ESTABILIDAD E INESTABILIDAD CROMOSÓMICA *in vitro* EN TEJIDOS DESDIFERENCIADOS Y REDIFERENCIADOS DE *Haworthia*

In vitro CHROMOSOME STABILITY AND INSTABILITY IN DEDIFERENTIATED AND REDIFERENTIATED TISSUES OF *Haworthia*

Marcelina Vélez-Torres, Y. Leticia Fernández-Pavía* y Héctor González-Rosas†

Colegio de Postgraduados, Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Fruticultura, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México.

**Autor de correspondencia* (mapale1@colpos.mx)

RESUMEN

Tanto la estabilidad como la inestabilidad cromosómica son importantes en la generación de genotipos útiles para el mejoramiento genético de plantas. En el género *Haworthia* el número cromosómico básico es 7, con cuatro cromosomas grandes y tres pequeños. El objetivo de este estudio fue analizar la estabilidad e inestabilidad de los cromosomas en tejidos desdiferenciados y rediferenciados de *Haworthia* bajo condiciones *in vitro*. Segmentos de hojas de *H. marumiana* var. *batesiana*, *H. fasciata* var. *major* y *H. limifolia* var. *ubomboensis* fueron cultivados en medio basal Eriksson suplementado con ácido naftalenacético (ANA) 2 mg L^{-1} + bencilaminopurina (BA) 1.0 mg L^{-1}; ANA 5.0 mg L^{-1} + BA 1.0 mg L^{-1}, o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 5.0 mg L^{-1} + cinetina 1.0 mg L^{-1}. El análisis citogenético mostró mayor estabilidad cromosómica en células de raíces rediferenciadas cultivadas con 5.0 mg L^{-1} de ANA + 1.0 mg L^{-1} de BA al no mostrar variación del número (2n = 2x = 14) y morfología de cromosomas en *H. marumiana* var. *batesiana* y *H. fasciata* var. *major*. Las células de callo desdiferenciado tuvieron mayor variación del número y morfología de cromosomas en comparación con células de raíces rediferenciadas. La mayor inestabilidad se observó con 5.0 mg L^{-1} de 2,4-D + 1.0 mg L^{-1} de cinetina debido a la menor conservación del número diploide, generación de aneuploidía y poliploidía con números cromosómicos de 13, 15, 24, 26, 27 y 28, y cambios en la morfología de cromosomas de acrocéntricos a metacéntricos. La variación de las respuestas entre y dentro especies a los factores empleados (tipo y dosis de reguladores de crecimiento, fase de callo, mantenimiento de subcultivos) mostró que el genotipo juega un papel crucial en la conservación del número y morfología de los cromosomas, lo cual ofrece la oportunidad de realizar selección *in vitro* de genotipos clonales o de nuevas variantes para el mejoramiento genético de plantas.

Palabras clave: *Haworthia fasciata* var. *major*, *Haworthia limifolia* var. *ubomboensis*, *Haworthia marumiana* var. *batesiana*, callo, genotipo, reguladores de crecimiento.

SUMMARY

Both chromosomal stability and instability are important in generating genotypes useful for plant genetic improvement. In the genus *Haworthia* the basic chromosome number is 7, with four large chromosomes and three small. The aim of this study was to analyze the stability and instability of chromosomes in dedifferentiated and redifferentiated *Haworthia* tissues under *in vitro* conditions. Leaf segments of *H. marumiana* var. *batesiana*, *H. fasciata* var. *major*, and *H. limifolia* var. *ubomboensis* were cultured in Eriksson basal medium supplemented with naphthalene acetic acid (NAA) 2 mg L^{-1} + benzylaminopurine (BA) 1.0 mg L^{-1}. NAA 5.0 mg L^{-1} + BA 1.0 mg L^{-1}, or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 5.0 mg L^{-1} + kinetin 1.0 mg L^{-1}. Cytogenetic analysis showed greater chromosomal stability in re-differentiated root cells cultured with 5.0 mg L^{-1} of NAA + 1.0 mg L^{-1} of BA, by showing no variation in chromosome number (2n = 2x =14) and morphology in *H. marumiana* var. *batesiana* and *H. fasciata* var. *major*. Dedifferentiated callus cells had greater variation in chromosome number and morphology compared to redifferentiated root cells. The highest instability was observed with 5.0 mg L^{-1} of 2,4-D + 1.0 mg L^{-1} of kinetin, due to the lower retention of diploid number, the generation of aneuploidy and polyploidy with chromosome numbers of 13, 15, 24, 26, 27 and 28, and changes in chromosome morphology from acrocentric to metacentric forms. The variation in responses between and within species to the factors used (type and dosage of growth regulators, callus phase, subculture maintenance) showed that genotype plays a crucial role in the conservation of chromosome number and morphology, offering the opportunity to perform *in vitro* selection of clonal genotypes or new variants for genetic improvement of plants.

Index words: *Haworthia fasciata* var. *major*, *Haworthia limifolia* var. *ubomboensis*, *Haworthia marumiana* var. *batesiana*, callus, genotype, growth regulators.

INTRODUCCIÓN

El género *Haworthia* (Duval) pertenece al orden Asparagales y familia Asphodelaceae, endémico de Sudáfrica (Kim *et al*., 2018). El número cromosómico básico del grupo es 7, en las especies diploides (2n = 2x = 14) se presentan ocho cromosomas grandes y seis pequeños (cariotipo bimodal); sin embargo, el orden Asparagales también reúne especies con grupos cromosómicos que van desde diploides hasta octaploides (Parai *et al*., 2012). En *Haworthia* se ha reportado que del 35 al 49 % de sus especies y variedades son poliploides (Riley y Majumdar, 1966); en las subdivisiones Tessellatae y Coarctatae es común que se presenten formas poliploides y aneuploides (Parai *et al*., 2012); además, han surgido mutantes espontáneos que originaron poblaciones poliploides, como en *Haworthia limifolia* (Ahirwar *et al*., 2015).

La poliploidía ha sido un referente de dificultad para la propagación *in vitro* en distintas especies de *Haworthia*,

Recibido: 24 de septiembre de 2023
Aceptado: 30 de diciembre de 2023

DOI: https://doi.org/10.35196/rfm.2024.1.35

esta hipótesis concuerda con los resultados de Ogihara y Tsunewaki (1979), quienes señalaron para *H. setata* (Haw) que el análisis cromosómico de plantas regeneradas a partir de células de callo mostró número diploide de cromosomas y en células con número poliploide la organogénesis fue muy difícil de inducir. La poliploidía es indicativa de algún cambio en el genoma asociado directamente con la inestabilidad de los cromosomas, relación que coincide con los hallazgos de Mayer y Aguilera (1990), quienes reportaron que con un aumento en el número de ploidía se encontró un aumento en la inestabilidad cromosómica.

Si bien las causas de la inestabilidad cromosómica, son poco conocidas, se cree que una de las más comunes es la "transición de fase" (Gao *et al*., 2019), inducida por el cultivo *in vitro* (Neelakandan y Wang, 2012), en el cual se desestabiliza el programa genético y epigenético del tejido vegetal intacto y puede conducir a variaciones cromosómicas, activación de transposones, cambios de secuencias y en la metilación del ADN, que desembocan en la generación de variantes somaclonales;(Wang y Wang, 2012).

La fase de callo, tanto en su estado de desdiferenciación como de rediferenciación (Gao *et al*., 2019), y el uso de reguladores de crecimiento como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) han sido señalados como elementos fundamentales para la inducción de inestabilidad cromosómica manifestada por aberraciones cromosómicas, entre las que encuentran fragmentos, puentes, cromosomas rezagados, aneuploidía, poliploidía, y cambios en la cromatina, en el ciclo celular y en la estructura de los cromosomas (Pavlica *et al*., 1991); no obstante, se han reportado discrepancias con relación al efecto de tales elementos en otros cultivos. En *Pennisetum americanum*, Swedlund y Vasil (1985) observaron un ligero cambio a aneuploidía y poliploidía, con una fuerte selección a favor de la regeneración de plantas a partir de células de callo citogenéticamente estables. En *Daucus carota*, la omisión de 2,4-D indujo una caída significativa en la frecuencia de mitosis multipolares, lo que se atribuyó a una selección competitiva hacia células con número diploide en presencia de mecanismos que producen inestabilidad, manifestada como poliploidía, aneuploidía y estructuras alteradas (Bayliss, 1973; 1977). Estas discrepancias indican que la variación cromosómica en plantas regeneradas también depende del genotipo (Bairu *et al*., 2011). Hay genotipos que dan lugar a mayor inestabilidad cromosómica que otros en las mismas condiciones de cultivo (Puolimatka y Karp, 1993). Los posibles contrastes a nivel de especies del género *Haworthia* no han sido suficientemente analizados.

En este contexto, es importante investigar el comportamiento numérico y morfológico de los cromosomas y los factores que los afectan, lo cual es útil para implementar métodos de selección *in vitro*, dado que tanto la estabilidad como la inestabilidad cromosómica son importantes en el mejoramiento genético del cultivo, ya sea para desarrollar genotipos clonales o para generar genotipos con variantes novedosas. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue analizar la estabilidad e inestabilidad de los cromosomas en tejidos desdiferenciados y rediferenciados de *Haworthia* bajo condiciones *in vitro*, bajo la hipótesis de que existe una dependencia entre factores *in vitro* y genotipo para la conservación del número y morfología de los cromosomas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se emplearon tres especies de *Haworthia*: *H. marumiana* var. *batesiana*, *H. fasciata* var. *major* y *H. limifolia* var. *ubomboensis*. Las plantas fueron adquiridas en los invernaderos del mercado Madre Selva de Xochimilco, Ciudad de México.

Desinfestación y establecimiento

Segmentos de hoja etioladas de cada una de las tres especies de *Haworthia* se sumergieron por 30 s en alcohol etílico 70 %; posteriormente, en hipoclorito de sodio 4 % con dos gotas de Tween 20 durante 15 min. Se empleó el medio basal Eriksson (1965), y para suplementarlo se utilizaron tres tratamientos: a) ácido naftalenacético (ANA) 2.0 mg L^{-1} + 6-bencilaminopurina (BA) 1.0 mg L^{-1}, b) ANA 5.0 mg L^{-1} + BA 1.0 mg L^{-1}, y c) ácido 2-4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 5.0 mg L^{-1} + cinetina 1.0 mg L^{-1}. Se adicionaron 30.0 g L^{-1} de sacarosa. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7 ± 0.1. Como solidificante se empleó agar (8.0 g L^{-1}). Se realizó la esterilización en autoclave a 121° C y 1.5 kg cm^{-2} durante 15 min y se dispensaron 20 mL de medio de cultivo por frasco tipo Gerber. Se llevó a cabo la siembra con los explantes de hoja, los cuales fueron incubados a 25 ± 2 °C en oscuridad.

Multiplicación

Los callos obtenidos fueron aislados y subcultivados por 18 meses en medio basal Eriksson. La rediferenciación de raíces fue inducida en callos subcultivados en medio Eriksson con los diferentes tratamientos de auxinas (ANA, 2,4-D) y citocininas (BA o cinetina) utilizados en el establecimiento.

Análisis cromosómico

El análisis cromosómico se realizó en células de callos desdiferenciados y de raíces rediferenciadas; para ello, se tomaron al azar diferentes regiones superficiales del callo y ápices de raíces de las tres especies bajo estudio; se pretrataron en una solución 0.002 M de 8-hidroxiquinoleína a 18 o 20 °C por 2 h; se fijaron en solución Farmer (alcohol etílico y ácido acético en proporción 3:1). La hidrólisis o maceración se realizó con ácido clorhídrico (HCl 1 N) a 60 ± 1 °C durante 6 min. La tinción se hizo con el reactivo de Schiff (Fucsina)..

Para el montaje, se añadió una gota de acetocarmín 2 % y se realizó el aplastado. En cada una de las tres especies, las determinaciones cromosómicas fueron realizadas en 100 células en metafase, se utilizaron de cuatro a ocho individuos por especie, de acuerdo con la presencia de células en metafase. Las observaciones se realizaron en un microscopio binocular biológico (VE-B300, VELAB, Pharr, Texas, EUA) y se elaboraron los cariotipos de acuerdo con la clasificación de Levan *et al*. (1964). Los cromosomas se ordenaron de mayor a menor tamaño para la elaboración de cariotipos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Respuesta general de los genotipos a las condiciones proporcionadas *in vitro*

El cultivo *in vitro* de las tres especies de *Haworthia* fue difícil para la inducción de callo desdiferenciado y la rediferenciación de raíz. La diferencia entre genotipos fue evidente con el tratamiento de ANA 5.0 mg L^{-1} + BA 1.0 mg L^{-1} al mostrar que *H. limifolia* var. *ubomboensis* no tuvo respuesta a la rediferenciación de raíces (Cuadro 1); esto indica que no todos los genotipos responden a la selección a favor de la regeneración de plantas a partir de células de callo, como fue señalado por Swedlund y Vasil (1985). Contrariamente, con el mismo tratamiento las especies *H. marumiana* var. *batesiana* y *H. fasciata* var. *major* mostraron una respuesta altamente positiva, tanto en la rediferenciación de raíces como en la estabilidad cromosómica.

El tratamiento 5.0 mg L^{-1} de 2,4-D + 1.0 mg L^{-1} de cinetina también evidenció la diferencia entre genotipos, ya que fue letal para los callos de *H. marumiana* var. *batesiana*, no así para callos de *H. fasciata* var. *major* y *H. limifolia* var. *ubomboensis*; asimismo, con este tratamiento se observaron diferencias dentro de una misma especie a

Cuadro 1. Número cromosómico y morfología de los cromosomas observados en células de callos desdiferenciados y de raíces rediferenciadas en tres especies de *Haworthia* cultivadas *in vitro* con diferentes reguladores de crecimiento.

Reguladores	Tejido	Especies		
		H. marumiana var. *batesiana*	*H. fasciata* var. *major*	*H. limifolia* var. *ubomboensis*
ANA (2.0 mg L^{-1}) + BA (1.0 mg L^{-1})	CD	(2n=14) (2n-1=13) (2n+1=15) (4x-4=24) (4x-1=27) (4x=28) A	(2n=14) (4x-2=26) (4x-1=27) A, M	(2n=14) (4x-1=27) A, M
ANA (5.0 mg L^{-1}) + BA (1.0 mg L^{-1})	RR	(2n=14) A	(2n=14) A	SR
2,4-D (5.0 mg L^{-1}) + cinetina (1.0 mg L^{-1})	CD	CNS	(2n=14) (4x-4=24) A, M	(2n=14) (4x-2=26) (4x-1=27) A, M
	RR	(2n=14) (2n-1=13) (4x=28) A, M	(2n=14) (4x-2=26) A, M	(2n=14) (4x-1=27) A, M

CD: callos desdiferenciados, RR: raíces rediferenciadas, SR: sin respuesta, CNS: callo no sobrevivió, A: morfología acrocéntrica, M: morfología metacéntrica.

nivel de tejidos, ya que en *H. marumiana* var. *batesiana*, si bien al momento de realizar los estudios cromosómicos los callos desdiferenciados se encontraron muertos, las raíces ya rediferenciadas presentaron sobrevivencia favorable, lo cual es un indicio de la fuerte selección que se da a favor de la regeneración de plantas a partir de células citogenéticamente normales, como lo concluyeron Swedlund y Vasil (1985).

Asimismo, se encontró para todas las especies que en las células de callos desdiferenciados hubo mayor variación del número cromosómico en comparación con las células de raíces rediferenciadas, lo cual podría estar relacionado con el tiempo de 18 meses en el cual se había mantenido el estado de callo. Betekhtin *et al*. (2017) mencionaron que frecuentemente los cultivos de callo a largo plazo presentan una acumulación de cambios genéticos, incluida la poliploidización.

Estabilidad cromosómica

La mayor parte de los estudios citológicos realizados en células de callos desdiferenciados y ápices de raíces rediferenciadas de las tres especies de *Haworthia* mostraron el número cromosómico diploide 2n=2x=14, con la morfología y características del grupo y sus parientes *Aloe y Gasteria* (Sánchez y Raymúndez, 2017), ocho cromosomas grandes (L_1, L_2, L_3, L_4) y seis pequeños (S_1, S_2, S_3), todos acrocéntricos, lo cual coincide con Riley y Majumdar (1966) (Cuadro 1, Figura 1A).

La estabilidad, tanto del número cromosómico como de la morfología de los cromosomas y su relación con el tipo de tejido (callos desdiferenciados o raíces rediferenciadas) y los reguladores de crecimiento empleados para suplementar el medio de cultivo, tuvo los siguientes valores por especie:

H. marumiana var. *batesiana*

En las células de callos desdiferenciados cultivados con ANA 2.0 mg L^{-1} + BA 1.0 mg L^{-1} se encontró a los cromosomas con el número diploide en 90 de las 100 células observadas, y al analizar el cariotipo se observó que éstos también conservaron su morfología acrocéntrica. En las células de raíces rediferenciadas cultivadas con ANA 5.0 mg L^{-1} + BA 1.0 mg L^{-1} los cromosomas permanecieron sin cambios, tanto en número como en morfología, en las 100 células analizadas. En 92 de las células de raíces rediferenciadas cultivadas en 2,4-D 5.0 mg L^{-1} + cinetina 1.0 mg L^{-1} se mantuvo la condición diploide de los cromosomas y éstos con morfología acrocéntrica.

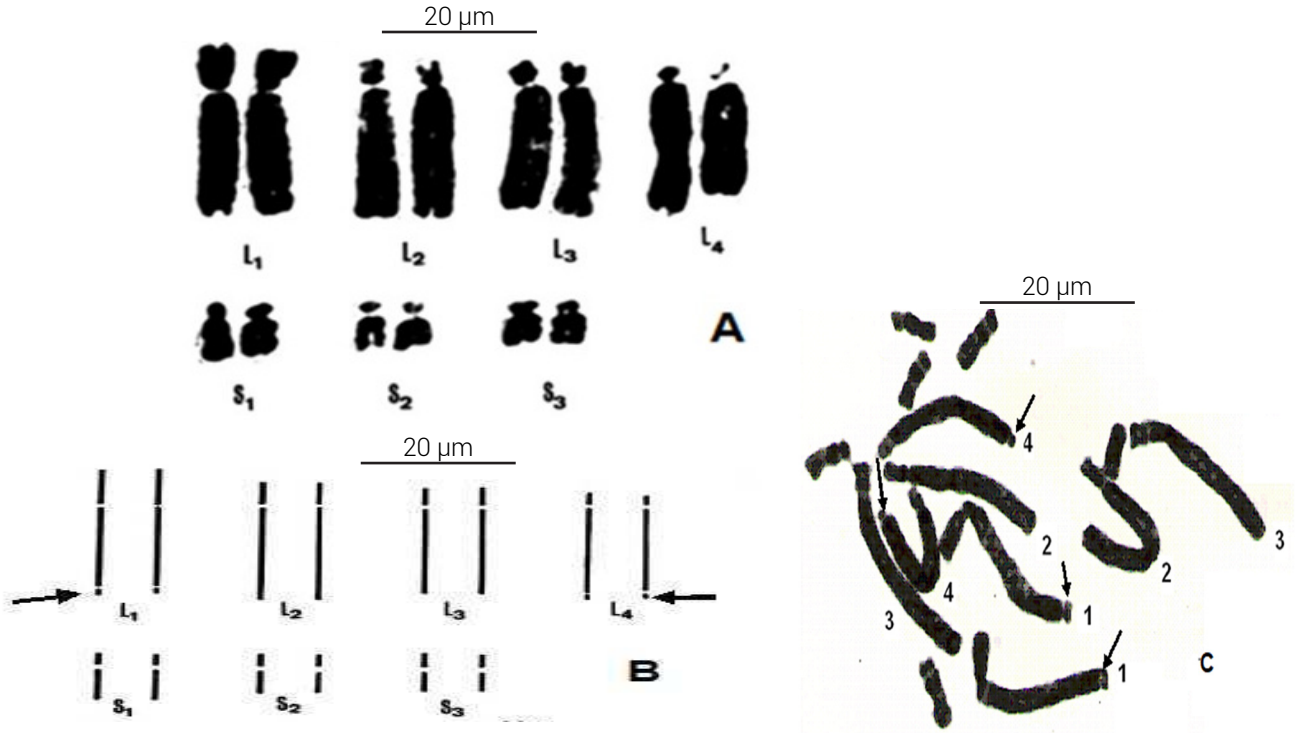


Figura 1. Cariotipo bimodal de callos desdiferenciados y ápices de raíces rediferenciadas de tres especies de *Haworthia*: A) ideograma que muestra cariotipo diploide normal, B) las flechas señalan satélites en los cromosomas L_1 y L_4.

H. fasciata* var. *major

En las células de callos desdiferenciados cultivados con ANA 2.0 mg L^{-1} + BA 1.0 mg L^{-1} los cromosomas presentaron la tendencia a permanecer con el número diploide en 96 de las 100 células analizadas y sin cambios en su morfología acrocéntrica. En cuanto a las células de raíces rediferenciadas cultivadas con ANA 5.0 mg L^{-1} + BA 1.0 mg L^{-1} el número diploide y la morfología acrocéntrica de los cromosomas persistieron en las 100 células observadas. El examen en células tanto del callo desdiferenciado como de raíces rediferenciadas en el tratamiento con 2,4-D 5.0 mg L^{-1} + cinetina 1.0 mg L^{-1} mostró la conservación del número diploide y la morfología acrocéntrica de los cromosomas únicamente en 10 células del total analizado.

H. limifolia* var. *ubomboensis

En 97 de las células observadas provenientes de callo desdiferenciado cultivado con ANA 2.0 mg L^{-1} + BA 1.0 mg L^{-1} los cromosomas conservaron el número diploide y morfología acrocéntrica. El análisis de 100 células de callo desdiferenciado cultivado con 2,4-D 5.0 mg L^{-1} + cinetina 1.0 mg L^{-1} mostró a 92 células en las que se conservó el nivel diploide y morfología acrocéntrica de los cromosomas. El estudio citogenético de los ápices de las células de raíces rediferenciadas, cultivadas con 2,4-D 5.0 mg L^{-1} + cinetina 1.0 mg L^{-1} mostró a 79 células con cromosomas diploides y sin cambios en su morfología.

En las tres especies de *Haworthia* la tendencia que tuvo la estabilidad, tanto en el número cromosómico como en la morfología de los cromosomas, fue dependiente de la especie, del tipo de tejido (callo desdiferenciado o raíces rediferenciadas), y de los reguladores de crecimiento, factores que han sido señalados como puntos clave para la estabilidad cromosómica (Bairu *et al*., 2011; Pavlica *et al*., 1991); sin embargo, se observó que el genotipo tiene una gran influencia en la respuesta al ambiente proporcionado bajo condiciones *in vitro*, pues no todas las especies mostraron el mismo comportamiento ante condiciones iguales de cantidad y clase de regulador, así como de tipo de tejido, pero tales diferencias no sólo quedaron a nivel de especies, sino que también se manifestaron dentro de la misma especie. Lo cual concuerda con las discrepancias señaladas por Bayliss (1973; 1977) o Swedlund y Vasil (1985) en otros cultivos. Los resultados de esta investigación dejan en evidencia la opción y oportunidad de realizar selección *in vitro* de genotipos que muestren estabilidad cromosómica, de acuerdo con los objetivos perseguidos; por ejemplo, para fines de mejoramiento genético sería una actividad primordial al garantizar el emparejamiento cromosómico durante las recombinaciones meióticas entre distintas especies (Vélez-Torres y Fernández-Pavía, 2023).

Es importante mencionar que en esta investigación el número cromosómico básico de las tres especies analizadas fue 2n=2x=14; sin embargo, en algunas poblaciones naturales de *H. limifolia* el número cromosómico ha cambiado; por ejemplo, Ahirwar *et al*. (2015) encontraron mutantes espontáneos en clones de esta especie, los cuales poseían 2n=28 cromosomas somáticos; por su parte, Parai *et al*. (2012) reportaron 2n=28 cromosomas somáticos para *H. limifolia* var. *keithii*.

Inestabilidad cromosómica

La inestabilidad, tanto del número cromosómico, como de la morfología de los cromosomas de acuerdo con los cariotipos elaborados para cada una de las especies y su relación con el tipo de tejido, callo desdiferenciado o raíces rediferenciadas, y los reguladores de crecimiento empleados en el medio de cultivo, tuvo los siguientes valores en las especies estudiadas:

H. marumiana* var. *batesiana

En callos desdiferenciados cultivados con ANA 2.0 mg L^{-1} + BA 1.0 mg L^{-1}, de las 100 células analizadas se encontraron tres con 13, una con 15, dos con 24, dos con 27 y dos con 28 cromosomas; Asimismo, el cariotipo mostró alteraciones en la morfología de los cromosomas (Figura 2A) al cambiar de cromosomas acrocéntricos a metacéntricos. En cuanto a las células de raíces rediferenciadas, cultivadas en 2,4-D 5.0 mg L^{-1} + cinetina 1.0 mg L^{-1}, se encontró que en cuatro células el número cromosómico fue 13 y su cariotipo mostró que 12 cromosomas tuvieron morfología acrocéntrica y uno metacéntrica; además, en cuatro células se encontró un nivel tetraploide (4x=28), aunque se conservó la morfología acrocéntrica en el cariotipo.

H. fasciata* var. *major

En tres de un total de 100 células analizadas de callos desdiferenciados cultivados con ANA 2.0 mg L^{-1} + BA 1.0 mg L^{-1} cambiaron los números cromosómicos a 26 y a 27; es decir, mostraron aneuploidía en relación al tetraploide. El examen de células de callo desdiferenciado y de raíces rediferenciadas cultivadas en un medio adicionado con 2,4-D 5.0 mg L^{-1} + cinetina 1.0 mg L^{-1} de cinetina, mostró una dominancia de aneuploides en 90 células; los números observados fueron 24 y 26 cromosomas para cada tipo de tejido, respectivamente. Además de los diferentes cambios en número cromosómico, al analizar el cariotipo se encontró que en tales células se formaron cromosomas metacéntricos debido a la fusión de dos

cromosomas acrocéntricos que originaron un cromosoma dicéntrico (dos centrómeros) con longitud mayor, con lo cual, a su vez, se causó la disminución del número total de cromosomas (Figuras 2B y C). Estos hallazgos coinciden con los de Mayer y Aguilera (1990), quienes sugirieron que la aneuploidía incrementa la frecuencia de eventos de pérdida de cromosomas.

H. limifolia* var. *ubomboensis

El análisis cromosómico de células de callos desdiferenciados cultivados en ANA 2.0 mg L^{-1} + BA 1.0 mg L^{-1} exhibió a tres células con aneuploidía de 27 cromosomas y con uno de los cromosomas pequeños como metacéntrico. En las células derivadas de callos desdiferenciados cultivados con 2,4-D 5.0 mg L^{-1} + cinetina 1.0 mg L^{-1}, 35 de las células mostraron un cromosoma metacéntrico, cuatro presentaron la condición aneuploide con 26 y cuatro presentaron 27 cromosomas. En las células rediferenciadas de ápices de raíz, en este mismo medio de cultivo, se encontraron 21 células con aneuploidía de 27 cromosomas, los cuales presentaron un cromosoma metacéntrico.

Estabilidad de satélites y cariotipo bimodal

Las tres especies de *Haworthia* estudiadas se caracterizaron por presentar satélites en los dos brazos largos de dos cromosomas largos (2L 1 y 2L 4, Figura 1B-C); esto concuerda con lo encontrado por Jessy *et al*.

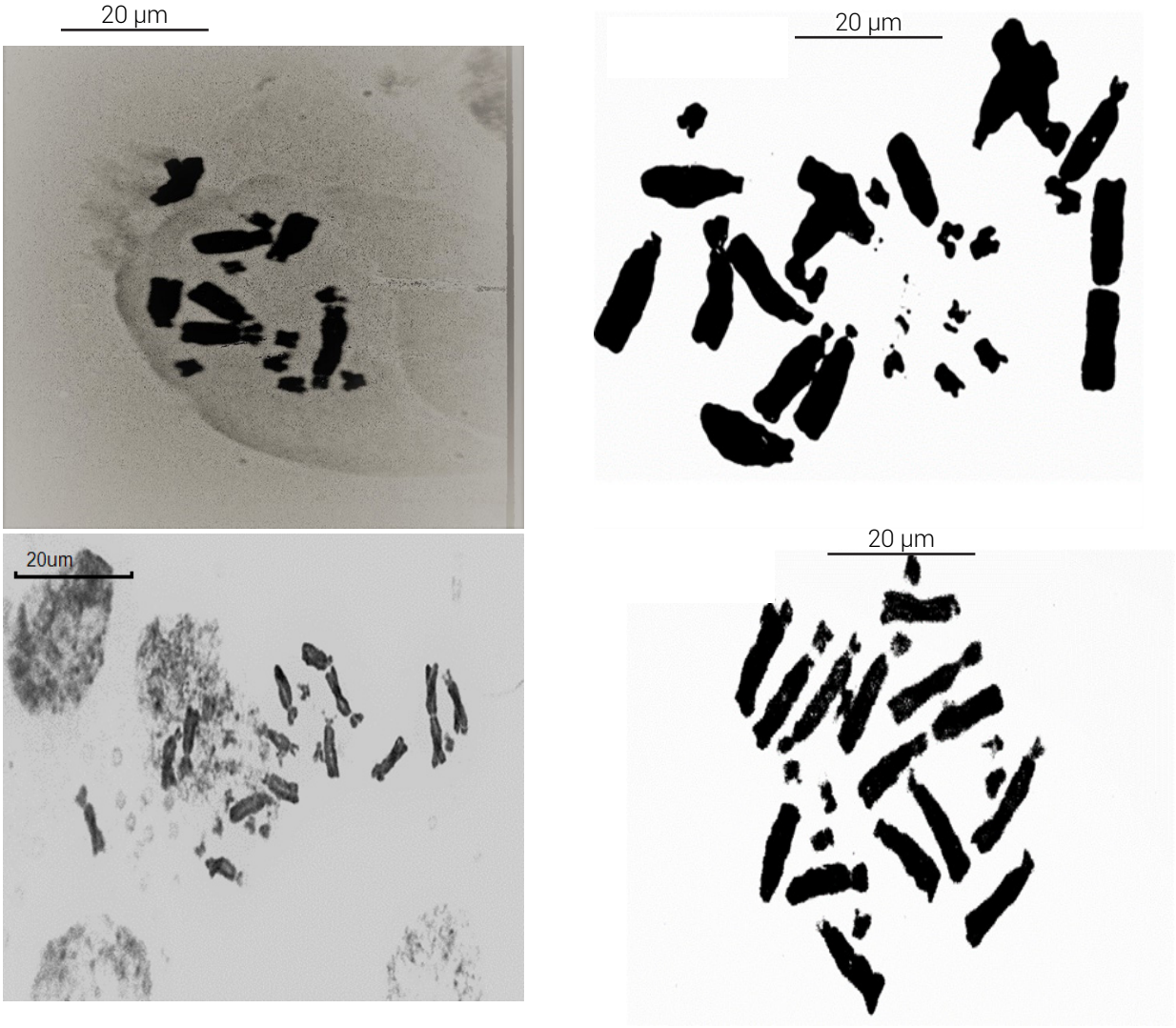


Figura 2. Alteraciones encontradas en cromosomas de tres especies de *Haworthia*: A) aneuploidía con respecto al diploide, B-D) aneuploidías con respecto al tetraploide y cromosomas metacéntricos por fusión de dos cromosomas acrocentricos (señalados con flechas).

(2005) para los cariotipos de cuatro especies, pese a su distinto número cromosómico, *H. papillosa* Haw. (2n=14), *H. fasciata* Haw. (2n=14), *H. limifolia* Marl. (2n=21) y *H. reinwardtii* Haw. (2n=35); además, concluyeron que independientemente de la naturaleza de los satélites, la característica común fue que se presentaron en el brazo largo de los respectivos cromosomas grandes en las cuatro especies, situación que coincide para las tres especies de la presente investigación, en las que aun cuando los distintos tratamientos en el medio de cultivo causaron cambios en número y morfología de cromosomas, en la presencia de los satélites no se observaron cambios. Parai *et al*. (2012) obtuvieron resultados similares para *H. radula* (Haw.) Duval (2n=14); sin embargo, en una especie autotetraploide (2n=28), *H. limifolia* Marl. var. *keithii*, no encontraron satélites.

Se considera complicado precisar la causa que produjo los cambios en los niveles del número y morfología de los cromosomas; sin embargo, los resultados concuerdan con los de Lee y Phillips (1988) en que la inestabilidad cromosómica se asocia más con el crecimiento desorganizado en callo. También fue evidente que cuando las células de callo desdiferenciado fueron cultivadas en 2,4-D y cinetina la inestabilidad fue mayor, ya que los niveles de ploídia aumentaron y se dieron cambios en morfología que originaron cromosomas metacéntricos, por lo cual a tal auxina se le puede considerar como un agente capaz de detener la división celular ocasionando irregularidades cromosómicas, como lo señalo Fiskesjö *et al*. (1981). Pavlica *et al*. (1991) encontraron que los tipos más frecuentes de aberraciones inducidas por el 2,4-D son fragmentos, puentes, poliploidías y aneuploidías, así como cambios en la actividad mitótica, en el ciclo celular y en la cromatina. También se puede suponer que en células que sufren cambios cromosómicos en alta frecuencia los efectos citológicos pueden ser una consecuencia directa de un incremento en la proporción de la división celular, inducida por la auxina e inclusive que ésta puede operar como un agente mutagénico. No obstante, también la combinación de ANA 2.0 mg L^{-1} + BA 1.0 mg L^{-1}, y la fase de callo causaron cambios en el número y la morfología de los cromosomas en las tres especies de *Hawothia*, pero no con un efecto drástico como el del 2,4-D. Otro factor evidente en los resultados fue la influencia del genotipo, Puolimatka y Karp (1993) en un estudio en centeno, señalaron que hay genotipos que dan lugar a mayor inestabilidad que otros en las mismas condiciones de cultivo; por lo tanto, es necesario considerar que el tipo de auxina o citocinina adicionada al medio de cultivo, el tipo de tejido (callo desdiferenciado o raíces rediferenciadas), el tiempo de mantenimiento del callo, el genotipo, y la combinación de todos estos factores interactuan durante el cultivo *in vitro* de *Haworthia* para la estabilidad cromosómica.

En referencia al cariotipo, en esta investigación se encontró que el cariotipo bimodal permaneció estable cuando el número cromosómico diploide también así lo fue, pero cuando hubo poliploidía y aneuplodía se presentaron distintos cariotipos bimodales de acuerdo con el nivel de ploidía. Oginara (1981) mencionó que en todas las Aloineae la estabilidad del cariotipo bimodal es constante, ya que existe una fuerte selección para la conservación del cariotipo básico; sin embargo, en *Haworthia* las especies tetraploides presentaron 16 cromosomas grandes y 12 cortos (Parai *et al*., 2012), en especies triploides 12 largos y nueve cortos, y en pentaploides 20 largos y 15 cortos (Jessy *et al*., 2025).

CONCLUSIONES

Las especies de *Haworthia* cultivadas *in vitro*, *H. marumiana* var. *batesiana* y *H. fasciata* var. *major* mostraron la mayor estabilidad en células de raíces rediferenciadas cultivadas en ANA 5.0 mg L^{-1} + BA 1.0 mg L^{-1} al no exhibir variación en el número cromosómico (2n=2x=14) ni en la morfología de cromosomas; sin embargo, no fue así para *H. limifolia* var. *ubomboensis*. En las células de callo hubo mayor variación en número y morfología de cromosomas, en comparación con las células de raíz. La combinación de 2,4-D 5.0 mg L^{-1} + cinetina 1.0 mg L^{-1} y callo resultó letal dentro de la especie *H. marumiana var. batesiana*. La mayor inestabilidad en células tanto de callos como raíces se obtuvo con la dosis de 2,4-D 5.0 mg L^{-1} + cinetina 1.0 mg L^{-1}, donde se encontró la menor conservación del número diploide y generación de poliploidía y aneuploidía, con números cromosómicos de 13, 14, 24, 26, 27 y 28, además de cambios en la morfología de los cromosomas de acrocéntricos a metacéntricos. También, la combinación de ANA 2.0 mg L^{-1} + BA 1.0 mg L^{-1} y fase de callo, causó cambios en el número y morfología de los cromosomas en las tres especies de *Haworthia*, pero no con un efecto drástico como el del 2,4-D. Los resultados evidenciaron que la respuesta del genotipo al ambiente proporcionado *in vitro* juega un papel importante para la estabilidad cromosómica, y brinda la oportunidad de realizar selección bajo tales condiciones de cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

Ahirwar R., P. Shrivastava and R. C. Verma (2015) Spontaneous inversion heterozygote in *Haworthia limifolia*. *Cytologia* 80:415-418, https://doi.org/10.1508/cytologia.80.415

Bairu M. W., A. O. Aremu and J. Van Staden (2011) Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation* 63:147-173, https://doi.org/10.1007/s10725-010-9554-x

Bayliss M. W. (1973) Origin of chromosome number variation in cultured plant cells. *Nature* 246:529-530, https://doi.org/10.1038/246529a0

Bayliss M. W. (1977) Factors affecting the frequency of tetraploid cells in a predominantly diploid suspension culture of *Daucus carota*. *Protoplasma* 92:109-115, https://doi.org/10.1007/BF01280203

Betekhtin A., M. Rojek, J. Jaskowiak, A. Milewska-Hendel, J. Kwasniewska, Y. Kostyukova, … and R. Hasterok (2017) Nuclear genome stability in long-term cultivated callus lines of *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. *PLoS ONE* 12:e0173537, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173537

Eriksson T. (1965) Studies on the growth requirements and growth measurements of cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Physiologia Plantarum* 18:976-993, https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1965.tb06994.x

Fiskesjö G., C. Lassen and L. Renberg (1981) Chlorinated phenoxyacetic acids and chlorophenols in the modified *Allium* test. *Chemico-Biological Interactions* 34:333-344, https://doi.org/10.1016/0009-2797(81)90105-8

Gao Y., M. Zhao, X. H. Wu, D. Li, D. Borthakur, J. H. Ye, … and J. L. Lu (2019) Analysis of differentially expressed genes in tissues of *Camellia sinensis* during dedifferentiation and root redifferentiation. *Scientific Reports* 9:2935, https://doi.org/10.1038/s41598-019-39264-5

Jessy N. S., R. Begum, M. Khatun and S. S. Alam (2005) Differential fluorescent chromosome banding of four species in *Haworthia* Duval (Aloaceae). *Cytologia* 70:435-440, https://doi.org/10.1508/cytologia.70.435

Kim D. H., K. W. Kang and I. Sivanesan (2018) Influence of auxins on somatic embryogenesis in *Haworthia retusa* Duval. *Biologia* 74:25-33, https://doi.org/10.2478/s11756-018-0151-1

Lee M. and R. L. Phillips (1988) The chromosomal basis of somaclonal variation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39:413-437, https://doi.org/10.1146/annurev.pp.39.060188.002213

Levan A., K. Fredga and A. A. Sandberg (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-220, https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x

Mayer V. W. and A. Aguilera (1990) High levels of chromosome instability in polyploids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 231:177-186, https://doi.org/10.1016/0027-5107(90)90024-X

Neelakandan A. K. and K. Wang (2012) Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Reports* 31:597-620, https://doi.org/10.1007/s00299-011-1202-z

Ogihara Y. (1981) Tissue culture in *Haworthia*. IV. Genetic characterization of plants regenerated from callus. *Theoretical and Applied Genetics* 60:353-363, https://doi.org/10.1007/BF00264330

Ogihara Y. and K. Tsunewaki (1979) Tissue culture in *Haworthia*. III. Occurrence of callus variants during subcultures and its mechanism. *The Japanese Journal of Genetics* 54:271-293, https://doi.org/10.1266/jjg.54.271

Parai P., A. Saha and A. Mukherjee (2012) Karyomorphology of three species of *Haworthia* Duval (Xanthorrhoeaceae). *The Nucleus* 55:143-148, https://doi.org/10.1007/s13237-012-0070-4

Pavlica M., D. Papeš and B. Nagy (1991) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid causes chromatin and chromosome abnormalities in plant cells and mutation in cultured mammalian cells. *Mutation Research Letters* 263:77-81, https://doi.org/10.1016/0165-7992(91)90063-A

Puolimatka M. and A. Karp (1993) Effect of genotype on chromosome variation in tissue culture of inbred and outbred rye. *Heredity* 71:138-144, https://doi.org/10.1038/hdy.1993.117

Riley H. P. and S. K. Majumdar (1966) Chromosome studies of diploid and polyploid plants of *Haworthia*. *Botanical Gazette* 127:239-242, https://doi.org/10.1086/336371

Sánchez G. Y. y M. B. Raymúndez (2017) Análisis del cariotipo del híbrido natural *Aloe* x *spinosissima* y de sus parentales *Aloe arborescens* y *Aloe humilis*, mediante bandeo cromosómico C, CMA y DAPI. *Rodriguésia* 68:1263-1272, https://doi.org/10.1590/2175-7860201768410

Swedlund B. and I. K. Vasil (1985) Cytogenetic characterization of embryogenic callus and regenerated plants of *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. *Theoretical and Applied Genetics* 69:575-581, https://doi.org/10.1007/BF00251107

Vélez-Torres M. y Y. L. Fernández-Pavía (2023) Selección *in vitro* de genotipos de *Haworthia* con estabilidad cromosómica a través de análisis citogenéticos. *Agro-Divulgación* 3:57-60, https://doi.org/10.54767/ad.v3i4.229

Wang Q.-M. and L. Wang (2012) An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation. Plant Cell Reports 31:1535-1547, https://doi.org/10.1007/s00299-012-1281-5