lleva a cabo en células somáticas y no implican una variación genética es decir: la información genética es la misma de la célula madre y las hijas, en la división existen cuatro principales etapas:

- I. Profase
- II. Metafase, que es una de las más importantes para los estudios citogenéticos porque las características que conforman a los cromosomas son más visibles, como el tamaño de los brazos, la posición del centrómero y el tamaño que presentan cada uno de los cromosomas que integra el genoma de cada organismo; por esas características, es conveniente que las células que se analizan en preparaciones citogenéticas se encuentren en esta fase de división celular, en esta etapa los cromosomas se colocan en el plano ecuatorial de la célula a causa de que son jalados por el huso, estos son sujetados del centrómero, el huso está constituido de una gran cantidad de filamentos que están formados de microtúbulos que parten de cada centriolo, que se encuentra en los polos de la célula (Robertis y Robertis 1987).
- III. Anafase
- IV. Telofase

### *Meiosis*

El presente tipo de división sucede en las células gaméticas, es decir en la formación de óvulos y espermias en el caso del reino animal, en óvulos y polen en caso de las plantas superiores, este tipo de división celular se caracteriza por tener dos divisiones, las cuales tienen como objetivo generar a partir de la célula madre cuatro células hijas haploides y es cuando ocurre la recombinación genética. Las fases que de la conforman son:

- I. Profase I en caso de las plantas superiores se encuentra dividida en subfases que son: a) leptoteno, b) cigoteno, c) paquiteno que es donde aparecen los nudos cromosómicos en que son utilizados para analizar citogenéticamente diferencias entre grupos en las especies que los presentan (Kato *et al.* 2009); d) diploteno y e) diacinesis. Seguida de la fase:
- II. Metafase I,
- III. Anafase I,
- IV. Telofase I,

#### Segunda división celular

- V. Profase II
- VI. Metafase II,
- VII. Anafase II
- VIII. Telofase II (Ronceret *et al.* 2007)

#### **2.5.2. Inhibidores del huso acromático**

Los inhibidores del huso acromático, son compuestos químicos que evitan que los microtúbulos del huso acromático puedan tomar a los cromosomas de los centriolos y separar las cromátidas hermanas en la división celular, esto se lleva cabo con la despolimerización de estas estructuras celulares (García 1990.). Los inhibidores del huso acromático más utilizados son: a) la colchicina, que se puede utilizar con dos fines principales, para la realización de preparaciones citogenéticas y para aumentar el nivel de ploidía, es extraída del tubérculo de la planta *Colchicum autumnales* (Imery-Buiza y Cequea-Ruíz 2001); al utilizarlo como pretratamiento se obtiene un alto número de metafases haciendo más eficiente el conteo de cromosomas, utilizando la colchicina se mejora la penetración y fijación, que son las siguientes etapas para la observación de los cromosomas, este compuesto requiere precaución para su uso por ser un producto tóxico; b) la 8-hydroxyquinoleina, se comenzó a utilizar en 1950 como inhibidor de la mitosis, se utiliza a una concentración de 0.5 g/L (0.002 M) el cual es eficiente para cromosomas pequeños; c)  $\alpha$ -bromonaftaleno, presenta casi igual los efectos a la colchicina, es

escasamente soluble en agua, se utiliza una solución saturada por 2 a 4 h a temperatura ambiente; y d) paradiclorobenceno, este es eficiente para cromosomas pequeños, igual que la 8-hydroxyquinoleina presenta una baja solubilidad en agua, se utiliza a una concentración de 15 g/L.

### **2.5.3. Observación de los cromosomas**

Es posible observar los cromosomas en las fases apropiadas de la división celular, tanto en mitosis como en meiosis, con la ayuda de un microscopio compuesto y haciendo uso de algunas tinciones adecuadas para cada procedimiento, los tejidos más utilizados son los que se encuentran en constante división celular. Para realizar las preparaciones citogenéticas en células somáticas en vegetales, se utilizan meristemos de raíz y hojas en desarrollo, en células gaméticas lo más común es en anteras florales.

### **2.5.4. Preparaciones citogenéticas de meristemos de raíz y hojas jóvenes**

Para realizar los estudios citogenéticos en raíz y hojas es necesario hacer previamente un tratamiento de los tejidos a estudiar, el primer paso es inhibir el huso acromático, el cual está formado por una gran cantidad de fibras que están formadas por tubulinas que parten de los centriolos hacia los cromosomas. Su función es adherirse a los centrómeros de cada cromosoma y separar los cromosomas homólogos hacia cada polo de la célula. Cuando las fibrillas están adheridas a los cromosomas, estos se mantienen en el ecuador de la célula y son visibles, a esta etapa de la célula se conoce como metafase. Al utilizar los arrestadores del huso, se inhibe la formación del huso acromático, se evita que se separen los cromosomas homólogos y la división celular pase a otra fase.

El siguiente paso es fijar las células, es decir matar a la células lo más rápido posible para que no sigan el curso de la división celular, para esto se utiliza una solución fijadora (alcohol acético), la cual está compuesto por con tres partes de alcohol y una parte de ácido acético glacial, existen otras sustancias que se pueden usar, pero el alcohol acético es la más empleada para este fin.

Después de la fijación celular se prosigue con la digestión de la pared celular para esto se utiliza el ácido clorhídrico (HCl), en combinación con el aumento de temperatura en un determinado tiempo. Otra forma de realizar la digestión es utilizar enzimas como las pectinasas, citohelicinas y celulasas, la función de este proceso es degradar la pared celular y permitir que las células se puedan separar con mayor facilidad y los colorantes puedan penetrar más fácil al interior de la célula.

Para poder observar los cromosomas se requiere de una tinción, las más utilizadas y comunes son el acetocarmín y acetorceína, una variante de estos que son carmín propiónico y orceína propiónica, estas tinciones son esenciales para poder observar las características de los cromosomas.

#### **2.5.5. Preparaciones citogenéticas de anteras florales**

Para realizar la observación de los cromosomas en anteras de flores, se realizan observaciones en diferentes etapas de crecimiento de la flor, para determinar el tamaño aproximado en el que se debe colectar para encontrar la fase de la meiosis apropiada, de acuerdo al estudio que se pretenda realizar; puede ser en paquiteno, diacinesis, metafase I o metafase II. Es importante ser precisos en la determinación de la fase de la meiosis, para saber si las células son  $2n$  o  $n$ . La fijación de las anteras se realiza en solución alcohol-acético.

#### **2.5.6. Técnicas para el análisis citogenético**

En la actualidad existen diferentes formas para analizar los cromosomas, que permiten describirlos de forma detallada, tanto en tamaño como forma y donde se encuentran algunas secuencias que fueron incluidas dentro del genoma de alguna especie, las cuales se pueden observar incluso en interfase (Santos *et al.* 2006). Algunas técnicas permiten determinar de qué manera se recombinan los cromosomas con sus homólogos, así como localizar algunas regiones por medio de marcadores citogenéticos.

## Citometría de flujo

Este método es muy rápido y muy utilizado para determinación de ploidía, se basa en la determinación de la cantidad de ADN, cuantificando la luz emitida por el ADN fluorescente. Un ordenador presenta gráficas de intensidad lumínica las cuales sirven para interpretar la cantidad de ADN presente por muestra (Garnett *et al.* 1999).

## Determinación del cariotipo

Los estudios del cariotipo se basan en describir a los cromosomas por sus características morfológicas, como la posición del centrómero, tamaño del cromosoma y tamaño de los brazos. Tomando en cuenta estas características se les determina (asigna) el número, dependiendo del tamaño, el mayor es el cromosoma uno y así sucesivamente hasta el más pequeño que es el último número (Rodríguez 1995).

## Bandeo cromosómico

El bandeo cromosómico fue realizado por primera vez por Howard en 1973 utilizando papaína, la cual es extraída del látex de la planta *Carica papaya*, la papaína permite teñir zonas claras y oscuras en forma de bandas, estas sirven para identificar los brazos de cada cromosoma ya que cada par homólogo presenta un estriado diferente a los demás, es muy utilizado para realizar estudios de cariotipo debido a que se identifican los cromosomas con mayor facilidad (Solís 2001).

## Técnicas con fluorescencia

Existen técnicas modernas con las cuales es más eficiente la caracterización de los cromosomas de cada especie como lo son:

La tinción DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole), la cual es fluorescente, esta técnica permite observar con mayor claridad a los cromosomas debido a que se une a los enlaces de A-T y G-C en el ADN, utilizando un microscopio con lámparas especiales puede verse, esta técnica se puede combinar con otras técnicas (Lin *et al.* 1977).



La hibridación fluorescente *in situ* (FISH por sus siglas en inglés), en esta técnica se utilizan marcadores citogenéticos que se hibridan con una secuencia específica de cromosomas, para esto se utilizan sondas como los clones BAC (cromosomas artificiales de bacterias) (Wai *et al.* 2010).

La hibridación genómica *in situ* (GISH por sus siglas en inglés), es una herramienta utilizada en el mejoramiento genético en vegetales, esta técnica es una variante de FISH, la hibridación genómica permite identificar grupos de cromosomas (Raina y Rani 2001).

#### Nudos cromosómicos

Los nudos se presentan cuando las células en meiosis se encuentra en la etapa de paquiteno, se observan abultamientos en los cromosomas de color más oscuro, se presentan en una posición específica, dependiendo del grupo y raza a la que pertenezcan, pero no todos los cromosomas los presentan, la aparición de los nudos va desde cero hasta varios en un sólo cromosoma, los nudos han sido muy utilizado para explicar la convergencia y divergencia de las especies del género *Zea*, pero también otras especies los presentan (Kato *et al.* 2009).

### **2.6. Descripción citogenética del género *Dioscorea***

Las especies del género de *Dioscorea* se encuentran tanto en el Viejo y Nuevo Mundo, el número base de cromosomas es diferente en ambos lugares. A lo largo de los años se han realizados estudios para determinar el número de cromosomas, Martín y Ortiz (1963) mencionan que el número base de cromosoma es nueve para las especies del Nuevo Mundo, y las especies que pertenecen al Viejo Mundo presentan como número base de cromosomas de 10. Existen trabajos en la actualidad que no coinciden con lo reportado por estos autores como las investigaciones de Baquar (1980) y Bousalem *et al.* (2006), donde mencionan que el número básico es 6 y 20, respectivamente.

Los estudios que se han realizado revelan que entre las especies hay gran variedad de ploidías y tamaño de los cromosomas. Ramachandran (1968) describió que las plantas masculinas presentan un cromosoma ligeramente más largo, posiblemente esto las diferencia de las femeninas. Para la descripción del nivel de ploidía que presentan las

especies, se utilizaron técnicas como: conteo de cromosomas en las células del meristemo de raíz, conteo de cromosomas en anteras florales, citometría de flujo y microsatélites.

En 1998, Abraham realizó la determinación del nivel de ploidía en *Dioscorea alata*, determinó la ocurrencia de hexaploides masculinos, encontró que en plantas con este nivel cromosómico, algunas no florecen y las que logran florecer, sus inflorescencias son más pequeñas que las plantas diploides y presentan un porcentaje muy alto de infertilidad en comparación con una planta normal. Por su parte Gamiette *et al.* (1999), determinaron los niveles de ploidía que presentan 85 accesiones de especies que provienen de Las Indias Occidentales, Nigeria, Costa de Marfil, India y Nueva Caledonia. Encontraron que todas las accesiones que estudiaron presentaron niveles de ploidía de  $4x$ ,  $6x$  y  $8x$ , no encontraron con nivel  $2x$ . Egesi *et al.* (2002) investigaron los niveles de ploidía de 53 accesiones que pertenecen a África Occidental, Chad y Puerto Rico, los resultados que encontraron fue una incidencia de 84.9% de hexaploides y 15.1% de tetraploides, presentando un número mayor de plantas hexaploides que tetraploides en los masculinos. Kouakou *et al.* (2007) realizaron un análisis de resistencia de antracnosis en relación con el nivel de ploidía, estudiaron 43 accesiones, encontrando cinco diferentes niveles de ploidía  $3x+5$ ,  $4x$ ,  $4x+5$ ,  $6x$  y  $8x$  de las cuales 67% de las accesiones presentaron resistencia a antracnosis. En las investigaciones recientes que realizaron Arnau *et al.* (2009), se encontró que en las 110 accesiones que estudiaron, un 76 % de diploides, 7 % de triploides y 17 % de tetraploides.

Los niveles de ploidía de *Dioscorea cayenensis-rotundata* fueron determinados por Gamiette *et al.* (1999); ellos observaron que todas las accesiones que estudiaron presentaron niveles de ploidía de  $2x$ ,  $3x$  y  $4x$ , las accesiones fueron colectadas en Las Indias Occidentales, Nigeria, Costa de Marfil, India, y Nueva Caledonia.

En *Dioscorea cayenensis* se encontraron tres niveles diferentes de ploidía: tetraploides, hexaploides y octoploides; de los cuales fueron 15, cinco y dos respectivamente, de los 22 materiales que analizaron (Dansie *et al.* 2001). Por su parte Obidiegwu *et al.* (2009) realizó una investigación para diferenciar los niveles de ploidía que pertenecen a Guinea, los resultados fueron 108 tetraploides, 47 hexaploides y cinco octoploides, encontraron un organismo mixoploide que contenía células tetraploides y hexaploides.

En Camerún se describieron los niveles de ploidía que presenta el complejo de *Dioscorea rotundata*, Dansi *et al.* (2001) determinaron tres niveles diferentes de ploidía; de los cuales 15 fueron tetraploides, cinco hexaploides y dos octoploides.

Las variaciones somaclonales que se encontraron en la regeneración *in vitro* de *Dioscorea floribunda* se clasificaron en tres categorías: diploides, tetraploides y mixoploides (mosaicos), debido a las variaciones que encontró en sus niveles de ploidía en el análisis que realizaron Sen *et al.* (1991).

En 2006 Bousalem *et al.* analizaron plantas cultivadas de *Dioscorea trifida* y observaron que conservan una homogeneidad en la ploidía (tetraploides), es decir que las accesiones revisadas presentaban la misma cantidad de cromosomas.

## **2.7. Relación de ploidía con cambios estructurales en la planta**

Al existir cambios en la cantidad del número de juegos cromosómicos que presentan las plantas, estas pueden alterar su ciclo de vida, como el número de semanas que tardan para llegar a florecer (Abraham 1998). Estos cambios pueden dar ventajas a las plantas, pudiendo tener mayor resistencia a sequías y heladas (Choque *et al.* 2007). Las plantas también presentan modificaciones en el tamaño de la hoja tanto el largo como ancho (Janaki y Singh 1962; Heping *et al.* 2008). Yoshizumi *et al.* (2008) en sus investigaciones en *Arabidopsis*, *Zea mays* y *Medicago*, estudiaron el tamaño que presentan las células de varios tejidos de plantas tetraploides en comparación con las diploides, las observaciones realizadas determinaron que las plantas de mayor ploidía presentan un mayor tamaño en las células de los tejidos en comparación con las plantas diploides.

### **2.7.1. Estomas**

Los estomas son aberturas o poros en la epidermis rodeada de dos células especializadas (Rojas y Rovalo 1981), denominadas células guardianas u oclusivas, el poro se continúa internamente como una cámara subestomática, la cual se comunica con el espacio intercelular del mesófilo, los estomas pueden encontrarse tanto en hojas, rizomas, plantas acuáticas, pétalos, estambres y gineceo. La mayor parte de la transpiración se hace por los

estomas, aun cuando el poro (ostíolo) está cerrado, de tamaño aproximado de orificio de 0.2  $\mu\text{m}$ . El número de estomas por hoja varía mucho de una especie a otra. La luz es un factor que influye en el mecanismo de cierre y apertura de los estomas en condiciones normales de humedad, temperatura y viento. Los cloroplastos están rodeados por una membrana y poseen formaciones donde se encuentra la clorofila, distribuida en el estroma, esta arquitectura le permite a la clorofila utilizar la energía lumínica, absorbiendo fotones. Los cloroplastos de los estomas tienen una respuesta específica a la luz azul, con un espectro de acción semejante a la apertura de estomas, por lo que se piensa que interviene en la traducción sensorial (Flores-Vindas 1999). Las funciones principales de los estomas es regular la pérdida de agua y el ingreso de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), pero la función esencial es el mantenimiento de la homeostasis de la planta, es decir la regulación del medio interno mientras interactúa con el medio ambiente (Rojas y Rovalo 1981; Flores-Vindas 1999).

### **2.7.2. Relación de ploidía y características de los estomas**

Las modificaciones de los niveles de ploidía presentan una relación con los estomas; si se modifica el número de juegos de cromosomas, estos pueden modificar las características como el largo y ancho de los estomas, así como, la densidad estomática de manera positiva o negativa (Simmonds 1948; Orrillo y Bonierbale 2009) y la cantidad de cloroplastos que presentan las células guardas de los estomas (Orrillo y Bonierbale 2009). Simmonds (1948) realizó un estudio citogenético para determinar si existía una relación del nivel de ploidía con el tamaño y densidad de los estomas, con híbridos de plátano, encontró que el tamaño de los estomas presenta una relación positiva con el nivel de ploidía pero la densidad de estomas era de forma negativa. Bingham (1968) citado por Krishnaswami y Andal (1977), encontró que en las células oclusivas el número de cloroplastos efectivamente distingue el nivel de ploidía. Señaló que el nivel de ploidía tuvo una influencia en el número de cloroplastos.

### **2.7.3. Densidad estomática de *Dioscorea***

Abdulrahman *et al.* (2009) analizaron los complejos estomáticos, el índice y densidad estomática en algunas especies de *Dioscorea*. Ellos recolectaron hojas frescas y bajo un proceso las conservaron para su posterior observación. Encontraron que las especies *D. alata*, *D. bulbifera*, *D. cayenensis*, *D. dumetorum*, *D. esculenta* y *D. rotundata* presentan una densidad estomática por mm<sup>2</sup> de 10.57, 27.83, 17.75, 10.85, 21.25 y 20.66 respectivamente.

### **3. HIPÓTESIS**

Existe una relación entre los niveles de ploidía y la densidad estomática en *Dioscorea* spp. colectadas en el estado de Jalisco

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo general**

Determinar niveles de ploidía en accesiones de *Dioscorea* spp. del estado de Jalisco, mediante la caracterización citogenética y estomática.

#### **4.2. Objetivos particulares**

- I. Establecer una técnica para hacer preparaciones citogenéticas en *Dioscorea* spp.
- II. Determinar la relación entre los niveles de ploidía y el número de estomas.
- III. Evaluar la variabilidad citogenética y estomática entre poblaciones de *Dioscorea* spp.
- IV. Analizar la relación existente entre el peso del tubérculo y el nivel de ploidía.
- V. Establecer un modelo matemático para determinar el área de la hoja

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Material vegetativo

Se utilizaron 100 accesiones de once localidades de Jalisco (Cuadro 1), en las cuales se encontraron dos diferentes especies de *Dioscorea* (*D. remotiflora* y *D. sparsiflora*); con el fin de describir las especies de cada accesión, se tomaron muestras de la planta, que incluían tanto tallo, hojas y flores; estas últimas son la característica más importante para la determinación de la especie, todas estas estructuras se herborizaron y secaron para su posterior revisión en el Herbario del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA). Todos los tubérculos proceden de fragmentos de tubérculo, que se almacenaron en bolsas de papel, en sombra a temperatura ambiente hasta el momento de su brotación, se plantaron en contenedores de plástico de 40 x 60 x 25 cm, con una capa de jal de 5 cm en el fondo de la caja, posteriormente se adiciono tierra de hoja, los contenedores se colocaron en malla sombra al 50%. Antes y después del temporal de lluvias se realizaron riegos dos veces por semana. La fertilización se realizó cada dos semanas con fertilizantes hidrosolubles 20-10-20 de la marca Peters Professional<sup>®</sup> a una dosis de 5 g/L, de la cual se utilizaban 50 mL por contenedor, del mes de agosto hasta el mes de noviembre se fertilizó una vez al mes con sulfato de calcio granulado 5 g por contenedor. Se realizaron podas periódicamente tratando de mantener las plantas a una altura de 2 m. El manejo del cultivo se realizó en el área de invernaderos del CUCBA que se ubica en una posición geográfica de 20° 45' N 103° 31'O.

Cuadro 1. Número de accesiones por localidad

Localidad	Coordenadas	Accesiones por localidad
Chapala	20°18'24''N 103°11'39.91''O	6
San Antonio (Chapala)	20°19'18''N 103°13'17.9''O	12
Cocula	20°28'19''N 103°46'8.84''O	5
Ixtlahuacán de los Membrillos	20°21'14.5''N 103°14'27.4''O	5
La Manzanilla de la Paz	20°3'16.1''N 103°3'2.4''O	11
Acatic	20°52'16.1''N 102°54'24.1''O	5
Ixtlahuacán del Río	20°59'1''N 103°11'1.94''O	12
San Gabriel	19°43'57.04''N 103°43'52''O	10
Zapotlanejo	19°57'6.2''N 105°14'23.7''O	12
San Martín Hidalgo	20°22'16.7''N 103°58'49.3''O	10
Ahualulco	20°40'59.05''N 103°59'9.18''O	12
Total		100

## 5.2. Preparaciones citogenéticas

Se probaron dos inhibidores del huso acromático la 8-hidroxiquinoleína a dosis de 0.002 M y 0.004 M y una solución saturada de  $\alpha$ -bromonaftaleno al 1 y 2 %, con tiempos de exposición de 4, 6 y 8 h; estas variables se combinaron con la respuesta con o sin hielo, todo esto se empleó para mejorar la calidad de las preparaciones. Para la hidrólisis se comparó el buffer de citrato en combinación con enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger*



(N. C. p2736 SIGMA), a concentraciones de 250, 500 y 1000  $\mu\text{L}$  diluidos en 1000  $\mu\text{L}$  de buffer de citrato y tiempos de exposición de 1 y 1.5 h a 37 °C; para aumentar la eficiencia de la hidrólisis, se utilizó después de la adición de las enzimas el ácido clorhídrico (HCl) 1 y 5 N a 5, 10 y 15 min de exposición a 60 °C. Para la tinción de los cromosomas se probaron dos tipos de colorantes: orceína y carmín al 1%, diluidos en ácido acético 45%.

#### Análisis citogenético de las accesiones

Para observar los cromosomas de las accesiones se emplearon las puntas de raíz de  $\pm 1$  cm, que fueron colectadas entre 7:00 a 9:00 AM se colocaron en microtubos de plástico de 2 mL de capacidad, que contenían 8-hidroxiquinoleína 2mM como inhibidor del huso acromático, los cuales se depositaron en un recipiente con hielo para proporcionar una temperatura aproximada a los 4 °C, durante un periodo 6 h. Para la fijación de las muestras se utilizó etanol y ácido acético en relación 3:1, respectivamente. Para la hidrólisis se utilizó la enzima pectinasa con el buffer de citrato a una relación 1:1 en un tiempo 90 minutos a 37 °C, cumplida esta etapa se transfirieron las raíces a ácido clorhídrico (HCl) 1N por un periodo de 10 min a 60 °C. Se utilizó la tinción con acetorceína. Las preparaciones se calentaron por unos momentos evitando que la tinción llegara al punto de ebullición, todo esto se realiza después de aplastar las raíces entre el cubreobjetos y portaobjetos. Se tomaron diez fotografías por accesión de metafases con el objetivo de 100X con el microscopio ZEISS Axiostar Plus, y la cámara AxioCam ICc1, las fotografías se procesaron en el programa AxioVision 4.8.1. para el posterior conteo de los cromosomas.

### **5.3. Densidad de estomas**

Para el conteo de la densidad de estomas por campo se emplearon cuatro hojas por accesión, que se colectaron en los meses de agosto y septiembre entre las 8 y 10 A.M, estas se tomaron de los tallos más vigorosos a una altura de 1.1 m para evitar que fueran hojas viejas o muy jóvenes, se colocaron en botes cilíndricos de plástico de boca ancha de 8 cm de diámetro y 9 cm de alto, que contenían papel húmedo, para evitar la deshidratación. Ya en el laboratorio la epidermis del envés de la hoja fue retirada de la parte central de la

lámina con unas pinzas de relojero, se sujetaron de las nervaduras para jalar la epidermis y obtener aproximadamente  $0.5 \text{ cm}^2$ , colocándola en un portaobjetos sobre una gota de lugol (KI). Posteriormente, se realizaron cinco observaciones por hoja en el microscopio compuesto LEICA modelo DME con el objetivo 40X, dando un total de 20 observaciones por accesión, los datos obtenidos se capturaron en una hoja de cálculo de Excel 2007 para su posterior análisis estadístico, y así determinar la correlación que presenta con el nivel de ploidía.

#### **5.4. Número de cloroplastos en los estomas**

Para el conteo del número de cloroplastos por estomas, se utilizaron pinzas de relojero para retirar la epidermis del envés de la parte central de la lámina de la hoja  $0.5 \text{ cm}^2$  aproximadamente, se tiñeron con una gota de lugol (KI) que se colocó sobre un portaobjetos, posteriormente se colocó la muestra al microscopio compuesto LEICA modelo DME, al elegir los estomas, se enfocó con el objetivo 40X, se contabilizó el número de cloroplastos del estoma del centro del campo, esto se repitió 20 veces por accesión .

#### **5.5. Tamaño de los estomas**

Para la medición de los estomas se utilizaron 10 hojas por accesión, se escogieron de los tallos más vigorosos las hojas sanas y maduras, para evitar medir estomas que no estuvieran totalmente desarrollados, las hojas se cortaron de la base del peciolo, se trasladaron de la malla sombra al laboratorio en bolsas de plástico, se almacenaron en el refrigerador a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  de 1 a 2 h, conforme se utilizaron para la preparaciones para la tinción se utilizó lugol (KI), por cada muestra de hojas se tomaron dos fotografías a estomas con el objetivo de 100X con el microscopio ZEISS Axiostar Plus, y la cámara AxioCam ICc1. Las mediciones del largo y ancho de los estomas, se realizaron con las herramientas de medición de el programa de ZEISS AxioVision 4.8.1.

#### **5.6. Medición de las hojas**

Para la determinación del ancho, largo y área se usaron 10 hojas por accesión, las cuales se colectaron del vivero malla sombra por la mañana, en el laboratorio se colocaron en un refrigerador a 4 °C para conservarlas y evitar la deshidratación. Se utilizó el escáner marca HP Modelo Scanjet 3970 con el cual se digitalizaron cada una de la hojas, en el escáner en el área de digitalización se colocó una regla que se utilizó como referencia para determinar la escala. Los archivos se guardaron en el formato PDF. Para ser analizadas las imágenes y determinar la medida del ancho, largo y área de la hoja, los archivos se manejaron con el programa Adobe Acrobat 8 Professional con las herramientas de medición. Los datos generados en el programa Acrobat 8 Professional se capturaron en el programa de Excel 2007 para manejar los datos y obtener las equivalencias de las medidas.

Modelo matemático para determinar el área foliar

Para generar un modelo matemático y para determinar el área foliar de las plantas de una manera más simple sin dañar la hoja, se utilizaron únicamente las medidas del largo, ancho y tipo de hoja. Las 964 muestras de hojas se obtuvieron de las accesiones que se tiene en la malla sombra del área de invernaderos del CUCBA, debido a que todas las hojas presentaron únicamente un tipo de ápice de hoja, se clasificaron de acuerdo a los tipos de base que presentan, se encontraron cuatro de las siete que señala IPGRI (1997) en los descriptores de *Dioscorea*, se analizaron 305, 572, 41 y 45 muestras del tipo cordada larga, cordadas amplia, sagitada larga y sagitada amplia, respectivamente. Los datos se procesaron en un modelo de regresión con el programa estadístico Statgraphics Plus.

## **5.7. Índice de productividad**

En el mes de enero del 2011 se cosecharon los tubérculos de las 100 accesiones de estudio, se mantienen en el área de invernaderos del CUCBA, los cuales se almacenaron en bolsas de papel, se colocaron en un anaquel y se mantuvieron a temperatura ambiente en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Producción Agrícola , en el mes de mayo del 2011 justo antes de establecer los tubérculos, estos se pesaron, utilizando una balanza digital de la marca Torrey Modelo EQ-10/20, con la información se generó una base de datos en el programa de Excel 2007. Cumplido el ciclo de cultivo en el

mes de enero del 2012 se cosecharon los materiales y se pesó la cantidad de tubérculo producido que contenía cada contenedor, para evaluar el rendimiento que presenta cada una de las accesiones. Con la información obtenida se completó la base de datos que se generó al inicio del cultivo.

Para determinar el índice de productividad se aplicó la siguiente ecuación:

$$IP = \frac{PTF}{PTI}$$

Donde:

*Índice de productividad (IP)*  
*Peso del tubérculo de la cosecha (PTF)*  
*Peso de tubérculo que se plantó en cada contenedor (PTI)*

## **5.8. Variables y análisis estadístico**

Las variables consideradas en este trabajo fueron peso del tubérculo antes de plantarlo; peso de tubérculo de la cosecha; índice de productividad; ancho, largo y área de la hojas; ancho, largo y densidad de estomas; número de cloroplastos en los estomas y nivel de ploidía (Apéndice A1). Los datos de las 100 accesiones fueron dividido de tres maneras: localidades de donde provienen las accesiones (localidades), especies y niveles de ploidía. Considerando que cada una de las 100 accesiones fueron plantadas en condiciones homogéneas, la importancia de las localidades, especies y niveles de ploidía se determinó con base en análisis de varianza de modelos de un criterio de clasificación (completamente al azar). En los casos en que se detectaron diferencias significativas en los análisis de varianza, se realizaron comparaciones de medias con base en las prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). Adicionalmente, se llevaron a cabo análisis de varianza con dos anteriores de clasificación, considerando localidades y especies dentro de localidades.

Por otra parte, para determinar el grado de asociación entre las variables se calcularon coeficientes de correlación simple entre todos los pares de variables. Todos los análisis

anteriores se llevaron a cabo con los procedimientos ANOVA, GLM y CORR del Sistema de Análisis Estadístico (SAS) versión 9.0.

Para investigar la posibilidad de describir el área de las hojas de *Dioscorea*, se usaron cuatro modelos de regresión múltiple, los que se probaron con base en el programa STATGRAPHICS PLUS.

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **6.1. Protocolo para preparaciones citogenéticas**

Para realizar preparaciones citogenéticas en dioscoreas se propone en este trabajo el siguiente procedimiento:

Hora de colecta de la raíz: 7:00 a 9:00 AM

Inhibidor del huso acromático: 8-Hidroxiquinoleína 2mM, con hielo

Fijación : alcohol acético.

Hidrólisis: enzima pectinasa con el buffer de citrato a una relación 1:1 en un tiempo de 90 minutos a 37 °C, terminado este tiempo, se colocan en ácido clorhídrico (HCl) 1N por un periodo de 10 min a 60 °C.

Tinción: acetorceína.

### **6.2. Nivel de ploidía en las accesiones de 11 localidades de Jalisco**

Algunos autores mencionan (Sañudo y Ruiz 1975; Wendel 2000) que los niveles de ploidía son parte de un proceso evolutivo, el número de juegos cromosomas se determina por análisis citogenéticos. Al analizar las preparaciones citológicas se observaron cuatro niveles de ploidía dentro de las 11 poblaciones que se encuentran distribuidas en el estado de Jalisco, se encontraron desde organismos diploides (Figura 2) hasta hexaploides (Figura 3) (Cuadro 2).

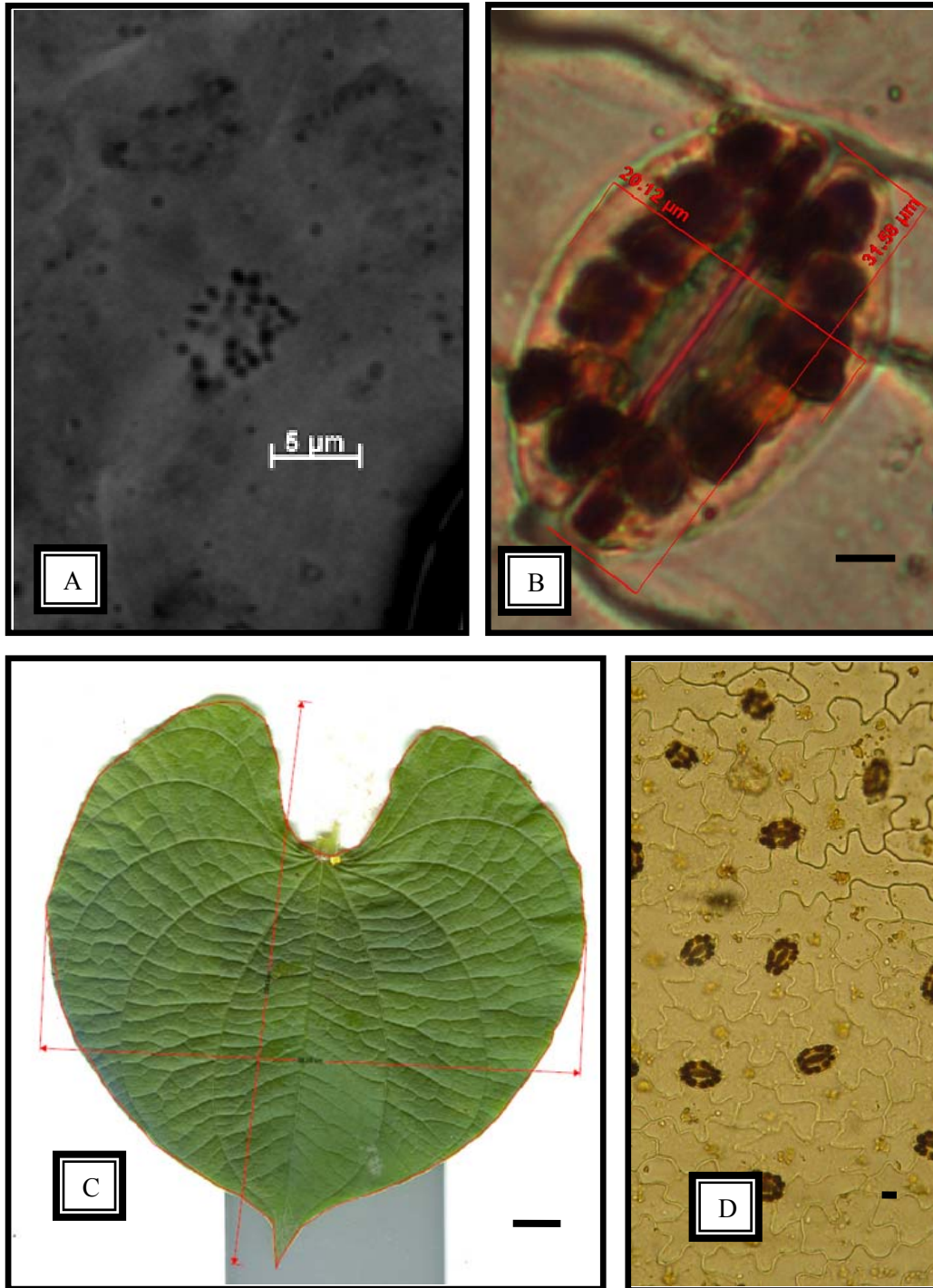


Figura 2. Cromosomas, estomas y hojas de *Dioscorea* spp. diploide. A) Célula en metafase (Barra = 5 µm). B) Estoma (Barra = 5 µm). C) Hoja de *Dioscorea* (Barra = 1 cm). D) Densidad de estomas (Barra = 10 µm).

Cuadro 2. Niveles de ploidía de diferentes accesiones de *Dioscorea* presentes en las 11 localidades del estado de Jalisco

Localidad	Nivel de ploidía			
	2x	3x	4x	6x
Chapala	2	3	1	
San Antonio (Chapala)	6	6		
Cocula	1	3	1	
Ixtlahuacán de los Membrillos		4	1	
La Manzanilla de la Paz	2	1	8	
Acatitlán	1		4	
Ixtlahuacán del Río	1	8	3	
San Gabriel		6	4	
Zapotlanejo	1	1	10	
San Martín Hidalgo	1	2	7	
Ahualulco	1		8	2
Total	16	34	47	2



Las ploidías que presentan las poblaciones de San Martín Hidalgo, San Gabriel, Ixtlahuacán del Río, Ixtlahuacán de los Membrillos y Cocula se encuentran en su gran mayoría entre triploides (Figura 4) y tetraploides (Figura 5). Las especies triploides en la naturaleza, son muy poco recurrentes porque al presentar este número de juegos cromosómicos son estériles (Nadal-Medina *et al.* 2009), no producen polen ni óvulos fértiles, pero pueden existir semillas de origen apomíctico (Moreno-Pérez *et al.* 2009); existen reportes de especies triploides que son fértiles (Barba-González *et al.* 2006), en el caso de las especies de *Dioscorea*, presentan tubérculos que rebrotan al siguiente ciclo de su formación. Es por ello que si la cruza entre un diploide y un tetraploide (genera un triploide) genera semillas y llegan a germinar y al formar tubérculos las plantas; pueden mantenerse en la población rebrotando ciclo a ciclo, o en el caso contrario si estos organismos triploides presentan óvulos y semillas fértiles se pueden mantener a partir de la reproducción sexual en las poblaciones. La única población que presentó hexaploides fue la de Ahualulco, misma localidad en la que se encontraron en su mayoría tetraploides y tan sólo un diploide, siendo una población con mayoría de poliploides.

### **6.3. Análisis de varianza y comparaciones de medias entre localidades**

El análisis de varianza (ANOVA) y modelo lineal generalizado (GLM por sus siglas en inglés) exhibe la variabilidad que presentan las accesiones que provienen de diferentes localidades (localidades), las especies y los niveles de ploidía (Cuadro 3). Las localidades mostraron mayor variabilidad que las especies y los niveles de ploidía; los cuadrado medios para el modelo que consideró localidades, fueron significativos para peso de siembra, índice de productividad, ploidía, densidad de estomas, número de cloroplastos, ancho y largo de estomas. Por su parte, el modelo que consideró ploidía, fue significativo para peso de siembra, número de cloroplastos y ancho de estomas, mientras que el modelo de especies presentó significancia únicamente para el número de cloroplastos. El modelo que incluyó tanto a las localidades como a especies dentro de localidades, mostró significancia únicamente para localidades en las mismas variables que para el modelo de una anterior clasificación de localidades.

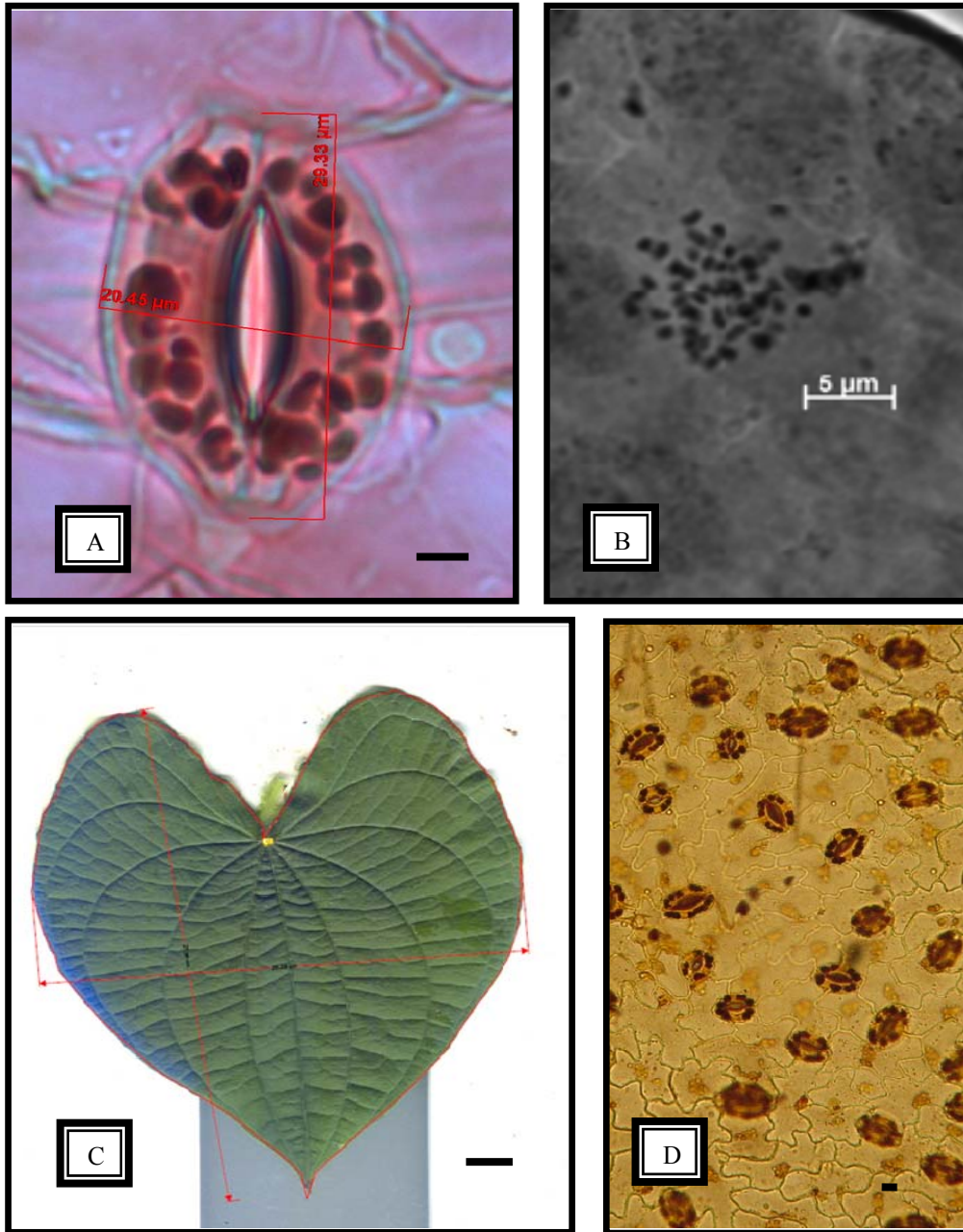


Figura 3. Hojas, cromosomas y estomas de *Dioscorea* spp. hexaploides. A) Estoma (Barra = 5 μm). B) Célula en metafase (Barra = 5 μm). C) Hoja de *Dioscorea* (Barra = 1 cm). D) Densidad de estomas (Barra = 10 μm)

Cuadro 3. Cuadros medios del análisis de varianza de localidades, especies y niveles de ploidía.

Variable	C.M.	C.M.	C.M.	Modelo de los factores	
	Especies	Localidades	Ploidía	Especie(Loc)	Localidad
Peso de siembra (kg)	0.01	0.10*	0.12*	0.08	0.09*
Peso de cosecha (kg)	0.44	0.26	0.03	0.49	0.32
Índice de productividad	4.41	87.92*	51.77	1.35	77.24
Ploidía	29.44	222.58**	-----	13.03	214.30**
Ancho de la hoja (cm)	0.27	2.61	1.08	5.50	2.48
Largo de la hoja (cm)	0.70	3.44	0.73	5.00	3.29
Área de la hoja (cm <sup>2</sup> )	130.39	531.18	186.97	997.27	496.53
Densidad de estomas	11.31	288.13**	89.71	218.24	269.93**
Número de cloroplastos en los estomas	18.51*	18.64**	11.11*	4.01	15.66**
Ancho de los estomas (µm)	0.02	6.59**	7.42**	2.20	6.67**
Largo de los estomas(µm)	1.11	18.57**	10.22	0.32	18.54**

\* = (P ≤ 0.05) Significativo \*\* = (P ≤ 0.01) Altamente significativo

Se evaluaron 11 distintas localidades del estado de Jalisco, en las cuales se describió la variabilidad que se encuentra entre ellas como el nivel de ploidía, características que presentan los estomas, la hojas y los tubérculos. Existe diferencia significativa entre las localidades para el índice de productividad (Cuadro 4), teniendo un coeficiente de variación de 90.68. Esto nos refleja que hay lugares de colecta, que presentan mayor capacidad de producir tubérculos, a partir de una mínima cantidad de material vegetativo, aumentando varias veces el peso que se ha sembrado. Rodríguez (2000) menciona que la variedad entre otros factores, son importantes para la producción del tubérculo, tomando en cuenta que los genotipos son diferentes y aún más entre las localidades las respuestas son diversas a la producción del tubérculo.

Cuadro 4. Análisis de varianza del índice de productividad entre localidades.

Fuente de variación	G.L.	C.M.	F c	Pr > F
Localidades	10	87.92	2.11	0.0317*
Error	88	41.66		

\* = (P ≤ 0.05) Significativo \*\* = (P ≤ 0.01) Altamente significativo. C.V.= 90.68 %

Las localidades por su índice de productividad muestran gran variación (Cuadro 5), San Martín Hidalgo presenta el promedio del índice de productividad más alto de las localidades, mientras que el que presenta el promedio menor es Ixtlahuacán de los Membrillos.

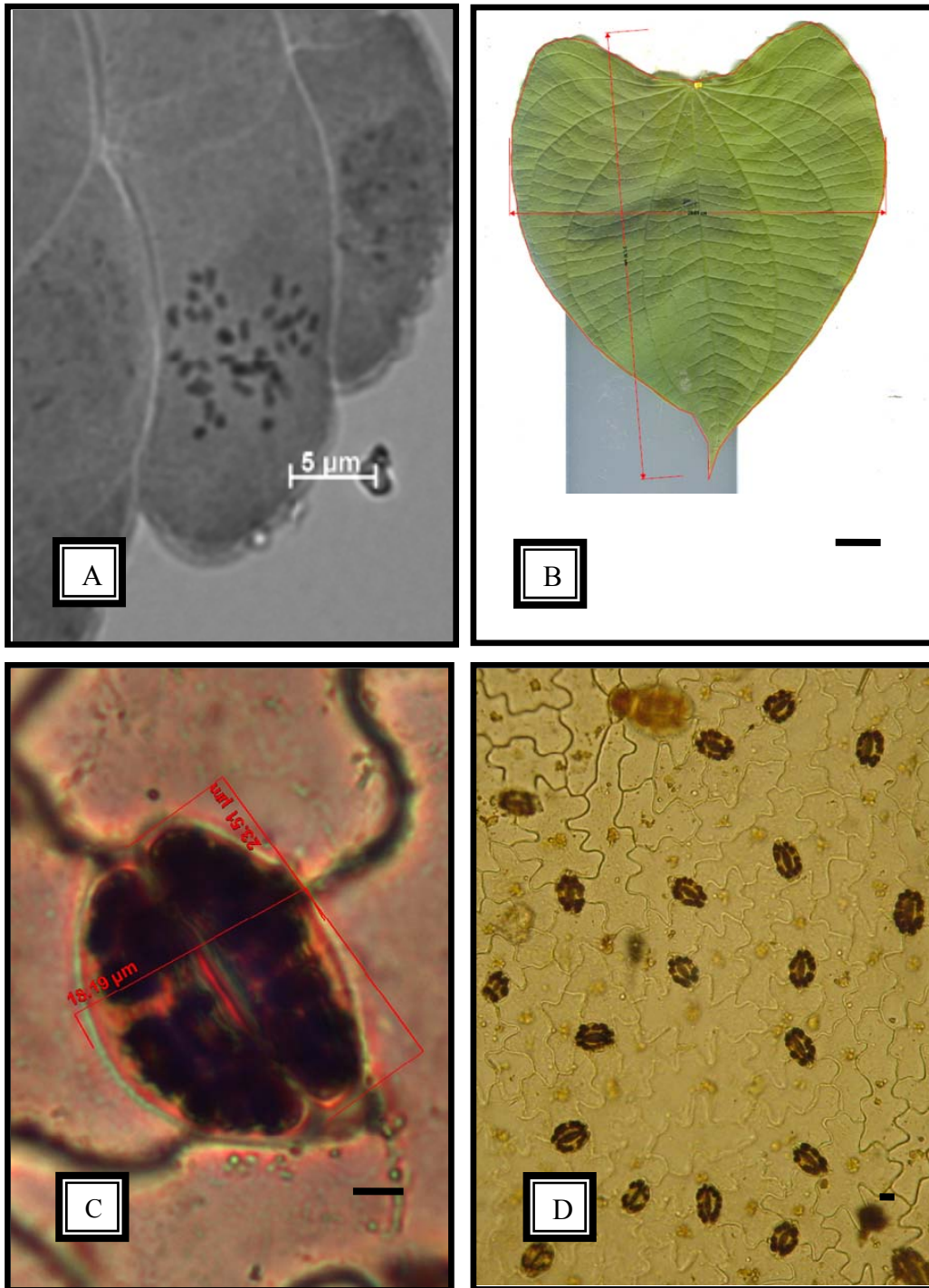


Figura 4. Hojas, cromosomas y estomas de *Dioscorea* spp triploide. A) Célula en metafase (Barra = 5 µm) B). Hoja de *Dioscorea* (Barra = 1 cm). C) Estoma (Barra = 5 µm). D) Densidad de estomas (Barra = 10 µm)

Cuadro 5. Comparación de medias del índice de productividad entre las localidades del Estado de Jalisco.

Localidad	Observaciones	Media (g/g)	Grupo
San Martín Hidalgo	10	13.73	A
Chapala	6	12.29	A B
Acatic	5	8.02	A B
Cocula	5	7.86	A B
San Gabriel	10	7.72	A B
Zapotlanejo	12	6.48	A B
Ahualulco	11	6.42	A B
Ixtlahuacán del Río	12	5.69	A B
La Manzanilla de la Paz	11	4.71	A B
San Antonio (Chapala)	12	4.52	B
Ixtlahuacán de los Membrillos	5	2.84	B

Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha = 0.05$ )

El Cuadro 6 indica diferencias altamente significativas entre las localidades para el ancho de los estomas, los cuales presentaron un coeficiente de variación de 6.32.

Cuadro 6. Análisis de varianza del ancho de los estomas entre las localidades

Fuente de variación	G.L.	C.M.	F c	Pr > F
Localidades	10	6.59	4.54	<.0001**
Error	86	1.45		

\* = ( $P \leq 0.05$ ) Significativo \*\* = ( $P \leq 0.01$ ) Altamente significativo. C.V.= 6.32 %

El ancho de los estomas entre las localidades se presenta en dos grupos con valores estadísticos iguales, teniendo el promedio mayor Ahualulco y el promedio más bajo Zapotlanejo (Cuadro 7).

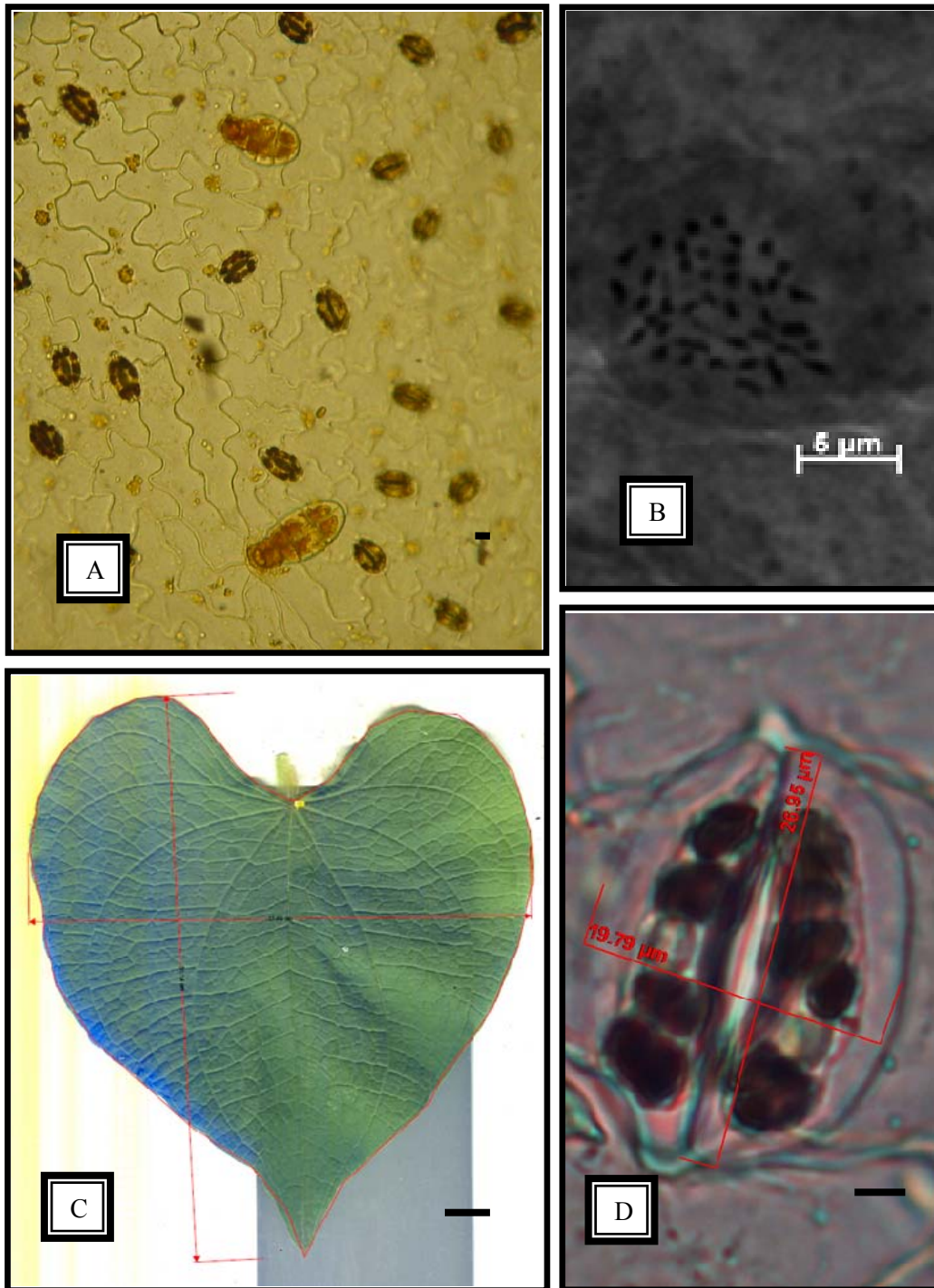


Figura 5. Hojas, cromosomas y estomas de *Dioscorea* spp tetraploide. A) Densidad de estomas (Barra = 10  $\mu\text{m}$ ). B) Célula en metafase (Barra = 5  $\mu\text{m}$ ). C) Hoja de *Dioscorea* (Barra = 1 cm). D) Estoma (Barra = 5  $\mu\text{m}$ ).



Cuadro 7. Comparación de medias del ancho de lo estomas entre localidades.

Localidad	Observaciones	Media ( $\mu\text{m}$ )	Grupo
Ahualulco	11	20.91	A
La Manzanilla de la Paz	10	19.74	A B
San Martín Hidalgo	10	19.26	A B
Acatic	5	19.13	A B
Chapala	6	19.11	A B
Ixtlahuacán de los Membrillos	4	19.02	A B
Cocula	5	18.96	A B
Ixtlahuacán del Río	12	18.90	B
San Antonio (Chapala)	12	18.49	B
San Gabriel	10	18.19	B
Zapotlanejo	12	18.10	B

Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha = 0.05$ )

En la Cuadro 8 se muestra que entre localidades se detectaron diferencias altamente significativas para el largo de los estomas, con un coeficiente de variación de 6.26. Las accesiones provienen de diversas regiones del estado de Jalisco, cada localidad presenta características diferentes de altitud, tipo de suelo y disponibilidad hídrica; estas variaciones en el ambiente, generan adaptaciones diferentes para cada accesión, por lo cual las plantas presentan modificaciones en la longitud de sus estomas.

Cuadro 8. Análisis de varianza para largo de los estomas entre localidades.

Fuente de variación	G.L.	C.M.	F c	Pr > F
Localidades	10	18.57	6.27	<.0001**
Error	86	2.96		

\* = ( $P \leq 0.05$ ) Significativo \*\* = ( $P \leq 0.01$ ) Altamente significativo. C.V.= 6.26%

La comparación de medias para el largo de los estomas entre las localidades presenta variación (Cuadro 9) siendo el de menor promedio Zapotlanejo con 25.66  $\mu\text{m}$  y el que presenta el mayor promedio es Ahualulco con 30.43  $\mu\text{m}$ .

Cuadro 9. Comparación de medias del largo de los estomas entre localidades.

Localidad	Observaciones	Media ( $\mu\text{m}$ )	Grupo
Ahualulco	11	30.43	A
San Martín Hidalgo	10	28.82	A B C
La Manzanilla de la Paz	10	27.90	B C
Chapala	6	27.89	A B C
Acatic	5	27.77	A B C
Cocula	5	27.55	B C
San Antonio(Chapala)	12	27.07	B C
Ixtlahuacán del Río	12	26.80	B C
San Gabriel	10	26.36	B C
Ixtlahuacán de los Membrillos	4	25.94	B C
Zapotlanejo	12	25.66	C

Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha = 0.05$ )

La densidad de los estomas entre accesiones de diferentes localidades presentaron diferencias altamente significativas (Cuadro 10), con un coeficiente de variación de 29.89. Este resultado indica que en las localidades se han desarrollado individuos de *Dioscorea* que presentan más estomas que otros, lo cual les permiten a algunos materiales vegetales tener mayor eficiencia para interactuar con el medio externo, mientras se regula el medio interno (Rojas y Rovalo 1981; Flores-Vindas 1999); cada localidad presenta condiciones

hídricas y edafológicas diferentes, por lo que las modificaciones que se presentan en la densidad de estomas les permite tener mayor control en los procesos hídricos con respecto a su entorno.

Cuadro 10. Análisis de varianza de la densidad de estomas entre localidades.

Fuente de variación	G.L.	C.M.	F c	Pr > F
Localidades	10	288.13	3.11	0.0019**
Error	89	92.62		

\* = ( $P \leq 0.05$ ) Significativo \*\* = ( $P \leq 0.01$ ) Altamente significativo. C.V.= 28.89

Existen diferencias en la densidad de estomas entre las localidades (Cuadro 11) presentando una promedio mayor las plantas de Ahualulco y un promedio menor las accesiones de Cocula.

Cuadro 11. Comparación de medias de la densidad de estomas entre localidades.

Localidad	Observaciones	Media	Grupo
(por campo ocular 40X)			
Ahualulco	12	42.57	A
San Antonio (Chapala)	12	36.43	A B
San Gabriel	10	35.90	A B
Zapotlanejo	12	33.65	A B
Ixtlahuacán de los Membrillos	5	31.49	A B
Acatic	5	29.99	A B
San Martín Hidalgo	10	29.34	A B
Chapala	6	28.95	A B
Ixtlahuacán del Río	12	27.33	B
La Manzanilla de la Paz	11	26.08	B
Cocula	5	23.90	B

Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha = 0.05$ )

Entre las accesiones de diversas localidades se presentan diferencias altamente significativas (Cuadro 12) para el número de cloroplastos que tienen los estomas, con un coeficiente de variación de 13.68. Tomando en cuenta lo que se muestra en los Cuadros 6, 8, 10 y 12 que presentan las diferentes variables medidas de los estomas (densidad, largo, ancho y número de cloroplastos) resultaron altamente significativas, se puede decir que estas variables son muy importante para la adaptación en las localidades donde se desarrollaron las accesiones. Esto coincide con lo reportado con Toral *et al.* (2010), quienes estudiaron las diferencias entre las características de los estomas de plantaciones de

secuoya (*Sequoia sempervirens*) de diferentes localidades de Chile, reportando que existen diferencias en la densidad y tamaño de los estomas, asociados a cambios que son afectados por la latitud, que estos pueden estar vinculados con permutaciones en el fotoperiodo, la disponibilidad hídrica y las condiciones edáficas. Los estomas son una estructura necesaria para el intercambio de gases (Dzierzynska 2006), al modificarse la densidad y el tamaño de los estomas pueden existir ciertos cambios en la transpiración y absorción de bióxido de carbono.

Cuadro 12. Análisis de variación del número de cloroplastos en los estomas entre localidades.

Fuente de variación	G.L.	C.M.	F c	Pr > F
Localidades	10	18.64	6.89	<.0001**
Error	89	2.71		

\* = ( $P \leq 0.05$ ) Significativo \*\* = ( $P \leq 0.01$ ) Altamente significativo. C.V.= 13.68%

Las accesiones de Chapala presentan el promedio más alto para el número de cloroplastos en los estomas y las de San Martín Hidalgo el promedio más bajo (Cuadro 13), formándose entre las localidades tres grupos; La Manzanilla de la Paz, Cocula y Chapala son los de promedio mayor y pertenecen al mismo grupo.

Cuadro 13. Comparación de medias del número de cloroplastos en los estomas entre las localidades.

Localidad	Observaciones	Media	Grupo
(Cloroplastos por estoma)			
Chapala	6	14.33	A
Cocula	5	13.89	A
Acatic	5	13.65	A B
La Manzanilla de la Paz	11	13.18	A
Ixtlahuacán del Río	12	13.02	A B
San Antonio (Chapala)	12	12.60	A B C
Ixtlahuacán de los Membrillos	5	12.19	A B C
Zapotlanejo	12	10.81	B C
Ahualulco	12	10.56	C
San Gabriel	10	10.48	C
San Martín Hidalgo	10	10.41	C

Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha = 0.05$ )

#### 6.4. Análisis de varianza, comparación de medias y correlaciones de los niveles de ploidía

Como se mencionó en la revisión de literatura, las modificaciones en los niveles de ploidía pueden presentar cambios que les permiten más competitividad con su entorno. En el Cuadro 14 se muestra que entre las localidades existen diferencias altamente significativas en el nivel de ploidía, siendo altamente significativa, con un coeficiente de variación de

21.17. Todo indica que en las localidades ocurren modificaciones en los niveles de ploidía que le permite mayor adaptación a cada organismo en su hábitat al que pertenece (Wendel 2000). Las modificaciones en su nivel de ploidía, permite tener mayor flexibilidad para los procesos y cambios químicos, fisiológicos y morfológicos, y así tener éxito para adaptarse y ser más competitivo con las de más plantas que se encuentren en su hábitat (Wendel 2000).

Cuadro 14. Análisis de varianza del nivel de ploidía entre las localidades.

Fuente de variación	G.L.	C.M.	F c	Pr > F
Localidades	10	222.58	4.36	<.0001**
Error	88	51.04		

\* = (P ≤ 0.05) Significativo \*\* = (P ≤ 0.01) Altamente significativo. C.V.= 21.17

La ploidía entre las localidades son diferentes (Cuadro 15), destacado las localidades de Ahualulco por presentar el promedio mayor con 41.81 cromosomas y San Antonio (Chapala) es el que presenta un promedio menor de todas las localidades con 25 cromosomas.



Cuadro 15. Comparación de medias para ploidía entre las localidades.

Localidad	Observaciones	Media	Grupo
		(No. cromosomas)	
Ahualulco	11	41.81	A
Zapotlanejo	12	37.50	A B
Acatic	5	36.00	A B C
San Martín Hidalgo	10	36.00	A B
La Manzanilla de la Paz	11	35.45	A B
San Gabriel	10	34.00	A B C
Ixtlahuacán de los Membrillos	5	32.00	A B C
Ixtlahuacán del Río	12	31.66	B C
Cocula	5	30.00	A B C
Chapala	6	28.33	B C
San Antonio (Chapala)	12	25.00	C

Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha = 0.05$ )

Al realizar el análisis de varianza para el número de cloroplastos en los estomas (Cuadro 16), se encontró que existen diferencias entre los niveles de ploidía, esto coincide con lo reportado en otros trabajos similares en otras especies, como es el caso del trabajo de Qin y Rotino (1995) quienes realizaron un estudio con pimientos donde argumenta que el número de cloroplastos pueden utilizarse como indicadores del nivel de ploidía. Se presenta un coeficiente de variación de 16.78.

Cuadro 16. Análisis de varianza del número de cloroplastos en los estomas entre los niveles de ploidía.

Fuente de variación	G.L.	C.M.	F c	Pr > F
Ploidía	3	11.11	2.72	0.0490*
Error	95	4.09		

\* = ( $P \leq 0.05$ ) Significativo \*\* = ( $P \leq 0.01$ ) Altamente significativo. C.V.= 16.78%

El número de cloroplastos que presentan los estomas para la prueba de Tukey no detectó la formación de grupos (Cuadro 17), a pesar de que el análisis de varianza presenta significancia (Cuadro 16).

Cuadro 17. Comparación de medias del número de cloroplastos en los estomas entre los niveles de ploidía.

Nivel de ploidía	Observaciones	Media	Grupo
(Cloroplastos por estoma)			
2x	16	13.09	A
3x	34	12.27	A
4x	47	11.59	A
6x	2	10.55	A

Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha = 0.05$ )

El ancho de los estomas entre los niveles de ploidía presenta un coeficiente de variación de 7.06, el análisis de varianza es altamente significativo (Cuadro 18). Lo cual coincide con lo

reportado por varios autores, como lo que mencionan Simmonds (1948); Vandenhout *et al.* (1995) quienes evaluaron el efecto que presentan la ploidía en los estomas de híbridos de plátanos, encontrando que entre las distintas plantas con números de juegos cromosómicos diferentes hay cambios en el tamaño de los estomas.

Cuadro 18. Análisis de varianza del ancho de estomas entre los niveles de ploidía.

Fuente de variación	G.L.	C.M.	F c	Pr > F
Ploidía	3	7.42	4.09	0.0089**
Error	93	1.81		

\* = ( $P \leq 0.05$ ) Significativo \*\* = ( $P \leq 0.01$ ) Altamente significativo. C.V.= 7.06%

La prueba de Tukey encontró variaciones en el ancho de los estomas (Cuadro 19) las plantas que presentan un nivel de ploidía de 6x presentan el promedio mayor del ancho de los estomas y el nivel de ploidía 3x presenta un tamaño menor.

Cuadro 19. Comparación de medias del ancho de los estomas entre los niveles de ploidía.

Nivel de ploidía	Observaciones	Media ( $\mu\text{m}$ )	Grupo
6x	2	21.59	A
4x	47	19.27	A B
2x	16	19.14	A B
3x	34	18.59	B

Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha = 0.05$ )

Como la ploidía se refiere al número de juegos cromosómicos presentes en las células, se esperarían algunos cambios en las plantas dependiendo de la cantidad de material genético que presenta cada planta, en el caso de las especies de *Dioscorea*, el número de juegos de cromosomas presenta una correlación altamente significativa con el número de cloroplastos presentes en los estomas (Cuadro 20), y significativa para el ancho de los estomas. El coeficiente de correlación que presentan los cloroplastos es negativo, las plantas que presentan un menor número de cloroplastos tienen un aumento en la ploidía. En 1977, Krishnaswami y Andal realizaron una investigación con el número de cloroplastos presentes en los estomas de *Gossypium*, llegando a la conclusión que las plantas que presentan cambios de ploidía, muestran también cambios en el número de cloroplastos de las células guardas. Las observaciones que encontraron estos autores en otra especie coincide con lo que se encontró en este trabajo, al aumentar el nivel de ploidía, el número de cloroplastos en los estomas también cambia. En el caso del coeficiente de correlación que presentan el ancho de los estomas es positivo, por lo tanto a mayor cantidad de juegos cromosómicos el ancho de los estomas aumenta. La correlación de la ploidía con el ancho de los estomas coincide con el trabajo que realizó Van Laere *et al.* (2011), donde estudio la influencia que presentan los niveles de ploidía en la morfología de *Spathiphyllum wallisii*, ellos estudiaron entre otras variables la densidad, largo y ancho de los estomas, señalan que al inducir a poliploides los tamaños de los estomas aumentan. Lo que se observa en los Cuadros 16, 17, 18, 19 y 20; corresponde a lo que se exhibe en la correlación de las ploidía con las otras variables, donde la ploidía presentó correlación solamente con el número de cloroplastos en los estomas y en el ancho de los estomas, siendo lo mismo para los ANOVA.

Cuadro 20. Correlación de la ploidía con el peso de cosecha, índice de productividad, ancho de la hoja, largo de la hoja, área de la hoja, densidad de estomas, cloroplastos en los estomas, ancho de estomas y largo de estomas.

Variable	Coefficiente de correlación	Probabilidad	Número de observaciones
Peso de cosecha (kg)	0.03	0.7897	99
Índice de productividad	0.01	0.9303	99
Ancho de la hoja (cm)	-0.01	0.9149	97
Largo de la hoja (cm)	0.04	0.6637	97
Área de la hoja (cm <sup>2</sup> )	-0.02	0.8712	97
Densidad de estomas	0.13	0.2065	99
Cloroplastos en los estomas	-0.28	0.0051**	99
Ancho de estomas (µm)	0.21	0.0409*	97
Largo de estomas (µm)	0.18	0.0700	97

\* = (P ≤ 0.05) Significativo \*\* = (P ≤ 0.01) Altamente significativo

No existe relación entre ploidía y hoja, por lo tanto no coincidiendo con lo que presenta Heping *et al.* (2008) donde indujeron a la formación de tetraploides utilizando colchicina, estos autores mencionan que las plantas presentan cambios en el tamaño de estomas y de las hojas. En el presente trabajo no existe una relación directa entre los niveles de ploidía con las hojas.

## 6.5. Análisis de varianza y comparación múltiple entre especies

En este trabajo se encontró que entre las dos especies de *Dioscorea* (*D. sparsiflora* y *D. remotiflora*) existen diferencias significativas en el número de cloroplastos en los estomas (Cuadro 21), con un coeficiente de variación de 16.98; no se presentaron diferencias significativas para las demás variables que se tomaron en cuenta para este trabajo.

Cuadro 21. Análisis de varianza del número de cloroplastos en los estomas entre especies.

Fuente de variación	G.L.	C.M.	F c	Pr > F
Especies	1	18.51	4.44	0.0377*
Error	98	4.17		

\* = (P ≤ 0.05) Significativo \*\* = (P ≤ 0.01) Altamente significativo. C.V.= 16.98%

Se muestra en el Cuadro 22 que cada especie pertenece a un grupo diferente, presentando el promedio mayor *D. remotiflora* y por consiguiente *D. sparsiflora* el promedio menor.

Cuadro 22. Comparación de medias del número de cloroplastos en los estomas entre especies.

Espece	Media	Observaciones	Grupo
(Número de cloroplastos por estoma)			
<i>D. remotiflora</i>	13.59	7	A
<i>D. sparsiflora</i>	11.91	93	B

Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha = 0.05$ )

## 6.6. Análisis de las características de los estomas

Los estomas son estructuras de gran importancia en el proceso de la fotosíntesis, en este trabajo se evaluó el largo, ancho y densidad. Existe una correlación altamente significativa entre la densidad de estomas con el número de cloroplastos (Cuadro 23), el coeficiente de correlación se presenta de forma negativa, por lo tanto a mayor cantidad de estomas que se presentan en un área determinada menor es la cantidad de cloroplastos en las células de los estomas. Lo cual también reportaron Rodríguez *et al.* (2000), quienes al aclimatar plantas de caña de azúcar de condiciones *in vitro* a *ex vitro*, evaluando entre otras variables la densidad de estomas y la cantidad de clorofila total presente en la planta; sus resultados revelan un aumento de la densidad de estomas.

Cuadro 23. Correlación de la densidad de estomas con el peso de la cosecha, índice de productividad, ploidía, ancho de la hoja, largo de la hoja, área de la hoja, cloroplastos en los estomas, ancho de estomas y largo de estomas.

Variable	Coefficiente de correlación	Probabilidad	Número de observaciones
Peso de cosecha (kg)	-0.15	0.1261	99
Índice de productividad	0.07	0.4992	99
Ploidía	0.13	0.2065	99
Ancho de la hoja (cm)	-0.23	0.0255*	97
Largo de la hoja (cm)	-0.15	0.1525	97
Área de la hoja (cm <sup>2</sup> )	-0.19	0.0601	97
Cloroplastos en los estomas	-0.36	0.0002**	100
Ancho de estomas (µm)	-0.14	0.1555	97
Largo de los estomas (µm)	-0.04	0.6722	97

\* = (P ≤ 0.05) Significativo \*\* = (P ≤ 0.01) Altamente significativo



## 6.7. Análisis de la hoja

Las hojas presentan una gran importancia para las plantas, por ser un órgano encargado de la fotosíntesis, la forma y tamaño de la hoja es muy variable; dependiendo de la especie. En la Cuadro 24 se muestra que el ancho de las hojas presentan correlación significativa entre la densidad y ancho de los estomas, y correlación altamente significativa para largo de los estomas. La densidad de estomas se correlaciona de manera negativa es decir: las plantas que tienen hojas más anchas presentan una densidad de estomas menor, que las de hojas más grandes, la correlación que presentan el ancho de las hojas con el ancho y largo de los estomas es positiva. Este comportamiento de los estomas con las hojas reflejan que las plantas al tener hojas pequeñas aumentan la cantidad de estomas para realizar de manera eficiente el intercambio gaseoso (Betancourth *et al.* 2008).

Cuadro 24. Correlación del ancho de la hoja con el peso de la cosecha, ploidía, densidad de estomas, cloroplastos en los estomas, ancho de estomas y largo de estomas.

Variable	Coefficiente de correlación	Probabilidad	Número de observaciones
Peso de cosecha (kg)	0.24	0.0192*	97
Ploidía	-0.01	0.9149	97
Densidad de estomas	-0.23	0.0255*	97
Cloroplastos en los estomas	0.01	0.9196	97
Ancho de estomas ( $\mu\text{m}$ )	0.21	0.0362*	97
Largo de estomas ( $\mu\text{m}$ )	0.28	0.0051**	97

\* = ( $P \leq 0.05$ ) Significativo \*\* = ( $P \leq 0.01$ ) Altamente significativo

En el caso de las especies de estudio son altamente significativos el ancho y largo de los estomas para el largo de la hoja (Cuadro 25). El coeficiente de correlación es positivo.

Cuadro 25. Correlación del largo de la hoja con el peso de la cosecha, ploidía, densidad de estomas, cloroplastos en los estomas, ancho de estomas y largo de estomas.

Variable	Coefficiente de correlación	Probabilidad	Número de observaciones
Peso de cosecha (kg)	0.18	0.0800	97
Ploidía	0.04	0.6637	97
Densidad de estomas	-0.15	0.1525	97
Cloroplastos en los estomas	-0.10	0.3279	97
Ancho de estomas ( $\mu\text{m}$ )	0.28	0.0052**	97
Largo de los estomas ( $\mu\text{m}$ )	0.33	0.0008**	97

\* = ( $P \leq 0.05$ ) Significativo \*\* = ( $P \leq 0.01$ ) Altamente significativo

Se determinó una correlación positiva que presentan el área de la hoja con el ancho y largo de los estomas (Cuadro 26), siendo significativa y altamente significativa respectivamente. Tomando en cuenta los Cuadros 24, 25 y 26 se puede decir que los estomas y las características que presentan las hojas (largo, ancho y área) están muy relacionadas una con la otra (Yoshizumi *et al.* 2008; Heping *et al.* 2008).

Cuadro 26. Correlación del área de la hoja con el peso de la cosecha, ploidía, densidad de estomas, cloroplastos en los estomas, ancho de estomas y largo de estomas.

Variable	Coefficiente de correlación	Probabilidad	Número de observaciones
Peso de cosecha (Kg)	0.18	0.0745	97
Ploidía	-0.02	0.8712	97
Densidad de estomas	-0.19	0.0601	97
Cloroplastos en los estomas	-0.05	0.6382	97
Ancho de estomas ( $\mu\text{m}$ )	0.23	0.0216*	97
Largo de los estomas ( $\mu\text{m}$ )	0.29	0.0034**	97

\* = ( $P \leq 0.05$ ) Significativo \*\* = ( $P \leq 0.01$ ) Altamente significativo

## 6.8. Análisis de los tubérculos

Los tubérculos son la estructura que almacena la mayor parte de los compuestos que elaboran las plantas, en el camote de cerro es importante conocer qué factores influyen en el crecimiento y desarrollo del tubérculo, debido a su importancia como fuente de alimento. Existe una correlación altamente significativa (Cuadro 27), entre la cantidad de tubérculo de siembra y la cantidad que se cosecha (índice de productividad), la correlación que presenta con el peso de cosecha es una correlación positiva, es decir: al aumentar el peso de la cantidad de tubérculos que se plantaron, aumento el peso de la producción; en campo se ha observado que los brotes que se plantan a partir de tubérculos con mayor peso, presentan tallos más robustos y vigorosos (Ferguson 1977; citado por Rodríguez 2000); en las

dioscoreas, la parte aérea de la planta (hojas y tallos) se pierden en la temporada de estiaje, quedando solamente el tubérculo, el cual es un órgano de almacenamiento. Las especies del estado de Jalisco en el mes de mayo comienzan a rebrotar utilizando la energía y los demás elementos de reserva que se encuentran almacenados en él (Rodríguez *et al.* 2008). Las plantas que provienen de tubérculos grandes, pueden presentar mayor capacidad para competir por los espacios en la captación de luz. La variable índice de productividad es altamente significativa pero de manera negativa. Las plantas que se originaron a partir de tubérculos de bajo peso, almacenan la mayor cantidad de sustancias de reservas para el siguiente ciclo, lo cual les permitirá sobrevivir y tener energía para desarrollar los nuevos tallos que emergen de la tierra. Siendo las especies de *Dioscorea* importantes por el consumo del tubérculo y la obtención de productos para la industria farmacéutica y cosmética, es importante estudiar el desarrollo del tubérculo con fines de producción (Rodríguez 2000; Cronin y Draelos 2010; Guízar *et al.* 2008).

Cuadro 27. Correlación del peso de siembra del tubérculo con el peso de cosecha e índice de productividad.

Variable	Coefficiente correlación	Probabilidad	Número de observaciones
Peso de cosecha (kg)	0.62	<.0001**	99
Índice de productividad	-0.58	<.0001**	99

\* = (P ≤ 0.05) Significativo \*\* = (P ≤ 0.01) Altamente significativo

El peso del tubérculo de la cosecha presenta correlación altamente significativa para el número de cloroplastos en los estomas (Cuadro 28), y es significativo para el índice de productividad y ancho de la hoja. La correlación que presenta el peso del tubérculo con el número de cloroplastos, es debido a que los estomas en conjunto con los cloroplastos juegan un papel fundamental en la fotosíntesis, dicho proceso es el inicio para realizar una

serie de eventos en cadena, para la elaboración de compuestos necesarios en el desarrollo de las plantas que se almacenan en el tubérculos (Schwartz y Zeiger 1984). El peso de cosecha del tubérculo, presenta correlación con el ancho de las hojas, de manera positiva, las plantas que proceden de tubérculos grandes presentan hojas de mayor tamaño.

Cuadro 28. Correlación del peso de cosecha del tubérculo con el índice de productividad, ploidía, ancho de la hoja, largo de la hoja, área de la hoja, densidad de estomas, cloroplastos en los estomas, ancho de estomas y largo de estomas.

Variable	Coefficiente de correlación	Probabilidad	Número de observaciones
Índice de productividad	-0.30	0.0024**	99
Ploidía	0.03	0.78970	99
Ancho de la hoja (cm)	0.24	0.0192*	97
Largo de la hoja (cm)	0.18	0.0800	97
Área de la hoja (cm <sup>2</sup> )	0.18	0.0745	97
Densidad de estomas	-0.15	0.1261	99
Cloroplastos en los estomas	0.32	0.0010**	99
Ancho de estomas (µm)	0.19	0.0608	97
Largo de estomas (µm)	0.12	0.2441	97

\* = (P ≤ 0.05) Significativo \*\* = (P ≤ 0.01) Altamente significativo

El análisis de correlación del Cuadro 29 indica que el índice de productividad, solamente tiene correlación con el largo, ancho y área de la hoja, siendo altamente significativo para éstas variables, el coeficiente de correlación se presenta de manera negativa. Es decir:

conforme las variables de las características de las hojas (largo, ancho y área) aumentan de tamaño, las plantas son menos productivas, esto coincide con lo que señala Betancourth *et al.* (2008); ellos mencionan que en las plantas con un índice de área foliar pequeño no se afecta a la productividad, sino más bien depende, del potencial que tiene cada genotipo para crecer y desarrollarse, lo cual dependerá de la cantidad de energía solar que capten, la eficiencia fotosintética de sus hojas y la forma y rapidez del transporte de los asimilados. Tomando en cuenta lo observado en los Cuadros 2 y 4 se observa que el tamaño de las hojas como el peso de tubérculo plantado, presentan una correlación de forma negativa con respecto del índice de productividad, por lo tanto se puede percibir que el peso de tubérculo que se planta afecta también el tamaño de las hojas.

Cuadro 29. Correlación del índice de productividad del tubérculo con la ploidía, ancho de la hoja, largo de la hoja, área de la hoja, densidad de estomas, cloroplastos en los estomas, ancho de estomas y largo de estomas.

Variable	Coefficiente de correlación	Probabilidad	Número de observaciones
Ploidía	0.01	0.9303	99
Ancho de la hoja (cm)	-0.33	0.0010**	97
Largo de la hoja (cm)	-0.28	0.0053**	97
Área de la hoja (cm <sup>2</sup> )	-0.29	0.0033**	97
Densidad de estomas	0.07	0.4992	99
Cloroplastos en los estomas	-0.15	0.1427	99
Ancho de estomas (µm)	-0.16	0.1160	97
Largo de estomas (µm)	-0.08	0.4185	97

\* = (P ≤ 0.05) Significativo \*\* = (P ≤ 0.01) Altamente significativo

## 6.9. Modelo matemático del área de la hoja

De acuerdo a lo que presenta IPGRI (1997) en el descriptor para hoja de *Dioscorea*, se presentan siete tipos de bases y tres diferentes tipos de ápices de hoja, en las especies que se trabajaron se encontró un sólo un tipo de ápice, el agudo, por lo cual se clasificaron de acuerdo a la base de la hoja que fueron cuatro diferentes que son: cordada larga, cordada amplia, sagitada larga y sagitada amplia (Figura 6). Este modelo matemático para

determinar el área de las hojas nos permite tener una alternativa no destructiva para este fin, solamente utilizando el tipo de base de la hoja que presenta, más el largo y ancho nos permite determinar cuál es el área de la hoja. Este órgano de planta presenta funciones importantes para la producción y captación de energía, y está muy ligado a los procesos que realizan los estomas y los cloroplastos presentes en la hoja, por lo tanto las características que presentan las hojas afectan de manera directa los procesos fisiológicos de la planta.

Se encontraron 305 hojas del tipo cordada larga en las accesiones revisadas, el valor de  $R^2$  que se obtuvo fue de: 97.52 con un valor de del error estándar de 4.76397 y un valor de  $P = 0.0000$  donde se generó la siguiente ecuación:

$$\text{Área} = 12.0614 + 1.53321 \times \text{ancho} - 3.63854 \times \text{largo} + 0.330119 \times \text{ancho}^2 + 0.38741 \times \text{largo}^2$$

Para el tipo de hoja cordada amplia se obtuvo un valor de  $R^2$  de: 98.50 y el valor de error estándar de 3.83398 y un valor de  $P = 0.0000$ , esta forma de hoja es la más abundante entre las plantas que se estudiaron con un total de 572 con las cuales se obtuvo la siguiente ecuación.

$$\text{Área} = 2.99652 - 1.93745 \times \text{ancho} + 1.20168 \times \text{largo} + 0.515792 \times \text{ancho}^2 + 0.171622 \times \text{largo}^2$$

El análisis de regresión para el tipo de hoja sagitada larga, se encontró el valor de  $P = 0.0000$  y el error estándar es de 4.25547, arrojo un valor de  $R^2$  de: 97.69 este tipo de hojas es la que presenta menor presencia en el material de estudio con tan sólo 42 hojas para la cual se generó la siguiente ecuación.

$$\text{Área} = -5.83358 - 8.84184 \times \text{ancho} + 7.75545 \times \text{largo} + 0.746276 \times \text{ancho}^2$$

Para el tipo de hoja sagitada amplia se obtuvo un valor de  $R^2$  de: 97.19 y un valor del error estándar de 5.93067 y el valor de  $P = 0.0000$  de donde se obtuvo la siguiente ecuación.

$$\text{Área} = 31.9741 + 0.800874 \times \text{largo}^2 + 10.1298 \times \text{ancho} - 14.3364 \times \text{largo}$$



Al analizar las hojas de cada accesión se observó que una planta puede presentar de uno o dos tipos de hojas pero en muy pocos casos se observaron que existieran hojas cordada y sagitada en la misma planta por lo que se puede pensar que si las plantas tiene hojas largas o amplias depende de algunos factores como la cantidad de luz que recibe y posición de la hoja.

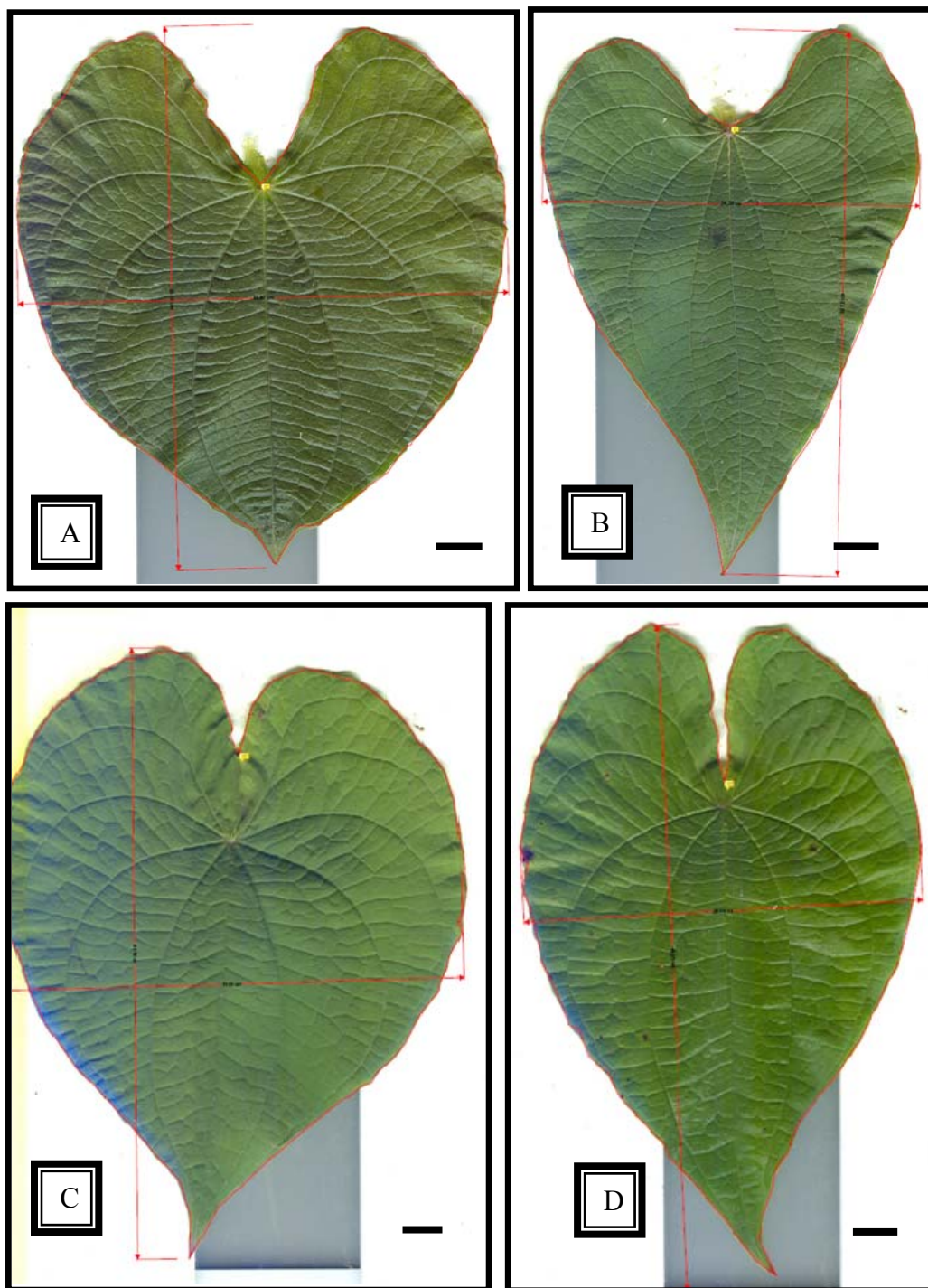


Figura 6. Variación del tipo de hojas en *D. remotiflora* y *D. sparsiflora*. (Barra = 1 cm). A) Cordada amplia. B) Cordada larga. C) Sagitada amplia D) Sagitada larga.

## 7. CONCLUSIONES

- I. No existe una relación entre la densidad de estomas y el nivel de ploidía en las 100 accesiones del estado de Jalisco que se estudiaron en este trabajo por lo tanto rechazamos la hipótesis planteada.
- II. Se pueden realizar preparaciones citogenéticas con la metodología propuesta en este trabajo.
- III. No se encontró una relación entre los niveles de ploidía y número de estomas por campo visual, pero si existe relación con el ancho de los estomas y el número de cloroplastos presentes en las células guardas de los estomas.
- IV. Al analizar las accesiones de las diferentes localidades se observó que entre ellas se encuentra variabilidad en los niveles de plodias, índice de productividad, nivel de ploidía, densidad de estomas, número de cloroplastos en los estomas, ancho y largo de los estomas.
- V. Las especies presentan diferencias en número de cloroplastos en los estomas.
- VI. Los niveles de ploidía no presentan relación con la producción del tubérculo debido a que no existió significancia con el peso del tubérculo de la cosecha ni con el índice de productividad.
- VII. Se generó un modelo matemático para determinar el área de la hoja, utilizando el largo, ancho y más el tipo de base de la hoja, se pueden estimar el valor del área; este método se propone como alternativa no destructiva para obtener el valor del área de la hoja
- VIII. Se observó que el peso del tubérculo plantado influye en el peso del tubérculo de la cosecha y en el índice de productividad.

## 8. LITERATURA CITADA

- Abdulrahaman A. , F. Egedo y F. Oladele.** 2009. Stomatal complex types, stomatal density, and the stomatal index in some species of *Dioscorea*. Arch. Biol. Sci. Bel. 61 (4): 847-851.
- Abraham K.** 1998. Occurrence of hexaploid males in *Dioscorea alata* L. Euphytica. 99: 5-7.
- Arnau G., A. Nemorin, E. Maledon y K. Abraham.** 2009. Revision of ploidy status of *Dioscorea alata* L. (Dioscoreaceae) by cytogenetic and microsatellite segregation analysis. Theor. Appl. Genet. 118:1239–1249.
- Asiedu R y A. Sartie.** 2010. Crops that feed the world 1. Yams. Food Sec. 2:305–315
- Baquar S.** 1980. Chromosome behaviour in nigerian yams (*Dioscorea*). Genet. 54:1-9
- Barba-Gonzalez R., A. A. Van Silfhout, R. G. Visser, M. S. Ramanna y J. M. Van Tuyl.** 2006 Progenies of allotriploids of Oriental × Asiatic lilies (*Lilium*) examined by GISH analysis. Euphytica. 151:243–250
- Betancourth G. , E. Portilla y H. Salas.** 2008. Evaluación de la reacción de nueve genotipos de papa (*Solanum tuberosum* subsp. *andigena*) al ataque de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. Agro. Colom. 26(3): 411-416
- Bousalem M., G Arnau, I. Hochu, R. Arnolin V. Viader S. Santoni y J. David.** 2006. Microsatellite segregation analysis and cytogenetic evidence for tetrasomic inheritance in the American yam *Dioscorea trifida* and a new basic chromosome number in the Dioscoreae. Theor. Appl. Genet. 113:439–451
- Choque E., R. Espinoza, X. Cadima, J. Zeballos y J. Gabriel.** 2007. Resistencia a helada en germoplasma de papa nativa de Bolivia. Rev. ALAP. 14(1): 24-32.

- Cronin H. y Z. Draelos.** 2010. Top 10 botanical ingredients in 2010 anti-aging creams. *J. Cosm. Derm.* 9: 218-225.
- Dansi A., H. Mignouna, M. Pillay y S. Zok.** 2001. Ploidy variation in the cultivated yams (*Dioscorea cayenensis-Dioscorea rotundata* complex) from Cameroon as determined by flow cytometry. *Euphytica.* 119: 301–307.
- Dzierzynska A.** 2006. The role of cytoskeleton in stomata functioning. *Acta. Physiol. Plant.* 28(1): 59-79
- Egesi C., M. Pillay, R. Asiedu y J. Egunjobi.** 2002. Ploidy analysis in water yam, *Dioscorea alata* L. germplasm. *Euphytica.* 128: 225–230.
- FAOSTAT.** 2009. Datos estadísticos. <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=567&lang=es#ancor>. consultado 18 de octubre de 2010.
- Flores-Vindas E.** 1999. La planta; estructura y función. LUR. Cartago, Costa Rica. pp 884.
- Gamiette F., F. Bakry y G. Ano.** 1999. Ploidy determination of some yam species (*Dioscorea spp.*) by flow cytometry and conventional chromosomes counting. *Genetic Res. Crop. Evol.* 46: 19-27.
- García A.** 1990. Técnicas y procedimientos de citogenética vegetal. COLPOS. Estado de México. p. 114
- Guízar A., J. Montañéz e I. García.** 2008. Parcial caracterización de nuevos almidones obtenidos del tubérculo de camote del cerro (*Dioscorea spp*). *Rev. Iber. Tec. Postc.* 9:81-88.
- Hegarty M. y S. Hiscock.** 2008. Genomic clues to the evolutionary success of review polyploid plants. *Curr. Biol.* 18:435–444
- Heping H., G. Shanlin, C. Lanlan y J. Xiaoke.** 2008. *In vitro* induction and identification of autotetraploids of *Dioscorea zingiberensis*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 44:448–455.

- Hinke N.** 2008. El barbasco. *Ciencias*. 89:54-57
- Huerta C.** 1998. El barbasco: paradigma y paradoja de la riqueza vegetal de México. *Biodiversitas*. 18:8-13.
- Imery-Buiza J. y H. Cequea-Ruíz.** 2001. Evaluación citogenética de la generación M1V2 de tetraploides experimentales en sábila (*Aloe vera* L.). *Revi. UDO. Agrícola*. 1: 29-33.
- IPGRI/IITA.** 1997. Descriptors for Yam (*Dioscorea* spp.). International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Janaki E., y S. Singh.** 1962. Induced tetraploidy in *Dioscorea deltoidea* Wall. *Proc. Ind. Acad. Sci., B*. 56: 329-331.
- Kato T., C. Mapes, L. Mera, J. Serratos y R. Bye.** 2009. Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. 116 pp.
- Kouakou A., J. Noyer, G. Zohouri, P. Vernier, H. Mignouna, C. Kouame y A. Sangare.** 2007. Ploidy status of *Dioscorea alata* L. and its relationship with resistance to anthracnose in Côte D'ivoire. *Agron. Afric.* 19 (1): 13-20.
- Krishnaswami R y R Andal.** 1977. Stomatal chloroplast number in diploids and polyploids of *Gossypium*. *India Acad. Sci.* 87:109-112
- León J.** 1987. Botánica de los cultivos tropicales. *Ins. Inter Agri. Costa Rica*. p. 78.
- Lin M., D. Comings y O. Alfi.** 1977. Optical studies of the interaction of 4'-6-diamidino-2-phenylindole with DNA and metaphase chromosomes. *Chromosoma*. 60:15-25
- Martin F. y S. Ortiz.** 1963. Chromosome numbers and behavior in some species of *Dioscorea*. *Cytologia*. 28: 96-101.

- Moreno-Pérez E. , A. García-Velázquez y C. Avendaño-Arrazate.** 2009. Estudio citológico en poblaciones diploides y poliploides del género *Tripsacum*. *Interciencia*. 34 (11):791-795.
- Mostul B. y M. Cházaro.** 1996. Camote del cerro: una dioscorea comestible de México. *Cact. Succ. J.* 68(1):6-8.
- Nadal-Medina R., G. Manzo-Sánchez, J. Orozco-Romero, M. Orozco-Santos y S. Guzmán-González.** 2009. Diversidad genética de bananos y plátanos (*Musa* spp.) determinada mediante marcadores RAPD. *Rev. Fitotec. Mex.* 32 (1): 1-7.
- Niño J., D. Jiménez, O. Mosquera e Y. Correa.** 2007. Diosgenin in quantification by HPLC in *Dioscorea polygonoides* tuber collection. *J. Braz. Chem. Soc.* 18:1073-1076.
- Obidiegwu J., J. Loureiro, E. Ene-Obong, E. Rodriguez, M. Kolesnikova-Allen, C. Santos, C. Muoneke y R. Asiedu.** 2009. Ploidy level studies on the *Dioscorea cayenensis/Dioscorea rotundata* complex core set. *Euphytica*. 169:319–326.
- Orrillo M. y M. Bonierbale.** 2009. Manual técnico biología reproductiva y citogenética de la papa. Red. ALAP/CIP. p.22
- Poggio L., S. Espert y R. Fortunato.** 2008. Citogenética evolutiva en leguminosas americanas. *Rodriguésia* 59 (3): 423-433.
- Qin X. y G. Rotino.** 1995. Chloroplast number in guard cells as ploidy indicator of *in vitro-grown* androgenic pepper plantlets. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 41: 145-149.
- Raina S. y V. Rani.** 2001. GISH technology in plant genome research. *Meth. Cell Sci.* 23: 83-104
- Raju J. y R. Mehta.** 2009. Cancer chemopreventive and therapeutic effects of diosgenin, a food saponin. *Nutr. Canc.* 61(1): 27–35.
- Ramachandran K.** 1968. Cytological studies in *Dioscoreaceae*. *Cytologia*. 33: 401-410

- Ramírez R. y O. Téllez-Valdéz.** 1992. Las Dioscóreas (Dioscoreaceae) del estado de Morelos, México. Anal. Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México, ser. Bot. 63(1):67-99.
- Ramírez R., O. Vargas, H. Arreola, M. Cedano, R. González, L. González, M. Haker, L. Hernández, R. Martínez, J. Pérez, A. Rodríguez, J. Reynoso, L. Villarreal y J. Villaseñor.** 2010. Catálogo de plantas vasculares de Jalisco. Prometeo editores. Jalisco, México. p. 143
- Robertis D. y M. Robertis.** 1987 Cell and molecular biology. Lea & Febiger. p. 734.
- Rodríguez M.** 1995. Cariotipo y patrones de bandeo c. en *Buffo spinulosus arequipensis*. Rev. Ecol. Lat. Am. 2:5-11
- Rodríguez W.** 2000. Botánica, domesticación y fisiología del cultivo del ñame (*Dioscorea alata*). Agro. Mesoam. 11(2):133-152.
- Rodríguez M., J. Matehus, A. Gerstl y M. Santana.** 2008. Identificación del agente causal de una bacteriosis en ñame (*Dioscorea alata* L.). Interciencia. 7:532- 536.
- Rodríguez M., Y. Rodríguez, M. Cid y J. González-Olmedo.** 2000. Aclimatización de plántulas de caña de azúcar (*Saccharum* sp. *híbrido*) provenientes de sistemas de inmersión temporal. Cult. Trop. 21(3):51-56.
- Rojas M., M. Rovalo.** 1981. Fisiología vegetal aplicada. McGraw-Hill . pp. 158-175.
- Ronceret A., M. Sheehan y W. Pawlowski.** 2007. Chromosome dynamics in meiosis. Plant Cell Mon. 9:103-124.
- Santos A., E. Wegel, G. Allen, W. Thompson, E. Stoger, P. Shaw y R. Abranches.** 2006. *In situ* methods to localize transgenes and transcripts in interphase nuclei: a tool for transgenic plant research. Plant Meth. 2:18-21.
- Sañudo A. y M. Ruiz.** 1975. Sobre la naturaleza autoploide de algunas plantas silvestres. Anal. Inst. Bot. Cav. 32(2):633-648.



- SAS institute.** 2009. SAS/STAT user's guide, Version 9. SAS inst., Cary NC.
- Schwartz A. y E. Zeiger.** 1984. Metabolic energy for stomatal opening: roles of photophosphorylation and oxidative phosphorylation. *Planta*. 161:129-136.
- Sen J., G. Mitra y A. Sharma.** 1991. An evaluation of a somaclone of *Dioscorea floribunda* Mart & Gall. *Experientia*. 41:283-285.
- Simmonds N.** 1948. Genetical and cytological studies of *Musa* x. stomatal size and plant vigour in relation to polyploidy. *J. Genet.* 49:57-68.
- Solís M.** 2001. Bando de cromosomas humanos con extracto crudo de frutas u hojas de papaya. *Rev. Biol. Trop.* 49(3-4): 1223-1226
- Solís V. y Fernández A.** 2005. Evidencias citológicas del origen autoploide del complejo *Turnera sidoides* L. (Turneraceae). *UNNE*. B:22
- Statgraphics Plus.** 1992. Reference Manual; Manugistics: Rockville, MD.
- Téllez O.** 1996. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán: fascículo 9 Dioscoreaceae. Departamento de Botánica Instituto de Biología, UNAM. pp. 3-13.
- Toral M., A. Manríquez, R. Navarro-Cerrillo, D. Tersí y P. Naulin.** 2010. Características de los estomas, densidad e índice estomático en secuoya (*Sequoia sempervirens*) y su variación en diferentes plantaciones de Chile. *Bosque*. 31(2): 157-164, 2010.
- Van Laere K., S. C. Franca, H. Vansteenkiste, J. Van Huylenbroeck, K. Steppe y M-C. Van Labeke.** 2011. Influence of ploidy level on morphology, growth and drought susceptibility in *Spathiphyllum wallisii*. *Acta. Physiol. Plant.* 33:1149-1156.
- Vandenhout H., R. Ortiz, D. Vuylsteke, R. Swennen y K. Bai.** 1995. Effect of ploidy on stomatal and other quantitative traits in plantain and banana hybrids. *Euphytica*. 83: 117-122.

**Wai C., R. Ming, P. Moore, R. Paull y Q. Yu.** 2010. Development of chromosome-specific cytogenetic markers and merging of linkage fragments in papaya. *Trop. Plant Biol.* 3:171–181

**Wendel J.** 2000. Genome evolution in polyploids. *Plant Mol. Biol.* 42: 225-249.

**Yoshizumi T., C. Breuer, M. Matsui y K. Sugimoto-Shirasu.** 2008. Plant cell growth signalling and its link to ploidy. *Plant. Cell. Mon.* 10:107-125.

## APÉNDICE

Cuadro 1A. Estadística descriptiva

VARIABLES	N	Media	Desviación estándar	Suma	Mínimo	Máximo
Ploidía	99	33.73737	8.27904	3340	20.00000	60.00000
Peso de siembra (Kg)	99	0.27263	0.22219	0.00800	0.00800	1.35000
Peso de cosecha (Kg)	99	1.06760	0.45999	105.69200	0.22000	2.47000
Índice de productividad	99	7.11788	6.81042	704.67019	0.47279	43.75000
Ancho de la hoja (cm)	97	9.46754	1.80306	918.35185	5.03097	15.30020
Largo de la hoja (cm)	97	2.05986	2.05986	1063	6.48622	16.67802
Área de la hoja (cm <sup>2</sup> )	97	68.00295	26.34913	6596	20.62869	154.83607
Densidad de estomas	100	10.60027	10.60027	3220	15.75000	68.40000
Cloroplastos en estomas	100	12.02450	2.07747	1202	8.15000	17.25000
Ancho de estomas (µm)	97	19.06358	1.41021	1849	16.22950	23.09850
Largo de los estomas(µm)	97	27.50239	2.14181	2668	21.93400	33.44700