

In vitro mutagenesis in anthurium induced by colchicine

Mutagénesis *in vitro* en auturio inducida mediante colchicina

María Isabel López-Martínez; Alejandrina Robledo-Paz*; Luis Antonio Flores-Hernández; Tarsicio Corona-Torres; María Alejandra Gutiérrez-Espinosa; Martha Hernández-Rodríguez; Gabino García-de los Santos

Colegio de Postgraduados, Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México, C. P. 56230, MÉXICO.

*Corresponding author: arobledo@colpos.mx, tel. 52 (595) 95 20 200 ext. 1581.

Abstract

Developing new varieties of anthurium (*Anthurium andreanum* L.) by hybridization can take 8-10 years; therefore, induced mutagenesis can be an alternative strategy to hybridization. The objective of this work was to induce mutations in anthurium by exposing explants obtained from vitroplants to colchicine. Explants of leaves, nodes and roots obtained from vitroplants were exposed to 0.1 % colchicine for 0, 2, 3 and 4 h. The mean lethal dose (LD₅₀), survival, number of explants that generated callus, number of explants that formed shoots and the number of shoots per explant were evaluated. The karyotype of the presumed mutated regenerated plants was determined by the root apex squash technique. The leaves showed the highest sensitivity to colchicine. The survival of the root explants treated with colchicine was 100 %; 4 % of roots exposed for 2 and 3 h formed adventitious shoots (120 shoots). For nodes, the LD₅₀ was found at 3.98 h; 76 and 56 % of the nodes cultivated for 2 and 3 h with colchicine formed adventitious shoots (4.4 and 3.6 shoots). The plants regenerated from the explants exposed to colchicine showed morphological changes. The chromosomal number of the regenerated vitroplants from the explants exposed for 2 and 3 h to colchicine was 2n = 29, while that of those obtained from the explants that remained on the colchicine for 4 h was 2n = 31. The sensitivity to colchicine was a function of the type of explant and the dose used. Colchicine caused the loss (monosomy) or gain of chromosomes (trisomy).

Keywords: *Anthurium andreanum* L., aneuploids, cytogenetics, plant regeneration, tissue culture.

Resumen

Desarrollar variedades nuevas de anturio (*Anthurium andreanum* L.) mediante hibridación puede llevar entre 8 y 10 años; por ello, la mutagénesis inducida puede ser una estrategia alterna a la hibridación. El objetivo de este trabajo fue inducir mutaciones en anturio mediante la exposición a colchicina de explantes obtenidos de vitroplantas. Explantes de hojas, nudos y raíces provenientes de vitroplantas se expusieron a 0.1 % de colchicina durante 0, 2, 3 y 4 h. Se evaluaron la dosis letal promedio (DL₅₀), la supervivencia, el número de plantas que generaron callo, el número de plantas que formaron brotes y el número de brotes por explante. El cariotipo de las plantas regeneradas por presunta mutación se determinó mediante la técnica *squash* en ápice de raíz. Las hojas presentaron la mayor sensibilidad a la colchicina. La supervivencia de los explantes de raíz tratados con colchicina fue de 100 %, y 4 % de las raíces expuestas durante 2 y 3 h formaron brotes adventicios (120 brotes). En el caso de los nudos, la DL₅₀ se encontró a 3.98 h; 76 y 56 % de los nudos cultivados con colchicina por 2 y 3 h, respectivamente, formaron brotes adventicios (4.4 y 3.6 brotes). Las plantas regeneradas a partir de explantes expuestos a colchicina mostraron cambios morfológicos. El número cromosómico de las vitroplantas regeneradas a partir de explantes expuestos a colchicina durante 2 y 3 h fue 2n = 29, mientras que el de aquellas obtenidas a partir de los explantes que permanecieron en colchicina por 4 h fue 2n = 31. La sensibilidad a la colchicina fue una función del tipo de explante y la dosis utilizada. La colchicina causó la pérdida (monosomía) o la ganancia de cromosomas (trisomía).

Palabras clave: *Anthurium andreanum* L., aneuploides, citogenética, regeneración vegetal, cultivo de tejidos.

Please cite this article as follows (APA 6): López-Martínez, M. I., Robledo-Paz, A., Flores-Hernández, L. A., Corona-Torres, T., Gutiérrez-Espinosa, M. A., Hernández-Rodríguez, M., & García-de los Santos, G. (2022). *In vitro* mutagenesis in anthurium induced by colchicine. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 28(1), 17-34. doi: 10.5154/r.rchsh.2021.06.011

Received: May 31, 2021 / Accepted: September 23, 2021.



Revista Chapingo
Serie Horticultura

www.chapingo.mx/revistas/horticultura

Introduction

Anthuriums (*Anthurium andreanum* L.) are plants native to Central and South America that belong to the genus *Anthurium*; these are in high demand because they produce very showy flowers all year round and have a long postharvest life, characteristics that give them great acceptance in the national and international market (Castillo-Diego, 2012). Anthuriums are the second most important tropical cut flowers, after orchids (Buldewo & Jaufeerally-Fakim, 2002).

The Netherlands is the world's leading producer of anthuriums, growing 25 thousand stems a year, followed by Hawaii (11 thousand) and Mauritius (10.2 thousand) (Guillot-Ortíz, 2008). In Mexico, anthuriums are grown in approximately 20 ha, distributed in the states of Veracruz, Chiapas and Mexico (Gallaga, 2000). *Anthurium andreanum* and *Anthurium scherzerianum* are the most cultivated species in Mexico and in the world (Gantait & Mandal, 2010). *A. andreanum* is the most important species from an economic standpoint, since it has the largest number of commercial varieties (López-Puc, Ramírez-Mosqueda, & Lee-Espinosa, 2013).

The main varieties of anthurium used in the world are of Dutch origin and have been formed by hybridization (Hernández, 2004), as well as by genetic transformation methods; however, developing a new cultivar by these methods may require 8-10 years (Azadi, Bagheri, Nalouisi, Nazari, & Chandler, 2016; Su et al., 2019). The genetic material of the main species that are commercialized in Mexico is imported from the Netherlands, which creates a complete dependency on germplasm (Ramírez-Zea & Chávez-Servia, 2014). Likewise, the development of new production areas in developing countries requires new varieties with the ability to adapt well to new growing conditions. In the same way, European producers are constantly looking for novel cultivars as a market strategy to be competitive, so the need for new varieties has shown an unprecedented increase at international level (Gupta & Agnihotri, 2017).

Induced mutagenesis is a technique that has been used to improve traits such as resistance to diseases and pests, and the generation of genetic variability (Ahloowalia, Maluszynski, & Nichterlein, 2004). This technique is based on the use of physical stimuli or chemical substances (mutagens) (González-Jiménez, 2004; Messmer et al., 2015). Chemical mutagenic agents such as colchicine generate genetic variations, such as chromosome duplication (polyploidy) (Eng & Ho, 2018). Polyploidy can generate variants with desired characteristics such as increased flower size, flowers with more showy colors and shapes, increased postharvest life, and greater resistance to abiotic or

Introducción

Los anturios son plantas nativas de Centro- y Sudamérica que pertenecen al género *Anthurium*, y son altamente demandadas porque producen flores muy vistosas durante todo el año y tienen una larga vida poscosecha; características que les confieren gran aceptación en los mercados nacional e internacional (Castillo-Diego, 2012). Los anturios son las segundas flores tropicales de corte más importantes después de las orquídeas (Buldewo & Jaufeerally-Fakim, 2002).

Los Países Bajos son el primer productor mundial de anturios, cultivando 25 mil tallos al año, seguidos de Hawai (11 mil) y las Islas Mauricio (10.2 mil) (Guillot-Ortíz, 2008). En México, los anturios se cultivan en aproximadamente 20 ha, distribuidas en los estados de Veracruz, Chiapas y México (Gallaga, 2000). *Anthurium andreanum* y *Anthurium scherzerianum* son las especies más cultivadas en México y en el mundo (Gantait & Mandal, 2010). *A. andreanum* es la especie más importante desde el punto de vista económico, ya que cuenta con el mayor número de variedades comerciales (López-Puc, Ramírez-Mosqueda, & Lee-Espinosa, 2013).

Las principales variedades de anturios utilizadas en el mundo son de origen holandés y han sido creadas por hibridación (Hernández, 2004), así como por métodos de transformación genética; sin embargo, desarrollar un nuevo cultivar mediante estos métodos puede requerir de 8 a 10 años (Azadi, Bagheri, Nalouisi, Nazari, & Chandler, 2016; Su et al., 2019). El material genético de las principales especies comercializadas en México es importado de los Países Bajos, lo cual crea una dependencia total de germoplasma (Ramírez-Zea & Chávez-Servia, 2014). Asimismo, el desarrollo de nuevas zonas de producción en países en desarrollo requiere de nuevas variedades con capacidad de adaptarse bien a las nuevas condiciones de cultivo. Del mismo modo, los productores (europeos) buscan constantemente nuevos cultivares como estrategia de mercado para ser competitivos, por lo que la necesidad de nuevas variedades ha mostrado un aumento sin precedentes a nivel internacional (Gupta & Agnihotri, 2017).

La mutagénesis inducida es una técnica que se ha utilizado para mejorar características tales como la resistencia a enfermedades y plagas, y para la generación de variabilidad genética (Ahloowalia, Maluszynski, & Nichterlein, 2004). Esta técnica se basa en el uso de estímulos físicos o sustancias químicas (mutágenos) (González-Jiménez, 2004; Messmer et al., 2015). Los agentes mutagénicos químicos, como la colchicina, generan variaciones genéticas, como la duplicación de cromosomas (poliploidía) (Eng & Ho, 2018). La poliploidía puede generar variantes con características deseadas, como un mayor tamaño de

biotic stress (Roughani & Mehdi, 2018). However, the use of colchicine can cause changes in the chromosome number (aneuploidy or euploidy) and genetic damage to germ cells (Firbas & Amon, 2014).

Even though induced mutagenesis has shown to be an efficient method in the generation of ornamental varieties in different countries, in Mexico, the studies that report the generation of mutants in ornaments are scarce and have been directed to species such as tuberose (*Polianthes tuberosa*), chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*), wild poinsettia (*Euphorbiache pulcherrima*), sunflower (*Helianthus annuus*), *Tigridia pavonia* and *Laelia autumnalis*, all of them using physical mutagens (Estrada-Basaldúa et al., 2011; Canul-Ku et al., 2012; Castillo-Martínez, de la Cruz-Torres, Carrillo-Castañeda, & Avendaño-Arrazate, 2015; Díaz-López, Morales-Ruíz, Olivar-Hernández, Hernández-Herrera, & Juárez-Cortes, 2017). In the case of anthurium, there are only three reports on induced mutagenesis in the world, of which only one used colchicine (Puchooa, 2005; Chen, Hou, Zhang, Wang, & Tian, 2011; Suraninpong & Wuthisuthimethavee, 2015). The objective of the present work was to induce mutations in *A. andreanum* by exposing explants obtained from vitroplants to colchicine.

Materials and methods

Regeneration of vitroplants

Anthurium leaves grown in the greenhouse were disinfested with a 1 % fungicide solution (0.2 % Prozykar® and 0.2 % Promyl®) for 30 min; then, they were placed in a solution with 1.2 % sodium hypochlorite (active ingredient) plus 45 µL of silver nanoparticles (Agrovit®) for 30 min. The leaves were rinsed three times with sterile distilled water. From these leaves, segments (1 cm²) were obtained, which were placed in 90 X 15 mm Petri dishes with 30 mL of induction medium containing Murashige and Skoog (1962) salts (MS), 1mg·l⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 1 mg·l⁻¹ benzylaminopurine (BAP), 30 g·l⁻¹ sucrose and 7 g·l⁻¹ agar. The pH of the medium was adjusted to 5.8 and autoclaved for 20 min at 121 °C, before being poured into Petri dishes. The cultures were incubated in a controlled environment chamber at 26 + 2 °C in complete darkness.

After three months, explants with adventitious shoots were transferred to a differentiation medium containing MS salts, 1 mg·l⁻¹ 6-furfurylaminopurine (kinetin), 0.3 mg·l⁻¹ naphthaleneacetic acid (NAA), 0.3 mg·l⁻¹ gibberellic acid (GA₃), 30 g·l⁻¹ sucrose and 7 g·l⁻¹ agar. Then, the regenerated shoots were cultured for four weeks on a medium containing MS salts, 0.5 mg·l⁻¹ kinetin and 0.3 mg·l⁻¹ silver nitrate (AgNO₃) (growth medium). The clumps of shoots were divided

las flores, flores con colores y formas más vistosas, una mayor vida poscosecha y una mayor resistencia al estrés abiótico o biótico (Roughani & Mehdi, 2018). Sin embargo, el uso de la colchicina puede causar cambios en el número de cromosomas (aneuploidía o euploidía) y daños genéticos en las células germinales (Firbas & Amon, 2014).

Aunque la mutagénesis inducida ha probado ser un método eficiente en la generación de variedades ornamentales en diferentes países, en México, los estudios que reportan la generación de mutaciones en ornamentales son escasos y se han dirigido a especies como el nardo (*Polianthes tuberosa*) el crisantemo (*Dendranthema grandiflora*), la nochebuena silvestre (*Euphorbiache pulcherrima*), el girasol (*Helianthus annuus*), *Tigridia pavonia* y *Laelia autumnalis*, todos ellos utilizando mutágenos físicos (Estrada-Basaldúa et al., 2011; Canul-Ku et al., 2012; Castillo-Martínez, de la Cruz-Torres, Carrillo-Castañeda, & Avendaño-Arrazate, 2015; Díaz-López, Morales-Ruíz, Olivar-Hernández, Hernández-Herrera, & Juárez-Cortes, 2017). En el caso del anturio, únicamente existen tres informes sobre mutagénesis inducida en el mundo, de los cuales sólo uno utilizó colchicina (Puchooa, 2005; Chen, Hou, Zhang, Wang, & Tian, 2011; Suraninpong & Wuthisuthimethavee, 2015). El objetivo del presente trabajo fue inducir mutaciones en *A. andreanum* mediante la exposición de explantes obtenidos de vitroplantas a la colchicina.

Materiales y métodos

Regeneración de vitroplantas

Hojas de *A. andreanum* cultivadas en invernadero fueron desinfectadas con una solución fungicida al 1 % (0.2 % Prozykar® y 0.2 % Promyl®) durante 30 minutos; posteriormente, se colocaron en una solución con 1.2 % de hipoclorito de sodio (ingrediente activo) más 45 µl de nanopartículas de plata (Agrovit®) por 30 minutos. Las hojas fueron enjuagadas tres veces con agua destilada esteril. Se obtuvieron segmentos (1 cm²) a partir de estas hojas, y se colocaron en cajas de Petri de 90 X 15 mm con 30 ml de medio de inducción conteniendo sales de Murashige y Skoog (MS), 1 mg·l⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 1 mg·l⁻¹ de benzilaminopurina (BAP), 30 g·l⁻¹ de sacarosa y 7 g·l⁻¹ de agar. El pH del medio fue ajustado a 5.8, y el medio tratado en autoclave durante 20 minutos a 121 °C, antes de ser vertido en cajas de Petri. Los cultivos fueron incubados en una cámara de ambiente controlado a 26 ± 2 °C en oscuridad total.

Después de tres meses, los explantes con brotes adventicios fueron trasferidos a diferentes medios conteniendo sales MS, 1 mg·l⁻¹ de 6-furfurilaminopurina (kinetina), 0.3 mg·l⁻¹ de ácido naftalenacético (NAA), 0.3 mg·l⁻¹ de ácido giberélico (AG₃), 30 g·l⁻¹ de sacarosa y

and subcultured (every four weeks) on the same medium described above, until they reached 6-8 cm long. The cultures were incubated at 26 ± 2 °C and 16 h of cool white fluorescent light (light intensity $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

Exposure of explants to colchicine

Leaf, node and root (tips) explants (0.5 cm^2) obtained from regenerated vitroplants (seven months old) were submerged for 0, 2, 3 or 4 h in a 0.1 % colchicine solution, previously sterilized by filtration (45 μM Millipore® membrane filter), according to the protocols reported by Tian and Ma (2008) and Matos (2014). The explants were removed from the solution, washed with sterile distilled water and then allowed to dry on sterile absorbent paper. These explants were placed in Petri dishes with induction medium, on which they remained for 12 weeks in darkness at 26 ± 2 °C.

The explants with adventitious shoots were removed from the induction medium and transferred to the differentiation medium; the regenerated shoots were then cultured on growth medium described above. The cultures were incubated at 26 ± 2 °C and 16 h of cool white fluorescent light ($60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Twelve weeks after the explants were exposed to colchicine, the following were evaluated: explant survival, the mean lethal dose (LD_{50}), the number of explants that generated callus and the number of explants that formed shoots; at 20 weeks, the number of shoots formed by explant was quantified.

Experimental design

To test the effect of colchicine, a completely random factorial design with two factors (exposure time and type of explant) and 12 treatments was used. Each treatment consisted of ten repetitions; a Petri dish with five explants was a repetition. Means comparison was carried out by Tukey test ($P \leq 0.05$) using the statistical package SAS version 9.4; the LD_{50} was determined by a Logistic Regression Model (LRM).

Karyotype and chromosome count

Chromosomes of root tip meristematic cells (ca. 1 cm long) of the vitroplants regenerated from the nodes and exposed to different treatments with colchicine were counted by squash technique according to García-Velázquez (1990). Briefly, the roots were incubated at room temperature with 0.05 % colchicine solution for 5 h in complete darkness, fixed in a mixture of acetic acid and absolute ethanol (3:1), and kept at 4 °C until counting. At moment of examination, the root tips were treated for 10 min at 60 °C in 1 N

7 g·l⁻¹ de agar. Posteriormente, los brotes regenerados fueron cultivados durante cuatro semanas en un medio conteniendo sales MS, 0.5 mg·l⁻¹ de kinetina y 0.3 mg·l⁻¹ de nitrato de plata (AgNO_3) (medio de cultivo). Los racimos de brotes fueron divididos y subcultivados (cada cuatro semanas) en el mismo medio descrito arriba, hasta que alcanzaron entre 6 y 8 cm de longitud. Los cultivos fueron incubados a 26 ± 2 °C y 16 h de luz fluorescente blanca fría ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad de la luz).

Exposición de los explantes a la colchicina

Los explantes de hojas, nudos y raíces (puntas) (0.5 cm^2) obtenidos de vitroplantas regeneradas (de siete meses de edad) se sumergieron durante 0, 2, 3 o 4 h en una solución de colchicina al 0.1 %, previamente esterilizada por filtración (filtro de membrana millipore de 45 μM), según los protocolos reportados por Tian y Ma (2008) y Matos (2014). Los explantes se sacaron de la solución, se lavaron con agua destilada estéril y se dejaron secar en papel absorbente estéril. Estos explantes se colocaron en cajas de Petri con medio de inducción, en las que permanecieron durante 12 semanas en oscuridad, a 26 ± 2 °C.

Los explantes con brotes adventicios se retiraron del medio de inducción y se transfirieron al medio de diferenciación; los brotes regenerados se cultivaron entonces en el medio de crecimiento descrito anteriormente. Los cultivos se incubaron a 26 ± 2 °C y 16 h de luz blanca fría fluorescente ($60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Doce semanas después de exponer los explantes a la colchicina, se evaluaron: la supervivencia del explante, la dosis letal media (DL_{50}), el número de explantes que generaron callo y el número de explantes que formaron brotes; a las 20 semanas, el número de brotes formados por explante fue cuantificado.

Diseño experimental

Para comprobar el efecto de la colchicina, se utilizó un diseño factorial completamente aleatorio con dos factores (tiempo de exposición y tipo de explante) y 12 tratamientos. Cada tratamiento consistió en diez repeticiones; una caja de Petri con cinco explantes constituyó una repetición. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) utilizando el paquete estadístico SAS versión 9.4; la DL_{50} se determinó mediante un Modelo de Regresión Logística (MRL).

Cariotipo y recuento de cromosomas

Los cromosomas de las células meristemáticas de la punta de la raíz (ca. 1 cm de longitud) de las vitroplantas regeneradas a partir de los nudos y

HCl, immersed in Schiff's reagent for 5 min and placed on a slide. Approximately, 1 mm from the root tips was stained with 2 % acetic orcein and after used to apply the squash technique.

The preparations were observed in a optical microscope (model Primo Star, Zeiss) with a 40x and 100x objective, the chromosomes were counted and the images were captured with a digital camera (DCM130E model) adapted to the microscope. In each treatment, the chromosomes of at least ten metaphase cells were counted. For the karyotype, the three photographs that showed the best resolution were selected and processed with the Karyo Type software (Altinordu, Peruzzi, Yu, & He, 2016). Total length = long arm + short arm (TL = LA + SA), centromeric index = short arm/ total length x 100 (CI = (SA/TL x 100), arms ratio = long arm/ short arm (AR = LA/SA), chromosome type (metacentric, submetacentric or subtelocentric) were determined (Levan, Fredga, & Sandberg, 1964); likewise, the length of the haploid genome, the asymmetry degree of Stebbins (1971) and karyotypic formula were obtained.

Results

Vitroplant regeneration

The protocol developed in the present investigation allowed obtaining anthurium vitroplants. Callus formation in the leaf explants was observed after 12 weeks of culture on the induction medium. At 17 weeks of culture, multiple buds began to form, which when were subcultured on growth medium for 12 weeks, reaching 6-8 cm long; these shoots regenerated roots in the same medium.

Effect of exposing leaf explants to colchicine

Leaf explants were the most affected by colchicine, with their damage and mortality directly proportional to the exposure time. These explants showed low survival and null response in terms of callus and adventitious shoot formation. All colchicine-treated leaf explants died after 16 weeks.

Effect of exposure of nodes to colchicine

The survival and percentage of nodes that formed shoots decreased as exposure time increased. Significant differences for these two variables between the nodes exposed for 4 h to colchicine (46 and 46 %, respectively) and the control treatment (86 and 86 %, respectively) (Table 1) were observed. The LD₅₀ for this type of explant was 3.89 h. The explants that survived this time of exposure to the mutagen regenerated fewer shoots (1.1) than the root explants. The basal zone of the nodes exposed for 2 and 3 h

expuestas a diferentes tratamientos con colchicina se contaron mediante la técnica *squash* conforme a García-Velázquez (1990). En breve, las raíces se incubaron a temperatura ambiente con una solución de colchicina al 0.05 % durante 5 h, en completa oscuridad, fijadas en una mezcla de ácido acético y etanol absoluto (3:1), y mantenidas a 4 °C hasta el recuento. Al momento de examinarlas, las puntas de las raíces se trataron durante 10 minutos a 60 °C en 1N HCl, se sumergieron en reactivo de Schiff durante 5 minutos, y se colocaron en un portaobjetos. Aproximadamente, 1 mm de las puntas de las raíces se tiñó con orceína acética al 2 %, y después se utilizó para aplicar la técnica *squash*.

Las preparaciones fueron observadas en un microscopio óptico Zeiss, modelo Primo Star con un objetivo de 40x y 100x; se contaron los cromosomas y se capturaron las imágenes con una cámara digital modelo DCM130E adaptada al microscopio. En cada tratamiento se contaron los cromosomas de al menos diez células en metafase. Para el cariotipo, se seleccionaron las tres fotografías que mostraron la mejor resolución y se procesaron con el *software* Karyo Type (Altinordu, Peruzzi, Yu, & He, 2016). Se determinaron la longitud total = brazo largo + brazo corto (LT = BL + BC), el índice centromérico = brazo corto/longitud total x 100 (IC = (BC/LT x 100), la relación de brazos = brazo largo/brazo corto (AR = BL/BC), y el tipo de cromosoma (metacéntrico, submetacéntrico o subtelocéntrico) (Levan, Fredga, & Sandberg, 1964); asimismo, se obtuvo la longitud del genoma haploide, el grado de asimetría de Stebbins (1971) y la fórmula cariotípica.

Resultados

Regeneración de vitroplantas

El protocolo desarrollado en esta investigación permitió obtener vitroplantas de anthurio. La formación de callos en los explantes foliares se presentó después de 12 semanas de cultivo en el medio de inducción. A las 17 semanas de cultivo, varias yemas comenzaron a formarse, las cuales cuando fueron subcultivadas en medio de cultivo por doce semanas alcanzaron entre 6 y 8 cm de longitud; estos brotes regeneraron raíces en el mismo medio.

Efecto de la exposición de explantes foliares a la colchicina

Los explantes foliares fueron los más afectados por la colchicina, presentando un daño y una mortalidad directamente proporcionales al tiempo de exposición. Estos explantes mostraron baja supervivencia y nula respuesta en términos de formación de callos y brotes adventicios. Todos los explantes foliares tratados con colchicina murieron después de 16 semanas.

thickened considerably and acquired a rosette appearance; after five months of culture, the nodes began to form adventitious shoots. The number of shoots formed by the explants exposed for 2 h to the mutagen was significantly higher (4.4) than that of the control and 4 h (Table 1).

Effect of exposure of root explants to colchicine

No significant differences were observed in the survival of the root explants exposed for 2, 3 and 4 h, but some were observed with respect to the control treatment (Table 1). Survival at 12 weeks was higher than 60 %, so it was not possible to determine the LD₅₀ within this period of time. The roots exposed for 2, 3 and 4 h formed callus (44 to 68 %), which originated in the midrib; this callus was friable and beige in color and as the exposure time to colchicine increased, the size of the cell mass was smaller. When the explants were cultured on differentiation medium and light, the calli began to take on a dark brown color and died. Only 4 % of the root explants exposed for 2 and 3 h to colchicine survived after 16 weeks and formed shoots (120 and 100 shoots, respectively).

Karyotype and chromosome count

Cytological analysis of anthurium plants (wild type) showed that their chromosome number is $2n = 2X =$

Efecto de la exposición de los nudos a la colchicina

La sobrevivencia y el porcentaje de nudos que formaron brotes decrecieron a medida que el tiempo de exposición incrementó. Se observaron diferencias significativas para estas dos variables entre los nudos expuestos por 4 h a colchicina (46 y 46 %, respectivamente) y el tratamiento testigo (86 y 86 %, respectivamente) (Cuadro 1). La dosis letal promedio (DL₅₀) para este tipo de explante fue 3.89 h. Los explantes que sobrevivieron a este tiempo de exposición al mutágeno regeneraron menos brotes (1.1) que los explantes de raíz. El área basal de los nudos expuestos durante 2 y 3 h engrosó considerablemente y adquirió una apariencia de roseta; después de cinco meses de cultivo, los nudos comenzaron a formar brotes aéreos. El número de brotes formados por los explantes expuestos durante 2 h al mutágeno fue significativamente más alto (4.4) que el del testigo y el de 4h (Cuadro 1).

Efecto de la exposición de los explantes de raíz a la colchicina

No se observaron diferencias significativas en la supervivencia de los explantes de raíz expuestos durante 2, 3 y 4 h, pero se observaron algunas con respecto del tratamiento testigo (Cuadro 1). La sobrevivencia a las 12 semanas fue mayor a 60 %, de tal manera que no

Table 1. Interaction between the type of explant of anthurium (*Anthurium andreanum* L.) and time of exposure to colchicine on survival, callus formation and regeneration of adventitious shoots.

Cuadro 1. Interacción entre el tipo de explante de anturio (*Anthurium andreanum* L.) y el tiempo de exposición a la colchicina sobre la supervivencia, formación de callo y regeneración de brotes aéreos.

Explant/ Explante	Time/ Tiempo	Variables			
		Survival (%)/ Supervivencia (%)	Callus formation (%)/ Formación de callo (%)	Explants with shoots (%)/ Explantos con brotes (%)	Number of shoots per explant/ Número de brotes por explante
Node/Nudo	0	86.0 ab ^z	0.0 b	86.0 a	1.0 c
Node/Nudo	2	76.0 abc	76.0 a	76.0 ab	4.47 a
Node/Nudo	3	56.0 bc	56.0 a	56.0 ab	3.25 ab
Node/Nudo	4	46.0 c	0.0 b	46.0 b	1.68 bc
Root/Raíz	0	60.0 bc	40.0 a	ND	ND
Root/Raíz	2	100.0 a	68.0 a	ND	ND
Root/Raíz	3	100.0 a	56.0 a	ND	ND
Root/Raíz	4	100.0 a	44.0 a	ND	ND

ND = Not determined. ^zMeans with different letters between rows are significantly different (Tukey, $P \leq 0.05$).

ND = no determinado. Medias con la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

30 (Figure 1a). Likewise, it was possible to determine that anthurium has 11 submetacentric (sm) and four metacentric (m) chromosomes (Table 2; Figure 2). The individual length of the chromosomes ranged between 2.13 and 5.08 μm , generating a total haploid length of $46.8 \pm 0.2 \mu\text{m}$ obtained with the karyotypic equation $2n = 2x = 6$ metacentric (2 satellite) + 24 submetacentric. The mean centromeric index was 33.86 ± 2.31 , which indicates a greater number of submetacentric chromosomes. Based on the inter and intrachromosomal variation, the karyotype is characterized as asymmetric type 3A (Stebbins, 1971), due to the fact that the size of the chromosomes ranges from small to medium (Table 2). A pair of satellites were observed on the second pair of chromosomes, which are very close to these. Likewise, it was possible to observe two B-chromosomes structures-like (Figure 1a).

The results observed in the present work showed that plants regenerated from nodes exposed to colchicine were aneuploid. The plants obtained from explants that remained for 2 and 3 h in presence of colchicine contained 16 to 30 chromosomes, being 29 chromosomes the predominant ones (Figure 1b, 1c), originating a mixoploid population; cells with two or more nuclei sharing the same cytoplasm were also observed (Figure 1d, 1e). On the other hand, the plants

fue posible determinar la DL_{50} dentro de este periodo. Las raíces expuestas por 2, 3 y 4 h formaron callo (44 a 68 %), el cual se originó en la costilla media; este callo era friable y de color beige, y a medida en que la exposición a la colchicina incrementó, el tamaño de la masa celular fue más pequeño. Cuando los explantes fueron cultivados en medio de diferenciación y luz, los callos comenzaron a tornarse café oscuro y murieron. Solamente 4 % de los explantes de raíz espuestos por 2 y 3 h a la colchicina sobrevivieron después de 16 semanas y formaron brotes (120 y 100 brotes, respectivamente).

Cariotipo y conteo de cromosomas

El análisis citológico de las plantas de *A. andreaeanum* (tipo silvestre) mostró que su número de cromosomas es $2n = 2X = 30$ (Figura 1A). Asimismo, se pudo determinar que el *A. andreaeanum* tiene 11 cromosomas submetacéntricos (sm) y cuatro metacéntricos (m) (Cuadro 2; Figura 2). La longitud individual de los cromosomas osciló entre 2.13 y 5.08 μm , resultando en una longitud total del haploide de $46.8 + 0.2 \mu\text{m}$ obtenida con la ecuación cariotípica $2n = 2x = 6$ metacéntricos (2 satélites) + 24 submetacéntricos. El índice centromérico medio fue de $33.86 + 2.31$, lo cual indica un mayor número de cromosomas submetacéntricos. Con base en la variación inter-

Table 2. Karyotypic parameters of the haploid genome of anthurium (*Anthurium andreaeanum* L.).
Cuadro 2. Parámetros cariotípicos del genoma haploide de anturio (*Anthurium andreaeanum* L.)

HChr	TL (μm)/LT (μm)	CI (%) / IC (%)	AR (μm)	Type / Tipo
1	5.08 ± 0.4	43.04 ± 5.5	1.32 ± 0.3	m
2	3.99 ± 0.4	38.82 ± 3.7	1.58 ± 0.2	m
3	3.74 ± 0.4	29.72 ± 7.7	2.36 ± 0.7	m
4	3.48 ± 0.2	31.21 ± 3.4	2.20 ± 0.3	m
5	3.35 ± 0.1	25.95 ± 2.8	2.85 ± 0.4	sm
6	3.28 ± 0.1	30.76 ± 4.0	2.25 ± 0.4	sm
7	3.12 ± 0.3	30.41 ± 3.0	2.29 ± 0.3	sm
8	3.01 ± 0.2	29.38 ± 6.7	2.40 ± 0.7	sm
9	2.84 ± 0.2	31.48 ± 2.3	2.18 ± 0.2	sm
10	2.77 ± 0.1	34.36 ± 6.9	1.91 ± 0.5	sm
11	2.62 ± 0.1	31.19 ± 4.7	2.21 ± 0.5	sm
12	2.57 ± 0.1	34.81 ± 5.1	1.87 ± 0.4	sm
13	2.44 ± 0.1	33.63 ± 3.1	1.97 ± 0.2	sm
14	2.39 ± 0.2	39.73 ± 6.0	1.52 ± 0.4	sm
15	2.13 ± 0.1	31.56 ± 3.0	2.17 ± 0.3	sm

HChr = haploide chromosome; TL = total length; CI = centromeric index; AR = arms ratio, Sm = submetacentric; sm = submetacentric; m = metacentric.

HChr = cromosoma haploide; LT = longitud total; IC = índice centromérico; AR = relación de brazos, Sm = submetacéntrico; M = metacéntrico.

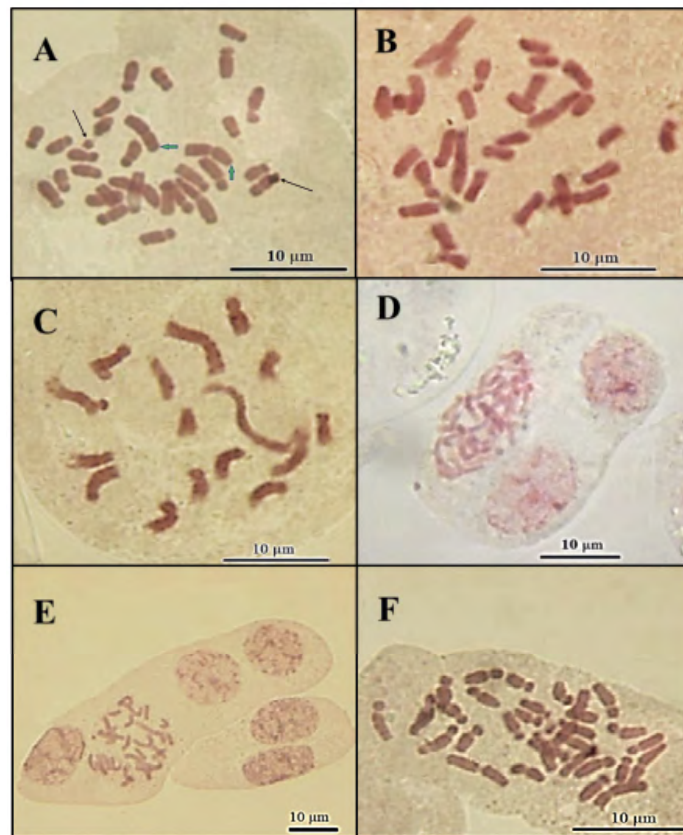


Figure 1. Metaphase chromosomes from anthurium (*Anthurium andreanum* L.) plants, regenerated from nodes exposed to colchicine. a) Control, b) 2 h, c) 3 h, d) cells with three nuclei, e) cells with four nuclei, and f) 4 h. Green arrows: chromosomes with satellites. Black arrows: B-chromosomes structures-like.

Figura 1. Cromosomas en metafase de plantas de *A. andreanum*, regeneradas a partir de nudos expuestos a colchicina. a) Testigo, b) 2 h, c) 3 h, d) células con tres núcleos, e) células con cuatro núcleos y f) 4 h. Flechas verdes: cromosomas con satélites. Flechas negras: estructuras similares a los cromosomas B.

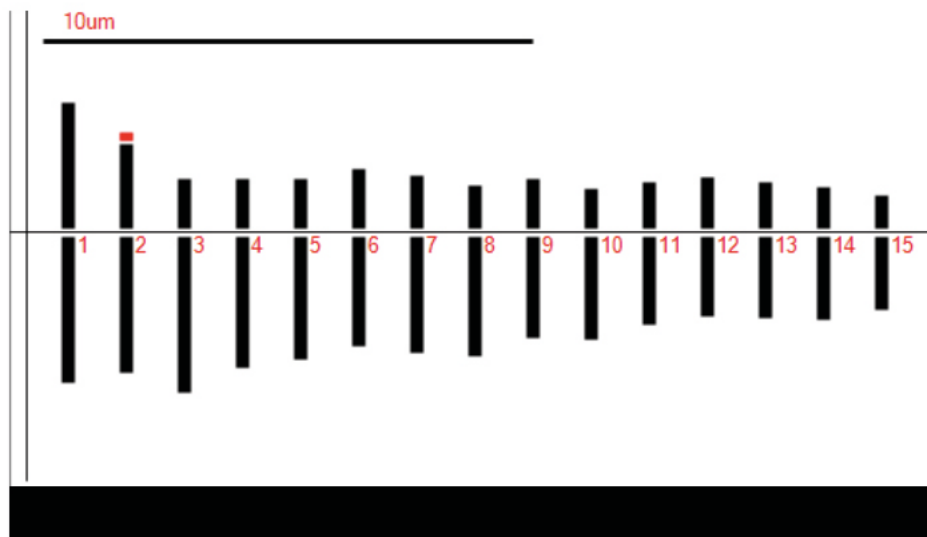


Figure 2. Ideogram of plants (wild type) of anthurium (*Anthurium andreanum* L.) in haploid condition.

Figura 2. Ideograma de plantas (de tipo silvestre) de *A. andreanum* L. en condición haploide.

regenerated from explants that remained for 4 h in the colchicine solution contained 30 to 32 chromosomes, predominately those with 31 chromosomes (Figure 1f).

Morphological characteristics of the mutants obtained In the first months of their *in vitro* growth, the plants obtained from explants exposed for 2 and 3 h to colchicine were shorter and had fewer leaves and roots than the control plants; also, the roots were observed to be shorter (Figure 3 a-c). On the other hand, the plants that regenerated from explants exposed to colchicine for 4 h showed larger leaves with a darker green color and reddish petioles than the control plants (Figure 3 d). When the aneuploid anthurium plants were grown in *ex vitro* conditions for three months, they showed a slight reduction in the size of the leaves and the length of the petioles with respect to the control plants (Figure 3 e-g). After seven months of cultivation in the greenhouse, it was possible to observe the formation of spathe and spadix in the regenerated plants from control explants and those exposed for

intracromosómica, el cariotipo se caracteriza como asimétrico tipo 3A (Stebbins, 1971), debido a que el tamaño de los cromosomas oscila entre pequeño y mediano (Cuadro 2). Se observó un par de satélites en el segundo par de cromosomas, los cuales están muy cerca de estos. Asimismo, fue posible observar dos estructuras similares a las de los cromosomas B (Figura 1A). Los resultados observados en el presente trabajo mostraron que las plantas regeneradas a partir de nudos expuestos a la colchicina resultaron aneuploides. Las plantas obtenidas a partir de explantes que permanecieron durante 2 y 3 h en presencia de colchicina presentaron de 16 a 30 cromosomas, siendo 29 los predominantes (Figura 1B, 1C), originando una población mixoploide; también se observaron células con dos o más núcleos compartiendo el mismo citoplasma (Figura 1D, 1E). Por otro lado, las plantas regeneradas a partir de explantes que permanecieron durante 4 h en la solución de colchicina presentaron de 30 a 32 cromosomas, predominantemente los de 31 cromosomas (Figura 1F).

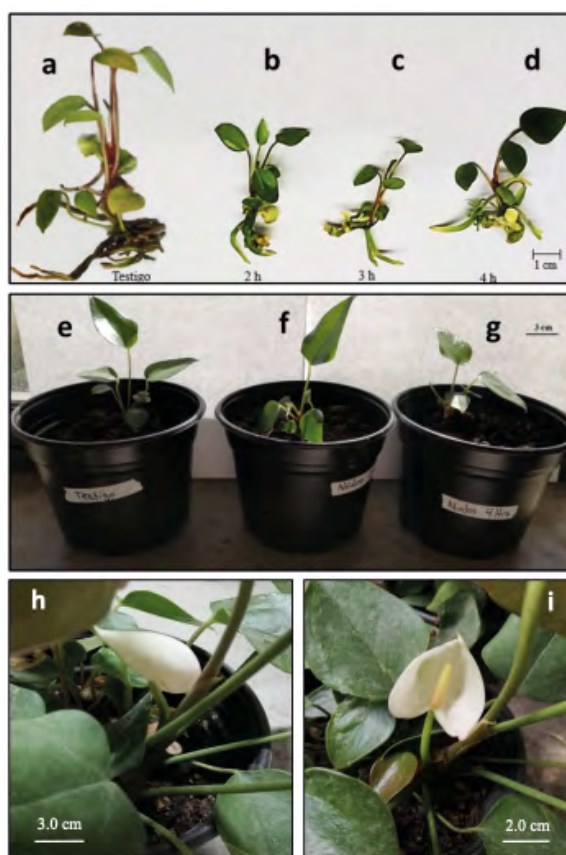


Figure 3. Anthurium (*Anthurium andreaeanum* L.) plants regenerated from nodes exposed to colchicine, growing in *in vitro* conditions: a) 0 h, b) 2 h, c) 3 h and d) 4 h. Vitroplants regenerated from nodes exposed to colchicine: e) 0 h, f) 3 h and g) 4 h, grown for three months in a greenhouse. Plants obtained from nodes exposed to colchicine: h) 0 h and i) 4 h, with spathe and spadix.

Figura 3. Plantas de *A. andreaeanum* regeneradas a partir de nudos expuestos a colchicina, creciendo en condiciones *in vitro*: 0 h (a); 2 h (b); 3 h (c); 4 h (d). Vitroplantas regeneradas a partir de nudos expuestos a colchicina: 0 h (e); 3 h (f); 4 h (g), cultivadas durante 3 meses en invernadero. Plantas obtenidas a partir de nudos expuestos a colchicina: 0 h (h); 4 h (i) con espata y espádice.

4 h to colchicine (Figure 3 h-i). The mutant plants were smaller than the control ones.

Discussion

In this work, explants of anthurium vitroplants were exposed to colchicine to induce mutations. The sensitivity to mutagen was different based on the type of explant and the time of exposure. Leaf explants were the most affected. The severe damage to leaf explants could be due to the characteristics and physiological state of the vitroplants and the leaves themselves (Valle-Sandoval, Mascorro-Gallardo, Gil-Vázquez, & Iturriaga-de la Fuente, 2008), unlike the leaves of plants grown in greenhouse or field, the leaves of the vitroplants had a very thin cuticle, which could cause dehydration stress, and severe mechanical damage from cutting, which compromised their survival. Torres and Sanabria (2011) mention that leaves of plants regenerated *in vitro* can present anatomical and functional abnormalities such as a reduction in the number of cells in the mesophyll, a weak vascular system, and less thickness of its lamina, epidermis and cuticle. Also, it is likely that the exposure of the leaves to colchicine has increased their deterioration; thus, the leaves of young anthurium vitroplants are not considered a good source of explants for future mutagenesis studies.

On the other hand, the better morphogenetic capacity observed in the nodes with respect to the leaf and root explants could be due to the fact that in the nodes the meristem is covered with leaf primordia, making it less susceptible to damage, which allowed determining the mean lethal dose. LD_{50} indicates the dose to which 50 % of the individuals (explants) die from the effect of the mutagen; its importance lies in the fact that at this dose there is a greater probability of obtaining useful mutations in a genetic breeding program (Álvarez-Holguín et al., 2018). In contrast, the calli generated by root explants changed color and died when they were transferred to the differentiation medium. A similar result was reported by Chen et al. (2011) in root explants (callus masses) of anthurium "Arizona" exposed to colchicine. Root meristematic cells are known to respond rapidly to drugs, suffer DNA damage, and accumulate proteins (ERF115) related to the production of ethylene (stress hormone) (Heyman et al., 2016). However, it should be noted that the surviving calli formed a greater number of shoots than the node explants.

The karyotype and chromosomal number of diploid anthurium plants are similar to those reported by Chen et al. (2011) and Lakshmanan et al. (2015) who found that the number of chromosomes for anthurium is $2n = 2x = 30$. Likewise, it was possible to detect the presence of satellites in a pair of anthurium

Características morfológicas de las mutaciones obtenidas

En los primeros meses de su crecimiento *in vitro*, las plantas obtenidas a partir de explantes expuestos durante 2 y 3 h a colchicina eran más cortas y tenían menos hojas y raíces que las plantas testigo; también se observó que las raíces eran más cortas (Figura 3 a-c). Por otro lado, las plantas que se regeneraron a partir de los explantes expuestos a colchicina durante 4 h mostraron hojas más grandes con un color verde más oscuro y pecíolos más rojizos que las testigo (Figura 3 d). Cuando las plantas aneuploides de *anthurium* se cultivaron en condiciones *ex vitro* durante tres meses, mostraron una ligera reducción en el tamaño de las hojas y la longitud de los pecíolos con respecto a las plantas testigo (Figura 3 e-g). Tras siete meses de cultivo en el invernadero, se observó la formación de espata y espádice en las plantas regeneradas a partir de los explantes testigo y los expuestos durante 4 h a la colchicina (Figura 3 h-i). Las plantas mutadas eran más pequeñas que las testigo.

Discusión

En este trabajo se expusieron explantes de vitroplantas de *A. andreanum* a colchicina para inducir mutaciones. La sensibilidad al mutágeno fue diferente en función del tipo de explante y del tiempo de exposición. Los explantes foliares fueron los más afectados. El daño severo a los explantes foliares podría deberse a las características y al estado fisiológico de las vitroplantas y de las propias hojas (Valle-Sandoval, Mascorro-Gallardo, Gil-Vázquez, & Iturriaga-de la Fuente, 2008); a diferencia de las hojas de las plantas cultivadas en invernadero o en campo, las hojas de las vitroplantas presentaban una cutícula muy fina, lo cual pudo causar estrés por deshidratación y daños mecánicos severos derivados del corte, que comprometieron su supervivencia. Torres y Sanabria (2011) mencionan que las hojas de plantas regeneradas *in vitro* pueden presentar anomalías anatómicas y funcionales como una reducción en el número de células del mesófilo, un sistema vascular débil, y menor grosor de su lámina, epidermis y cutícula. Además, es probable que la exposición de las hojas a la colchicina haya aumentado su deterioro; así, las hojas de vitroplantas jóvenes de *A. andreanum* no se consideran una buena fuente de explantes para futuros estudios de mutagénesis.

Por otro lado, la mejor capacidad morfogénica observada en los nudos respecto a los explantes foliares y radicales podría deberse a que en los nudos el meristemo está cubierto de primordios foliares, haciéndolo menos susceptible al daño, lo cual permitió determinar la dosis letal media. La DL_{50} indica la dosis a la que el 50 % de los individuos (explantes) mueren

chromosomes comparable to those reported in *A. affine*, *A. bellum* and *A. pentaphyllum* var. *pentaphyllum* (Pires-Cotias-de Oliveira, Silva-Guedes, & Cerqueira-Barreto, 1999). Satellites are very useful for the description of karyotypes, taxonomic delimitation and comparative cytogenetics (Tapia-Pastrana & Tapia-Aguirre, 2018). B-chromosomes structures-like were also recorded in our examination of metaphase cells. B-chromosomes had been also reported in other anthurium species such as *A. affine* (Pires-Cotias-de Oliveira et al., 1999). Farhan and Martins (2019) mention that the B chromosomes are karyotypic components that show non-Mendelian characteristics and have a non-standard inheritance behavior; their presence can change or disappear in an aneuploid condition.

In relation to aneuploidy and multinucleate cells, it is known that the feasibility of generating desirable mutants can be affected by the occurrence of multiple mutational events in individual genomes. The use of chemical mutagens such as colchicine for polyploid induction frequently causes aneuploidy (de Storme & Mason, 2014), which refers to the removal or addition of individual chromosomes from a basic chromosome set (Huettel, Kreil, Matzke, & Matzke, 2008). This variation in the chromosome number could be result of irregularities in the formation of the mitotic spindle and cytokinesis, two mechanisms that depend on the biogenesis of the microtubules (Akhmanova & Steinmetz, 2015). Microtubules are crucial cell structures of cytoskeleton and they are formed by the consecutive assembly of α -tubulin dimers.

Because colchicine has high affinity for these dimers *in vitro*, their joining gives rise to complexes of tubulin-colchicine that can also bind to the growing end of the microtubules (Hardham & Gunning, 1980). When dimers join *in vivo*, the biogenesis of the microtubules is arrested because of tubulin depolymerization (Leung, Li, Hui, & Kraus, 2015). The speed and outcomes of this disruption depend on colchicine concentration and duration of immersion as it has been shown elsewhere. In this study we tested 0.1 % colchicine during 2, 3 or 4 h in leaf, node and root explants. It was clear that the concentration of colchicine assayed was not enough to duplicate the chromosome set. Instead, the duration of immersion had some intriguing outcomes such as the aneuploidy and the presence of multinucleate cells.

At 2 and 3 h of immersion, multinucleate and aneuploid cells with 16-29 chromosomes were observed. The source of this variation could come from failures in the assembly of the mitotic spindle or from irregularities in the formation of the cortical microtubules. It is likely that microtubules of both

por efecto del mutágeno; su importancia radica en que a esta dosis hay una mayor probabilidad de obtener mutaciones útiles en un programa de mejora genética (Álvarez-Holguín et al., 2018). En contraste, los callos generados por explantes de raíz cambiaron de color y murieron al ser transferidos al medio de diferenciación. Un resultado similar fue reportado por Chen et al. (2011) en explantes radiculares (masas de callo) de *A. andreanum* "Arizona" expuestos a colchicina. Se sabe que las células meristemáticas de la raíz responden rápidamente a los fármacos, sufren daños en el ADN y acumulan proteínas (ERF115) relacionadas con la producción de etileno (hormona del estrés) (Heyman et al., 2016). Sin embargo, cabe destacar que los callos sobrevivientes formaron un mayor número de brotes que los explantes nodales.

El cariotipo y el número cromosómico de las plantas diploides de *Anthurium* son similares a los reportados por Chen et al. (2011) y Lakshmanan et al. (2015), quienes encontraron que el número de cromosomas para *Anthurium andreanum* es $2n = 2x = 30$. Asimismo, fue posible detectar la presencia de satélites en un par de cromosomas de *A. andreanum* comparables a los reportados en *Anthurium affine*, *A. bellum* y *A. pentaphyllum* var. *pentaphyllum* (Pires-Cotias-de Oliveira, Silva-Guedes, & Cerqueira-Barreto, 1999). Los satélites son muy útiles para la descripción de los cariotipos, la delimitación taxonómica y la citogenética comparativa (Tapia-Pastrana & Tapia-Aguirre, 2018). También se registraron estructuras similares a las de los cromosomas B en nuestra exploración de las células en metafase. Los cromosomas B también habían sido reportados en otras especies de *anthurium* como *A. affine* (Pires-Cotias-de Oliveira et al., 1999). Farhan y Martins (2019) mencionan que los cromosomas B son componentes cariotípicos que muestran características no mendelianas y tienen un comportamiento no estándar de herencia; su presencia puede cambiar o desaparecer en una condición aneuploide.

Por lo que respecta a la aneuploidía y a las células multinucleadas, se sabe que la viabilidad de generar mutaciones deseables puede verse afectada por la aparición de múltiples eventos de mutación en genomas individuales. El uso de mutágenos químicos, como la colchicina para la inducción de poliploides frecuentemente genera aneuploidía (De Storme & Mason, 2014), la cual se refiere a la eliminación o adición de cromosomas individuales de un conjunto cromosómico básico (Huettel, Kreil, Matzke, & Matzke, 2008). Esta variación en el número de cromosomas podría ser resultado de irregularidades en la formación del huso mitótico y la citocinesis, dos mecanismos que dependen de la biogénesis de los microtúbulos (Akhmanova & Steinmetz, 2015). Los microtúbulos son estructuras celulares cruciales del citoesqueleto y se

structures become unable to reorganize themselves due to depolymerization by colchicine, in such a way that the short-time periods to colchicine exposure compromise the formation of the spindle and the phragmoplast giving place to multinucleate cells. These types of cells along with multipolar anaphases and spindle failures are frequent in cells treated with low concentrations of colchicine (Compton, 2011). The extension of this effect is also tissue-dependent; for instance, Ruíz and Vázquez (1982) observed interphase cells with large nuclei or micronuclei as well as binucleated and polynucleated cells when they exposed barley embryos to 0.3 % colchicine for 24 h. Consequently, it is likely that, during the mitosis of these multinucleated cells, the total set of chromosomes is unevenly distributed among the daughter cells, which could lead to numerical chromosomal abnormalities such as those observed in this study and those by Matos (2014) in *Aloe vera* plants treated with 0.1 % colchicine for 48 h.

Similarly, observations in the chromosome number in the longest-time exposure (4 h) indicated that the main effect was the aneuploidy, with a chromosomal variation of one or two extra chromosomes. Here, it has been reported that longer exposure periods (or high colchicine concentrations) stimulate new tubulin-containing structures to emerge. These new structures are like a "tubulin cage" wavy network that temporally replaces the true cortical microtubules (Caperta et al., 2006). Possibly, this new structure of polymerized tubulin, the reversibility of the tubulin-colchicine complexes, the low concentration of colchicine and the time of exposure were factors that allowed the elongation of microtubules to resume once the cells were no longer in contact with the mutagen. Therefore, the balance among all these factors is key for ploidy to be able to occur.

During the *in vitro* growth, the aneuploid plants regenerated from explants exposed to colchicine showed an evident reduction in their size and vigor with respect to the control plants. In this regard, Zhu, Shao, Pan, Ge, and Li (2015) observed that aneuploid (nullisomic) plants of *Brassica napus* presented phenotypic changes; they were smaller with small light-green leaves and had smaller flowers and non-apical dominance. In contrast, the monosomic plants exhibited similar morphology to normal plants, but they flowered about 10 days earlier. Likewise, Matos (2014) mentions that in some cases positive aneuploidy may occur, which promotes changes at the morphological level such as slight increases in the foliar dimensions of the plants, but without having any visible effect on the increase in biomass accumulation. In some cases the aneuploidy, such as monosomy and nullisomy, can cause mortality due to

forman por el ensamblaje consecutivo de dímeros de $\alpha\beta$ -tubulina.

Dado que la colchicina tiene una alta afinidad por estos dímeros *in vitro*, su unión da lugar a complejos de tubulina-colchicina que también pueden unirse al extremo en crecimiento de los microtúbulos (Hardham y Gunning, 1980). Cuando los dímeros se unen *in vivo*, la biogénesis de los microtúbulos se detiene debido a la despolimerización de la tubulina (Leung, Li, Hui y Kraus, 2015). La velocidad y los resultados de esta interrupción dependen de la concentración de colchicina y de la duración de la inmersión, como se ha demostrado en otros estudios. En este estudio probamos la colchicina al 0.1 % durante 2, 3 o 4 h en explantes de hojas, nudos y raíces. Quedó claro que la concentración de colchicina evaluada no fue suficiente para duplicar el conjunto de cromosomas. En cambio, la duración de la inmersión tuvo algunos resultados interesantes, como la aneuploidía y la presencia de células multinucleadas.

A las 2 y 3 h de inmersión, se observaron células multinucleadas y aneuploides con 16-29 cromosomas. La causa de esta variación podría provenir de fallas en el ensamblaje del huso mitótico o de irregularidades en la formación de los microtúbulos corticales. Es probable que los microtúbulos de ambas estructuras se vuelvan incapaces de reorganizarse debido a la despolimerización por la colchicina, de tal manera que los periodos cortos de exposición a la colchicina comprometen la formación del huso y del fragmoplasto dando lugar a células multinucleadas. Estos tipos de células junto con las anafases multipolares y las fallas del huso son frecuentes en las células tratadas con bajas concentraciones de colchicina (Compton, 2011). La extensión de este efecto también depende del tejido; por ejemplo, Ruíz y Vázquez (1982) observaron células interfásicas con núcleos grandes o micronúcleos, así como células binucleadas y polinucleadas cuando expusieron embriones de cebada al 0.3% de colchicina durante 24 h. En consecuencia, es probable que, durante la mitosis de estas células multinucleadas, el conjunto total de cromosomas se distribuya de forma irregular entre las células hijas, lo cual podría dar lugar a anomalías cromosómicas numéricas como las observadas en este estudio y en el de Matos (2014) en plantas de *Aloe vera* tratadas con 0.1 % de colchicina, durante 48 h.

De manera similar, las observaciones en el número de cromosomas en la exposición más prolongada (4 h) indicaron que el efecto principal fue la aneuploidía, con una variación cromosómica de uno o dos cromosomas adicionales. En este sentido, se ha informado que los periodos de exposición más largos (o las altas concentraciones de colchicina) estimulan la aparición

the destabilizing effect on gene expression caused by duplication or deletion of some chromosomal regions (de Storme & Mason, 2014).

Sun et al. (2013) point out that when the chromosomal segments or chromosomes are reduced from two to one, dose compensation occurs (increased expression of the genes of the remaining chromosome) for most of the affected genes; in trisomic there is also a reduction as a result of inverse dose (the higher the dose, the lower the expression). With both positive and negative dose effects, the reduction in the expression of target genes will occur in both monosomic and trisomic. Birchler (2013) mentions that the variation in chromosomal number could be eliminated by selective advantage of normal diploid cells; if a large number of genes are affected, gene expression normalizes and the effect is silenced.

Information on how aneuploidy affects the characteristics of plants is limited. The regulatory aspects of the genome have a stoichiometric relationship, which is why it is inferred that aneuploidy produces harmful effects; however, in various tetraploid species (corn, barley, datura, lettuce, rye), aneuploid individuals have been detected in percentages ranging between 15-50 %. The above suggests that some species can produce aneuploid gametes and exhibit different levels of tolerance to aneuploidy. It has been determined that variations in gene expression depend on multiple factors such as dose of regulatory molecules, epigenetic factors, sensitivity of repetitive regions and gene silencing mechanisms (Birchler, 2013).

Plant speciation and diversification depend on structural changes in the nuclear genome, both at the whole ploidy and individual chromosome level (De Storme & Mason, 2014). Aneuploidy has not been considered as a factor in speciation and karyotype evolution, due to the destabilizing effect on gene expression caused by duplication or deletion of some chromosomes or chromosomal regions (Guerra, 2008). However, aneuploidy may confer positive effects on cellular growth and proliferation; it could also be an intermediate stage in the establishment of novel euploid karyotypes and contribute to the establishment of new karyotypes.

In *Malus*, aneuploid gametes may have an advantage over euploid gametes, contributing to increased heterozygosity and genetic variation (Considine et al., 2012). Likewise, in plants that reproduce asexually, somatic aneuploidy may be tolerated at high levels, and chimeric aneuploid sectors may contribute to formation of new plants through vegetative propagation (de Storme & Mason, 2014). Oleszczuk, Rabiza-Swider, Zimny, and Lukaszewski (2011) highlighted

de nuevas estructuras que contienen tubulina. Estas nuevas estructuras son similares a una red ondulada de "jaula de tubulina" que sustituye temporalmente a los verdaderos microtúbulos corticales (Caperta et al., 2006). Posiblemente, esta nueva estructura de tubulina polimerizada, la reversibilidad de los complejos tubulina-colchicina, la baja concentración de colchicina y el tiempo de exposición fueron factores que permitieron que la elongación de los microtúbulos se reanudara una vez que las células dejaron de estar en contacto con el mutágeno. Por tanto, el equilibrio entre todos estos factores es clave para que se dé la ploidía.

Durante el crecimiento *in vitro*, las plantas aneuploides regeneradas a partir de explantes expuestos a colchicina mostraron una evidente reducción de su tamaño y vigor con respecto a las plantas testigo. En este sentido, Zhu, Shao, Pan, Ge y Li (2015) observaron que las plantas aneuploides (nulisómicas) de *Brassica napus* presentaban cambios fenotípicos; eran más pequeñas con hojas pequeñas de color verde claro y tenían flores más pequeñas y dominancia no apical. Por el contrario, las plantas monosómicas mostraron una morfología similar a las plantas normales, pero florecieron aproximadamente 10 días antes. Asimismo, Matos (2014) menciona que en algunos casos se puede producir aneuploidía positiva, que promueve cambios a nivel morfológico como ligeros aumentos en las dimensiones foliares de las plantas, pero sin tener ningún efecto visible en el aumento de la acumulación de biomasa. En algunos casos la aneuploidía, como la monosomía y la nulisomía, puede causar mortalidad debido al efecto desestabilizador sobre la expresión génica causado por la duplicación o eliminación de algunas regiones cromosómicas (De Storme & Mason, 2014).

Sun et al. (2013) señalan que cuando los segmentos cromosómicos o cromosomas se reducen de dos a uno, se produce una compensación de la dosis (aumento de la expresión de los genes del cromosoma restante) para la mayoría de los genes afectados; en la trisomía también se produce una reducción como resultado inverso de la dosis (a mayor dosis, menor expresión). Con efectos de dosis tanto positivos como negativos, la reducción de la expresión de los genes objetivo se producirá tanto en los monosómicos como en los trisómicos. Birchler (2013) menciona que la variación en el número cromosómico podría eliminarse por la ventaja selectiva de las células diploides normales; si un gran número de genes se ve afectado, la expresión génica se normaliza y el efecto es silenciado.

La información sobre cómo afecta la aneuploidía a las características de las plantas es limitada. Los aspectos reguladores del genoma tienen una

the importance of aneuploid plants in the formation of double haploid lines in *XTriticosecale* Wittmack; likewise, they affirm that aneuploid individuals can be used in the assignment of markers on chromosomes, which can be an important tool in DNA marker-assisted breeding programs.

As mentioned above, aneuploid plants can show a reduction in size (dwarfism) relative to diploids. Dwarf phenotypes have been reported in aneuploid plants of *Musa*, *Brassica napus* and wheat (Roux, Toloza, Radecki, Zapata-Arias, & Dolezel, 2003; Zhu et al., 2015; Jiao et al., 2020). In the present investigation, the anthurium aneuploid plants were smaller than the diploid plants (control), which indicates that the *in vitro* mutagenesis protocol developed allows regenerating dwarf plants or smaller variants, which retain their ability to form flowers. Currently there are dwarf anthurium phenotypes on the market whose commercial demand is increasing. However, the anthurium germplasm that is marketed in Mexico comes from the Netherlands, since in the national catalog of plant varieties there is no record of any variety that has been generated in our country (Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas [SNICS], 2021).

The aneuploid plants generated with the protocol developed in the present work could be incorporated into an anthurium breeding program, identifying those mutants that present outstanding or novel characteristics of commercial interest. Since aneuploid plants can present high rates of mortality and infertility (de Storme & Mason, 2014), tissue culture (micropropagation) is a viable alternative to avoid the loss of plant material and maintain its aneuploid condition, as this technique allows cloning and multiplying a genotype from a small section of the donor plant (mother plant) (Teixeira-da Silva, Dobránszki, Winarto, & Zeng, 2015). From the selected genotypes, it is possible to obtain mutant lines, which could be used in vegetative propagation or as progenitors to generate hybrids. The combination of mutagenesis and tissue culture has been widely used in the improvement of vegetative propagated varieties and offers the possibility of generating a greater number of mutants with outstanding agronomic characters (Hernández-Muñoz, Pedraza-Santos, López, Gómez-Sanabria, & Morales-García, 2019).

Oladosu et al. (2016) highlight the potential of mutation plant breeding as a flexible and practiced approach applicable to any crop as long as the appropriate selection objectives and methods are used. In Mexico, induced mutagenesis has allowed the generation of varieties of different ornamentals crops (*Polianthes tuberosa*, *Dendranthema grandiflora*,

relación estequiométrica, por lo que se infiere que la aneuploidía produce efectos perjudiciales; sin embargo, en varias especies tetraploides (maíz, cebada, datura, lechuga, centeno) se han detectado individuos aneuploides en porcentajes que oscilan entre 15 y 50 %. Lo anterior sugiere que algunas especies pueden producir gametos aneuploides y presentan diferentes niveles de tolerancia a la aneuploidía. Se ha determinado que las variaciones en la expresión de los genes dependen de múltiples factores, como la dosis de moléculas reguladoras, los factores epigenéticos, la sensibilidad de las regiones repetitivas y los mecanismos de silenciamiento de genes (Birchler, 2013).

La especiación y la diversificación de las plantas dependen de los cambios estructurales en el genoma nuclear, tanto a nivel de la ploidía completa como de los cromosomas individuales (De Storme y Mason, 2014). La aneuploidía no ha sido considerada como un factor en la especiación y la evolución del cariotipo, debido al efecto desestabilizador en la expresión génica causado por la duplicación o eliminación de algunos cromosomas o regiones cromosómicas (Guerra, 2008). Sin embargo, la aneuploidía puede aportar efectos positivos sobre el crecimiento y la proliferación celular; también podría ser una etapa intermedia en el establecimiento de nuevos cariotipos euploides y contribuir al establecimiento de nuevos cariotipos. En *Malus*, los gametos aneuploides pueden tener una ventaja sobre los gametos euploides, contribuyendo a un incremento de la heterocigosidad y la variación genética (Considine et al., 2012). Asimismo, en las plantas que se reproducen asexualmente, la aneuploidía somática puede ser tolerada en niveles altos, y los sectores aneuploides quiméricos pueden contribuir a la formación de nuevas plantas a través de propagación vegetativa (De Storme & Mason, 2014). Oleszczuk, Rabiza-Swider, Zimny y Lukaszewski (2011) destacaron la importancia de las plantas aneuploides en la formación de líneas doblemente haploides en *XTriticosecale* Wittmack; asimismo, afirman que los individuos aneuploides pueden utilizarse en la asignación de marcadores en los cromosomas, lo cual puede ser una herramienta importante en programas de mejora asistida por marcadores de ADN.

Como se mencionó anteriormente, las plantas aneuploides pueden mostrar una reducción de tamaño (enanismo) en relación con las diploides. Se han reportado fenotipos enanos en plantas aneuploides de *Musa*, *Brassica napus* y trigo (Roux, Toloza, Radecki, Zapata-Arias, & Dolezel, 2003; Zhu et al., 2015; Jiao et al., 2020). En la presente investigación, las plantas aneuploides de anthurium fueron más pequeñas que las plantas diploides (testigo), lo cual indica que el protocolo de mutagénesis *in vitro* desarrollado permite regenerar plantas enanas o variantes más pequeñas, que

Euphorbiache pulcherrima, *Helianthus annuus*, *Laelia autumnalis*), among which anthurium is not found (Hernández-Muñoz et al., 2019). Induced mutagenesis could become a powerful tool for the genetic breeding of anthurium in Mexico, since it would allow the development of new varieties that adapt to the conditions that prevail in this country, as well as adjust to the needs of the national and international market, thereby reducing the country's current dependence on germplasm.

Conclusions

The effect of colchicine on anthurium explants was a function of the type of explant and the dose used. The greatest ability for regeneration of anthurium mutants occurred in node and root explants. Exposure of the explants to colchicine at the doses used gave rise to aneuploid plants (monosomic and trisomic), which showed different morphological characteristics from those of the wild genotype. Colchicine can be used in anthurium breeding programs to generate genetic variability.

Acknowledgments

The authors thank Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Mexico) for the scholarship granted to María Isabel López Martínez (1171170) to carry out her Master studies.

End of English version

References / Referencias

- Ahloowalia, B. S., Maluszynski, M., & Nichterlein, K. (2004). Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica*, 135, 187-204. doi: 10.1023/B:EUPH.0000014914.85465.4f
- Akhmanova, A., & Steinmetz, M. O. (2015). Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16, 711-726. doi: 10.1038/nrm4084
- Altinordu, F., Peruzzi, L., Yu, Y., & He, X. (2016). A tool for the analysis of chromosomes: KaryoType. *Taxon*, 65(3), 586-592. doi: 10.12705/653.9
- Álvarez-Holguín, A., Morales-Nieto, C. R., Avendaño-Arrazate, C. H., Santellano-Estrada, E., Melgoza-Castillo, A., Burrola-Barraza, M. E., & Corrales-Lerma, R. (2018). Dosis letal media y reducción media del crecimiento por radiación gamma en pasto africano (*Eragrostis lehmanniana* Ness). *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 5(13), 81-88. doi: 10.19136/era.a5n13.1268
- Azadi, P., Bagheri, H., Nalouisi, A. M., Nazari, F., & Chandler, S. F. (2016). Current status and biotechnological advances in genetic engineering of ornamental

mantienen su capacidad de formar flores. Actualmente existen en el mercado fenotipos de anturios enanos cuya demanda comercial va en aumento. Sin embargo, el germoplasma de anturio que se comercializa en México proviene de los Países Bajos, ya que en el catálogo nacional de variedades vegetales no hay registro de ninguna variedad que se haya generado en nuestro país (Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas [SNICS], 2021).

Las plantas aneuploides generadas con el protocolo desarrollado en el presente trabajo podrían ser incorporadas a un programa de mejoramiento de anturio, identificando aquellas mutaciones que presenten características sobresalientes o novedosas de interés comercial. Dado que las plantas aneuploides pueden presentar altas tasas de mortalidad e infertilidad (De Storme & Mason, 2014), el cultivo de tejidos (micropropagación) es una alternativa viable para evitar la pérdida de material vegetal y mantener su condición aneuploide, ya que esta técnica permite clonar y multiplicar un genotipo a partir de una pequeña sección de la planta donante (planta madre) (Teixeira-da Silva, Dobránszki, Winarto, & Zeng, 2015). A partir de los genotipos seleccionados es posible obtener líneas de mutaciones, que podrían utilizarse en la propagación vegetativa o como progenitores para generar híbridos. La combinación de mutagénesis y cultivo de tejidos ha sido utilizada ampliamente en el mejoramiento de variedades de propagación vegetativa y ofrece la posibilidad de generar un mayor número de mutaciones con características agronómicas sobresalientes (Hernández-Muñoz, Pedraza-Santos, López, Gómez-Sanabria, & Morales-García, 2019).

Oladosu et al. (2016) destacan el potencial del fitomejoramiento por mutación como un enfoque flexible y aplicable a cualquier cultivo siempre que se utilicen los objetivos y métodos de selección adecuados. En México, la mutagénesis inducida ha permitido generar variedades de diferentes cultivos ornamentales (*Polianthes tuberosa*, *Dendranthema grandiflora*, *Euphorbiache pulcherrima*, *Helianthus annuus*, *Laelia autumnalis*), entre las que no se encuentra el anturio (Hernández-Muñoz et al., 2019). La mutagénesis inducida podría convertirse en una poderosa herramienta para el mejoramiento genético de anturio en México, ya que permitiría el desarrollo de nuevas variedades que se adapten a las condiciones propias de este país, así como ajustarse a las necesidades del mercado nacional e internacional, reduciendo así la dependencia actual del país en cuanto a germoplasma.

Conclusiones

El efecto de la colchicina en los explantes de *A. andreanum* estuvo en función del tipo de explante

- plants. *Biotechnology Advance*, 34(6), 1073-1090. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.06.006
- Birchler, J. A. (2013). Aneuploidy in plants and flies: the origin of studies of genomic imbalance. *Seminar in Cell & Developmental Biology*, 24(4), 315-319. doi: 10.1016/j.semcd.2013.02.004
- Buldewo, S., & Jaufferally-Fakim, F. Y. (2002). Isolation of clean and PCR-amplifiable DNA from *Anthurium andreanum*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20(1), 71-71. doi: 10.1007/BF02801936
- Canul-Ku, J., García-Pérez, F., Campo-Bravo, E., Barrios-Gómez, E. J., de la Cruz-Torres, E., García-Andrade, J. M., Ozuna-Canizalez, F. J., & Ramírez-Rojas, S. (2012). Efecto de la irradiación sobre noche buena silvestre (*Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzsch) en Morelos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(8), 1495-1507. doi: 10.29312/remexca.v3i8.1316
- Caperta, A. D., Delgado, M., Ressurreição, F., Meister, A., Jones, R. N., Viegas, & Houben, A. (2006). Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells. *Protoplasma*, 227(2-4), 147-153. doi: 10.1007/s00709-005-0137-z
- Castillo-Diego, T. I. (2012). Viabilidad económica del cultivo de la flor de anturio y esquemas de comercialización. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 15(48), 19-25. Retrieved from http://www.utm.mx/edi_anteriores/temas48/T48_1Ensayo3-Viabilidad_economica.pdf
- Castillo-Martínez, C. R., de la Cruz-Torres, E., Carrillo-Castañeda, G., & Avendaño-Arrazate, C. H. (2015). Inducción de mutaciones en crisantemo (*Dendrathera grandiflora*) usando radiación gamma y etil metano sulfonato. *Agroproductividad*, 8(2), 60-64. Retrieved from <http://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/650>
- Chen, C., Hou, X., Zhang, H., Wang, G., & Tian, L. (2011). Induction of *Anthurium andreanum* "Arizona" tetraploid by colchicine *in vitro*. *Euphytica*, 181(2), 137-145. doi: 10.1007/s10681-010-0344-3
- Compton, D. A. (2011). Mechanisms of aneuploidy. *Current Opinion in Cell Biology*, 23(1), 109-113. doi: 10.1016/j.ceb.2010.08.007
- Considine, M. J., Wan, Y., D'Antuono, M. F., Zhou, Q., Han, M., Gao, H., & Wang, M. (2012). Molecular genetic features of polyploidization and aneuploidization reveal unique patterns for genome duplication in diploid *Malus*. *PLoS one*, 7(1), e29449. doi: 10.1371/journal.pone.0029449
- De Storme, N., & Mason, A. (2014). Plant speciation through chromosome instability and ploidy change: cellular mechanisms, molecular factors and evolutionary relevance. *Current Plant Biology*, 1, 10-33. doi: 10.1016/j.cpb.2014.09.002
- Díaz-López, E., Morales-Ruiz, A., Olivares-Hernández, A., Hernández-Herrera, P., & Juárez-Cortés, J. A. (2017). Gamma irradiation effect of ^{60}Co on the germination of two subtropical species in the Tehuacan-Cuicatlán Valley. *International Journal of Advanced Engineering* y de la dosis utilizada. La mayor capacidad de regeneración de los mutantes de *A. andreanum* se presentó en los explantes de nudos y raíces. La exposición de los explantes a la colchicina a las dosis utilizadas dio lugar a plantas aneuploides (monosómicas y trisómicas), que mostraron características morfológicas diferentes a las del genotipo silvestre. La colchicina puede utilizarse en los programas de reproducción de anturios para generar variabilidad genética.
- ### Agradecimientos
- Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) por la beca otorgada a María Isabel López Martínez (1171170) para la realización de sus estudios de maestría.
- Fin de la versión en español**
- =====
- Research and Science*, 4(8), 56-61. doi: 10.22161/ijaers.4.8.10
- Eng, W. H., & Ho, W. S. (2018). Polyploidization using colchicine in horticultural plants: A review. *Scientia Horticulturae*, 246, 604-617. doi: 10.1016/j.scienta.2018.11.010
- Estrada-Basaldua, J. A., Pedraza-Santos, M. E., Cruz-Torres, E., Martínez-Palacio, A., Sáenz-Romero, C., & Morales-García, J. L. (2011). Efecto de rayos gamma ^{60}Co en nardo (*Polianthes tuberosa* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(2), 445-458. Retrieved from <https://www.redalyc.org/exportar/cita/oa?id=263122300004>
- Farhan, A. S., & Martins, C. (2019) The modern view of B chromosomes under the impact of high scale omics analyses. *Cells*, 8(2), 1-26. doi: 10.3390/cells8020156
- Firbas, P., & Amon, T. (2014). Chromosome damage studies in the onion plant *Allium cepa* L. *Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*, 67(1), 25-35. doi: 10.1080/00087114.2014.891696
- Gallaga, L. S. (2000). *Producción de anturios*. Veracruz, México: Centro de Capacitación Agropecuario y Forestal A.C.
- Gantait, S., & Mandal, N. (2010). Tissue culture on *Anthurium*: a significant review and future prospective. *International Journal of Botany*, 6(3), 207-219. doi: 10.3923/ijb.2010.207.219
- García-Velázquez, A. (1990). *Técnicas y procedimientos de citogenética vegetal*. México: Talleres Gráficos de la Nación.
- González-Jiménez, J. (2004). La tecnología nuclear en el mejoramiento de las plantas. *Revista Ciencia*, 52, 43-52. Retrieved from https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/55_2/tecnologia_nuclear.pdf
- Guerra, M. (2008). Chromosome numbers in plant cytogenetics: concepts and implications. *Cytogenetics and Genome Research*, 120(3-4), 339-350. doi: 10.1159/000121083

- Guillot-Ortíz, D. (2008). Algunas cultivariedades de *Anthurium andreanum* Linden comercializadas en Valencia. *Bouteoua*, 2, 24-30. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2547542>
- Gupta, G. C., & Agnihotri, R. (2017). Vistas in breeding of roses. In: Malhotra, S. K. & Ram, L. (Eds.), *Advances in Floriculture and Landscape Gardening* (pp. 152-156). Medziphema, Nagaland, India: Central Institute of Horticulture.
- Hardham, A. R., & Gunnig, B. E. S. (1980). Some effects of colchicine on microtubules and cell division in roots of *Azolla pinnata*. *Protoplasma*, 102, 31-51. doi: 10.1007/BF01276946
- Hernández, L. (2004). El cultivo del anthurium. *Cultivos Tropicales*, 25(4), 41-51. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193225911004.pdf>
- Hernández-Muñoz, S., Pedraza-Santos, M. E., López, P. A., Gómez-Sanabria, J. M., & Morales-García, J. L. (2019). La mutagénesis en el mejoramiento de plantas ornamentales. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 25(3), 151-167. doi: 10.5154/r.rchsh.2018.12.022
- Heyman, J., Cools, T., Canher, B., Shavialenka, S., Trass, J., Vercauteren, L., Van den Daele, H., Persiau, G., de Jaeger, G., Sugimoto, K., & de Veylder, L. (2016). The heterodimeric transcription factor complex ERF115-PAT1 grants regeneration competence. *Nature Plants*, 2(11), 1-7. doi: 10.1038/nplants.2016.165
- Huetzel, B., Kreil, D. P., Matzke, M., & Matzke, A. J. (2008). Effects of aneuploidy on genome structure, expression and interphase organization in *Arabidopsis thaliana*. *Plos Genetics*, 4(10), 1-13. doi: 10.1371/journal.pgen.1000226
- Jiao, Z., Zhu, X., Li, H., Liu, Z., Huang, X., Wu, N., An, J., Li, J., Zhang, J., Jiang, Y., Li, Q., Qi, Z., & Niu, J. (2020). Cytological and molecular characterizations of a novel 2A nullisomic line derived from a widely-grown wheat cultivar Zhoumai 18 conferring male sterility. *Peer J*, 8, 10275, 1-26. doi: 10.7717/peerj.10275
- Lakshmanan, P. S., Laere, K. V., Eeckhaut, T., Huylenbroeck, J. V., Bockstaele, E. V., & Khrustaleva, L. (2015). Karyotype analysis and visualization of 45S rRNA genes using fluorescence *in situ* hybridization in aroids (Aracea). *Comparative Cytogenetics*, 9(2), 145-160. doi: 10.3897/2FCCompCytogen.v9i2.4366
- Leung, Y. Y., Li, L., Hui, Y., & Kraus, V. B. (2015). Colchicine-update on mechanisms of action and therapeutic uses. *Seminars in Arthritis Rheumatism*, 45(3), 341-350. doi: 10.1016/j.semarthrit.2015.06.013
- Levan, A., Fredga, K., & Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52(2), 201-220. doi: 10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953
- López-Puc, G., Ramírez-Mosqueda, M. A., & Lee-Espinosa, H. E. (2013). El cultivo moderno del anturio. *Revista Ciencia*, 64(3), 52-59. Retrieved from <https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/index.php/vol-64-numero-3/729-el-cultivo-moderno-del-cultivo-moderno-anturio>
- Messmer, M., Wilbois, K. P., Baier, C., Schäfer, F., Arncke, C., Drexler, D., & Hildermann, I. (2015). *Técnicas de mejora vegetal: Una valoración desde la agricultura ecológica*. Valencia, España: Editorial SEAE.
- Matos, A. Á. (2014). Efecto de diferentes concentraciones y tiempos de exposición de la colchicina en plantas de sábila [*Aloe vera* (L.) Burm. f.] *in vivo*. *Multiciencias*, 14(4), 382-388. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/904/90433839003.pdf>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Oleszczuk, S., Rabiza-Swider, J., Zimny, J., & Lukaszewski, J. A. (2011). Aneuploidy among androgenic progeny of hexaploid triticale (*XTriticosecale* Wittmack). *Plant Cell Reports*, 30(4), 575-586. doi: 10.1007/s00299-010-0971-0
- Pires-Cotias-de Oliveira, A. L., Silva-Guedes, M. L., & Cerqueira-Barreto, E. (1999). Chromosome numbers for *Anthurium* and *Philodendron* spp. (Aracea) occurring in Bahia, Brazil. *Genetic and Molecular Biology*, 22(2), 237-242. doi: 10.1590/S1415-47571999000200018
- Puchooa, D. (2005). *In vitro* mutation breeding of *Anthurium* by gamma radiation. *International Journal of Agriculture and Biology*, 7(1), 11-20. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/228631707_In_vitro_mutation_breeding_of_Anthurium_by_gamma_radiation
- Ramírez-Zea, G., & Chávez-Servia, J. L. (2014). *Mejoramiento genético en ornamentales del Estado de México*. México: Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México.
- Roughani, A., & Mehdi, M. S. (2018). *Polyploidy induction in ornamental plants*. Irán, Mahallat: Congreso Nacional de Flores y Plantas Ornamentales. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/328601169_Polyploidy_induction_in_ornamental_plants
- Roux, N., Toloza, A., Radecki, Z., Zapata-Arias, F. J., & Dolezel, J. (2003). Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry. *Plant Cell Reports*, 21(5), 483-490. doi: 10.1007/s00299-002-0512-6
- Ruiz, M. L., & Vázquez, A. M. (1982). Colchicine effect on the chromosome number of barley embryos cultured *in vitro*. *Protoplasma*, 113, 237-240. doi: 10.1007/BF01280913
- Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS). (2021). *Catálogo nacional de variedades vegetales*. México: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Retrieved from <https://www.gob.mx/snics/articulos/catalogo-nacional-de-variedades-vegetales-en-linea?idiom=es>
- Stebbins, G. L. (1971). *Chromosomal evolution in higher plants*. London, UK: Edward Arnold Ltd.
- Su, J., Jiang, J., Zhang, F., Liu, Y., Diang, L., Chen, S., & Chen, F. (2019). Current achievements and future prospects in genetic breeding of chrysanthemum: a review.

- Horticulturae Research*, 6(109), 1-9. doi: 10.1038/s41438-019-0193-8
- Sun, L., Johnson A. F., Donohuea, R. C., Jilong, L., Jianlin, C., & Birchler, A. (2013). Dosage compensation and inverse effects in triple X metafemales of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(18), 7383-7388. doi: 10.1073/pnas.1305638110
- Suraninpong, P., & Wuthisuthimethavee, S. (2015). Mutation induction of *Anthurium andreanum* using gamma radiation. *Acta Horticulturae*, 1083, 139-144. doi: 10.17660/ActaHortic.2015.1083.15
- Tapia-Pastrana, F., & Tapia-Aguirre, F. (2018). Localización de satélites y cromosomas NOR para la interpretación del cariotipo de *Sesbania virgata*. *Botanical Sciences*, 96(4), 619-627. doi: 10.17129/botsci.1972
- Teixeira-da Silva, A. J., Dobránszki, J., Winarto, B., & Zeng, S. (2015). *Anthurium in vitro*: A review. *Scientia Horticulturae*, 186, 266-298 doi: 10.1016/j.scienta.2014.11.024
- Tian, L. M., & Ma, Y. L. (2008). Polyploid induction and ploidy analysis of *Anthurium andraenum* Linden. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 36(32), 13977-13978.
- Torres, J., & Sanabria, M. E. (2011). Efecto del ambiente de desarrollo sobre la anatomía foliar de *Cattleya Jenmanii* rolfe y *C. Lueddemanniana* Rchb. F. (Orchidaceae). *Acta Botánica Venezolana*, 34(1), 199-214. Retrieved from <http://ve.scielo.org/pdf/abv/v34n1/art09.pdf>
- Valle-Sandoval, M. R., Mascorro-Gallardo, J. O., Gil-Vázquez, I., & Iturriaga-de-laFuente, G. (2008). Regeneración directa *in vitro* del crisantemo, *Dendrathera X grandiflorum* Kitam, a partir de segmentos de tallo. *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo*, 24(3), 219-227. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018629792008000300006
- Zhu, B., Shao, Y., Pan, Q., Ge, X., & Li, Z. (2015) Genome-wide gene expression perturbation induced by loss of C2 chromosome in allotetraploid *Brassica napus* L. *Frontiers in Plant Science*, 6(763), 1-16. doi: 10.3389/fpls.2015.00763