



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**Programa Institucional de Maestría en
Ciencias Biológicas**

**Morfogénesis *in vitro*, identificación y control de hongos
contaminantes y efecto de rayos gamma en nardo (*Polianthes
tuberosa* L.)**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

Jorge Adán Estrada Basaldua

Directora de Tesis: Dra. Martha Elena Pedraza Santos

Morelia, Michoacán, agosto de 2010.



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

DR. HÉCTOR EDUARDO MARTÍNEZ FLORES
COORDINADOR GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

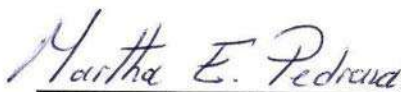
Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Morfogénesis *in vitro*, identificación y control de hongos contaminantes y efecto de rayos gamma en nardo (*Polianthes tuberosa* L.)" presentado por el ING. JORGE ADÁN ESTRADA BASALDUA, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestro en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

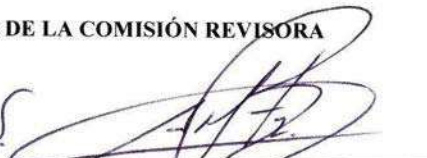
ATENTAMENTE

Morelia, Michoacán, a 03 de agosto de 2010

MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA



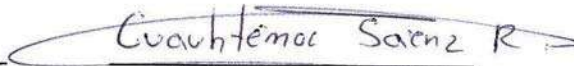
Dra. Martha Elena Pedraza Santos



Dr. Alejandro Martínez Palacios



Dr. José Luciano Morales García



Dr. Cuauhtémoc Sáenz Romero



M.C. Eulogia de la Cruz Torres

DEDICATORIA

A Dios: por darme la fuerza, paciencia y entendimiento necesarios para realizar esta investigación.

A mi familia: por el apoyo incondicional que me dieron para la realización de este trabajo de investigación.

A mis amigos: por su amistad y por el apoyo que me dieron durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico que me proporcionaron al otorgarme una beca de maestría.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo porque a través del Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas y la Facultad de Agrobiología Presidente Juárez me permitieron realizar mis estudios de maestría en ciencias.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) por el apoyo que dieron en la realización de este trabajo de investigación.

A mis asesores de tesis Dra. Martha Elena Pedraza Santos, Dr. Alejandro Martínez Palacios, Mc. Eulogio de la Cruz Torres, Dr. Cuauhtémoc Sáenz Romero y Dr. José Luciano Morales García por su invaluable asesoría, respaldo y amistad.

A mi primo Homero Godínez Basaldua por su valiosa ayuda en la realización de este proyecto de investigación.

A los productores de nardo de San Andrés, en especial a Miguel García y Jesús Mujica por proporcionarme el material vegetativo para este trabajo de investigación.

A mi familia, en especial a mi madre María Bertha Basaldua Gutiérrez por haberme apoyado en la realización de este trabajo de investigación.

A mis compañeros de laboratorio José Jesús Banderas Espinoza y Ofmara Yadira Martínez Montaña por el valioso apoyo que me brindaron durante el desarrollo de esta investigación.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE CUADROS.	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.	v
ÍNDICE DE CUADROS DEL APENDICE.	vii
RESUMEN GENERAL.	xi
GENERAL SUMMARY.....	xiii
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
Objetivos.....	2
Hipótesis.....	3
METODOLOGÍA GENERAL.....	4
CAPÍTULO 1. IDENTIFICACIÓN Y CONTROL DE HONGOS CONTAMINANTES DE CULTIVOS <i>in vitro</i> DE NARDO (<i>Polianthes tuberosa</i> L.)	5
I. RESUMEN.....	5
Abstract.....	5
II: INTRODUCCIÓN.....	6
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
3.1 Localización del sitio experimental.....	7
3.2 Material vegetal.....	7
3.3 Establecimiento del cultivo aséptico.....	7
3.4 Identificación de los agentes causales.....	7
3.5 Bioensayo con fungicidas bajo condiciones <i>in vitro</i> para el control de los agentes contaminantes durante la micropropagación de nardo.	8
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
4.1 Identificación de los agentes causales de la contaminación de cultivos <i>in vitro</i> de nardo.....	9
4.2 Efecto de fungicidas para el control de <i>Fusarium</i> sp. bajo condiciones <i>in vitro</i>	11
4.3 Efecto de fungicidas para el control de <i>Rhizopus</i> sp. bajo condiciones <i>in vitro</i>	13
4.4 Efecto del tipo de acción de los fungicidas para el control de <i>Fusarium</i> sp. y <i>Rhizopus</i> sp. bajo condiciones <i>in vitro</i>	15
V. CONCLUSIONES.....	16

VI. LITERATURA CITADA.....	17
CAPÍTULO 2 MORFOGÉNESIS <i>in vitro</i> EN NARDO (<i>Polianthes tuberosa</i> L.)	19
I. RESUMEN.....	19
Abstract.....	19
II. INTRODUCCIÓN.....	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1 Localización del sitio experimental.....	21
3.2 Material vegetal.....	21
3.3 Organogénesis a partir de bulbos y tubérculos.....	21
3.3.1 Establecimiento del cultivo aséptico.....	21
3.3.2 Efecto de diferentes concentraciones de sales minerales del medio MS en el desarrollo de plantas de nardo.....	22
3.3.3 Efecto de diferentes dosis de BA y ANA en bulbos de nardo.....	22
3.3.4 Aclimatación.....	23
3.4 Embriogénesis somática a partir de explantes florales de nardo.....	23
3.4.1 Establecimiento del cultivo aséptico de inflorescencias.....	23
3.4.2 Efecto de diferentes dosis de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en botones y pétalos de nardo.....	24
3.4.3 Efecto de diferentes concentraciones de BA y 2,4-D en masas proembriogénicas de nardo.....	24
3.5 Análisis estadístico.....	25
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
4.1 Organogénesis en nardo.....	25
4.1.1 Establecimiento del cultivo aséptico.....	25
4.1.2 Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de sales minerales del medio MS en el desarrollo de plantas de nardo.....	26
4.1.3 Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de BA y ANA en el desarrollo de bulbos de nardo.....	27
4.1.4 Aclimatación.....	28
4.2 Embriogénesis somática en nardo.....	29
4.2.1 Establecimiento del cultivo aséptico.....	29

4.2.2 Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en botones y pétalos de nardo.....	29
4.2.3 Evaluación del efecto de la combinación de diferentes concentraciones de BA y 2,4-D en masas proembriogénicas de nardo.....	33
V. CONCLUSIONES.....	38
VI. LITERATURA CITADA.....	38
CAPÍTULO 3 EFECTO DE RAYOS GAMMA ⁶⁰ Co EN NARDO (<i>Polianthes tuberosa</i> L.)	41
I. RESUMEN.....	41
Abstract.....	41
II. INTRODUCCIÓN.....	42
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
3.1 Localización del sitio experimental.....	43
3.2 Material vegetal.....	43
3.3 Irradiación del material vegetal.....	43
3.4 Pruebas de radiosensibilidad.....	44
3.4.1 Establecimiento <i>in vitro</i> de explantes de tubérculos irradiados.....	44
3.4.2 Establecimiento <i>in vivo</i> de tubérculos irradiados	44
3.4.3 Análisis estadístico.....	45
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
4.1 Pruebas de radiosensibilidad.	45
4.1.1 Establecimiento <i>in vitro</i> de explantes irradiados de nardo e <i>in vivo</i> de tubérculos irradiados.	45
V. CONCLUSIONES.....	52
VI. LITERATURA CITADA.....	52
DISCUSIÓN GENERAL.....	55
RECOMENDACIONES.....	57
BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA.....	58
APÉNDICE.....	61

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadros	Pág.
CAPÍTULO 1. IDENTIFICACIÓN Y CONTROL DE HONGOS CONTAMINANTES DE CULTIVOS <i>in vitro</i> DE NARDO (<i>Polianthes tuberosa</i> L.).	
1 Fungicidas e ingredientes activos utilizados para el control de <i>Fusarium</i> sp. y <i>Rhizopus</i> sp. aislados de cultivos <i>in vitro</i> de nardo.	8
2 Descripción del micelio de hongos contaminantes de cultivos <i>in vitro</i> de nardo en cada tratamiento.	9
CAPÍTULO 2 MORFOGÉNESIS <i>in vitro</i> EN NARDO (<i>Polianthes tuberosa</i> L.).	
1 Tratamientos utilizados para evaluar el efecto de la concentración de sales del medio MS en el desarrollo de brotes de nardo.	22
2 Tratamientos utilizados para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA) en bulbos de nardo. ..	23
3 Tratamientos utilizados para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D en botones florales y pétalos de nardo.	24
4 Tratamientos utilizados para evaluar el efecto de la combinación de diferentes concentraciones 2,4-D y BA en masas proembriónicas de nardo.	25
5 Efecto de diferentes concentraciones de benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA) en el desarrollo de bulbos de nardo.	27
CAPÍTULO 3 EFECTO DE RAYOS GAMMA ^{60}Co EN NARDO (<i>Polianthes tuberosa</i> L.).	
1 Relación de dosis a las que fueron expuestos los tubérculos de nardo.	43
2 Desarrollo de plántulas <i>in vitro</i> derivadas de tubérculos de nardo irradiados con ^{60}CO	46
3 Desarrollo vegetativo de plantas derivadas de tubérculos de nardo (<i>Polianthe tuberosa</i> L.) irradiados con ^{60}CO	47
4 Desarrollo vegetativo de plantas derivadas de brotes <i>in vitro</i> y tubérculos de nardo (<i>Polianthes tuberosa</i> L.) irradiados con ^{60}CO después de cuatro meses.	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras	Pág.
CAPÍTULO 1. IDENTIFICACIÓN Y CONTROL DE HONGOS CONTAMINANTES DE CULTIVOS <i>in vitro</i> DE NARDO (<i>Polianthes tuberosa</i> L.).	
1	Desarrollo de la colonia y estructuras del hongo <i>Fusarium</i> sp. bajo condiciones <i>in vitro</i> a los 8 días de establecido el experimento. 10
2	Desarrollo de la colonia y estructuras del hongo <i>Rhizopus</i> sp. bajo condiciones <i>in vitro</i> 11
3	Efecto del tipo de fungicida sobre el control del desarrollo <i>in vitro</i> de <i>Fusarium</i> sp. 12
4	Inhibición del crecimiento de colonias de <i>Fusarium</i> sp. por fungicidas sistémicos y de contacto. 12
5	Inhibición del crecimiento de colonias de <i>Rhizopus</i> sp. por fungicidas sistémicos y de contacto. 14
6	Efecto del tipo de fungicida sobre el control del desarrollo <i>in vitro</i> de <i>Rhizopus</i> sp. 14
7	Acción del tipo de fungicida sobre el control del desarrollo <i>in vitro</i> de <i>Fusarium</i> sp. 15
8	Acción del tipo de fungicida sobre el control del desarrollo <i>in vitro</i> de <i>Rhizopus</i> sp. 16
CAPÍTULO 2 MORFOGÉNESIS <i>in vitro</i> EN NARDO (<i>Polianthes tuberosa</i> L.).	
1	Aclimatación de brotes <i>in vitro</i> de nardo. 28
2	Callos embriogénicos desarrollados a partir de botones florales y pétalos. ... 30
3	Efecto de cinco dosis de 2,4-D en la inducción de callo a partir de botones florales de nardo después de dos meses de cultivo <i>in vitro</i> 31
4	Efecto de cinco dosis de 2,4-D en el necrosamiento de callos inducidos a partir de botones florales de nardo después de dos meses de cultivo <i>in vitro</i> 31
5	Efecto de cinco dosis de 2,4-D en el diámetro de masas proembriogénicas desarrolladas en callos inducidos a partir de botones florales de nardo después de dos meses de cultivo <i>in vitro</i> 32
6	Efecto de cinco dosis de 2,4-D en la inducción de callos a partir de pétalos

	de nardo después de tres meses de cultivo <i>in vitro</i>	33
7	Efecto de nueve combinaciones de 2,4-D y BA en el número de masas con raíces después de 30 días de cultivo <i>in vitro</i>	34
8	Efecto de nueve combinaciones de 2,4-D y BA en el número de masas necrosadas después de 30 días de cultivo <i>in vitro</i>	34
9	Efecto de nueve combinaciones de 2,4-D y BA en el número de masas verdes después de 30 días de cultivo <i>in vitro</i>	35
10	Callos de nardo expuestos a diferentes combinaciones de ANA y BA.	36
11	Efecto de la auxina 2,4-D en el número de masas con raíces (NMR), número de masas necrosadas (NMN) y número de masas verdes (NMV) después de 30 días de cultivo <i>in vitro</i>	37
12	Efecto de la citocinina BA en el número de masas con raíces (NMR), número de masas necrosadas (NMN) y número de masas verdes (NMV) después de 30 días de cultivo <i>in vitro</i>	37
 CAPÍTULO 3 EFECTO DE RAYOS GAMMA ⁶⁰ Co EN NARDO (<i>Polianthes tuberosa</i> L.).		
1	Efecto de rayos gamma ⁶⁰ Co en la supervivencia de brotes después de cinco meses de ser aclimatados.	49
2	Efecto de rayos gamma ⁶⁰ Co en la supervivencia de tubérculos establecidos <i>in vivo</i> después de cinco meses de cultivo.	50
3	Efecto de las radiaciones gamma en plantas de nardo.	51

ÍNDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE

Cuadro		Pág.
1A	Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Fusarium</i> sp. al segundo día de establecido el experimento.	61
2A	Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Fusarium</i> sp. al tercer día de establecido el experimento.	61
3A	Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Fusarium</i> sp. al cuarto día de establecido el experimento.	61
4A	Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Fusarium</i> sp. al quinto día de establecido el experimento.	61
5A	Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Fusarium</i> sp. al sexto día de establecido el experimento.	61
6A	Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Fusarium</i> sp. al séptimo día de establecido el experimento.	62
7A	Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Fusarium</i> sp. al octavo día de establecido el experimento.	62
8A	Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Fusarium</i> sp. al noveno día de establecido el experimento.	62
9A	Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Rhizopus</i> sp. al segundo día de establecido el experimento.	62
10A	Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Rhizopus</i> sp. al tercer día de establecido el experimento.	62
11A	Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Rhizopus</i> sp. al cuarto día de establecido el experimento.	63
12A	Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Rhizopus</i> sp. al quinto día de establecido el experimento.	63
13A	Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Rhizopus</i> sp. al sexto día de establecido el experimento.	63
14A	Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Rhizopus</i> sp. al séptimo día de establecido el experimento.	63

15A	Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Rhizopus</i> sp. al octavo día de establecido el experimento.	63
16A	Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Rhizopus</i> sp. al noveno día de establecido el experimento.	64
17A	Análisis de varianza para el efecto de la concentración de sales del medio MS en el desarrollo de brotes de nardo.	64
18A	Análisis de varianza para el efecto de de diferentes concentraciones de BA y ANA en el número de raíces desarrolladas a partir de bulbos de nardo.	64
19A	Análisis de varianza para el efecto de de diferentes concentraciones de BA y ANA en la longitud de raíces desarrolladas a partir de bulbos de nardo.	64
20A	Análisis de varianza para el efecto de de diferentes concentraciones de BA y ANA en el número de brotes nuevos desarrollados a partir de bulbos de nardo.	64
21A	Análisis de varianza para el efecto de de diferentes concentraciones de BA y ANA en la longitud de brotes nuevos desarrollados a partir de bulbos de nardo.	65
22A	Análisis de varianza para el efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D en el número de explantes de botón floral de nardo con respuesta.	65
23A	Análisis de varianza para el efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D en el número de explantes botón floral de nardo necrosados.	65
24A	Análisis de varianza para el efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D en el diámetro de callos desarrollados a partir de botones florales de nardo.	65
25A	Análisis de varianza para el efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D en el número se explantes de pétalo de nardo con respuesta.	65
26A	Análisis de varianza para el efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D en el número de masas por explante de pétalo de nardo.	66
27A	Análisis de varianza para el efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D en el peso fresco de masas desarrolladas a partir de pétalos de nardo.	66
28A	Análisis de varianza para el efecto de la combinación de diferentes concentraciones 2,4-D y BA en el diámetro de masas proembriogénicas de nardo.	66

29A	Análisis de varianza para el efecto de la combinación de diferentes concentraciones 2,4-D y BA en el número de masas proembriogénicas con raíces de nardo.	66
30A	Análisis de varianza para el efecto de la combinación de diferentes concentraciones 2,4-D y BA en el número de masas proembriogénicas necrosadas de nardo.	66
31A	Análisis de varianza para el efecto de la combinación de diferentes concentraciones 2,4-D y BA en el número de masas proembriogénicas verdes de nardo.	67
32A	Análisis de varianza para el efecto de la combinación de diferentes concentraciones 2,4-D y BA en el peso de masas proembriogénicas de nardo.	67
33A	Análisis de varianza para el efecto de las dosis de radiación gamma ^{60}Co en la brotación <i>in vitro</i> de explantes de nardo.	67
34A	Análisis de varianza para el efecto de las dosis de radiación gamma ^{60}Co en la contaminación <i>in vitro</i> de explantes de nardo.	67
35A	Análisis de varianza para el efecto de las dosis de radiación gamma ^{60}Co en la altura de explantes de nardo <i>in vitro</i>	67
36A	Análisis de varianza para el efecto de las dosis de radiación gamma ^{60}Co en la brotación <i>in vivo</i> de tubérculos de nardo.	68
37A	Análisis de varianza para el efecto de las dosis de radiación gamma ^{60}Co en el largo de hojas de plantas derivadas de tubérculos de nardo desarrollados <i>in vivo</i> después de brotar.	68
38A	Análisis de varianza para el efecto de las dosis de radiación gamma ^{60}Co en el ancho de hojas de plantas derivadas de tubérculos de nardo desarrollados <i>in vivo</i> después de brotar.	68
39A	Análisis de varianza para el efecto de las dosis de radiación gamma ^{60}Co en el largo de hoja de plantas aclimatadas de nardo después de cuatro meses de la aclimatación.	68
40A	Análisis de varianza para el efecto de las dosis de radiación gamma ^{60}Co en el ancho de hoja de plantas aclimatadas de nardo después de cuatro meses de la aclimatación.	69

41A	Análisis de varianza para el efecto de las dosis de radiación gamma ^{60}Co en el largo de hojas de plantas desarrolladas a partir de tubérculos desarrollados <i>in vivo</i> después de cuatro meses de la siembra.	69
42A	Análisis de varianza para el efecto de las dosis de radiación gamma ^{60}Co en el ancho de hojas de plantas desarrolladas a partir de tubérculos desarrollados <i>in vivo</i> después de cuatro meses de la siembra.	69

RESUMEN GENERAL

La planta endémica de México conocida como nardo (*Polianthes tuberosa* L.) es importante para la industria farmacéutica y del perfume y como flor de corte, por lo que se justifica el desarrollo de técnicas como el cultivo de tejidos vegetales y técnicas de inducción de mutaciones que induzcan la generación de variación genética y faciliten el mejoramiento genético de esta especie. Sin embargo, es necesaria la identificación de los hongos contaminantes que eventualmente aparecen durante el establecimiento *in vitro* de esta especie. En el presente trabajo se extrajo micelio de explantes contaminados de nardo establecidos *in vitro* y se sembró en cajas Petri con 10 mL de medio papa, dextrosa y agar (PDA). Después se purificaron e identificaron los hongos utilizando las claves de Barnet y Hunter (1998). Posteriormente se realizaron bioensayos con los fungicidas Tecto 60[®] (0.6 g L⁻¹), Cercobin M[®] (0.6 g L⁻¹), Swicht[®] (0.6 g L⁻¹) y Sulfato tribásico de cobre[®] (2.0 g L⁻¹). Los hongos identificados pertenecen a los géneros *Fusarium* y *Rhizopus*. En los bioensayos Tecto 60[®], se inhibió completamente el desarrollo *in vitro* de *Fusarium*; mientras que Swicht[®] produjo la mejor inhibición del hongo *Rhizopus*. Para lograr la morfogénesis *in vitro* se probaron diferentes reguladores del crecimiento vegetal como ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA) y sus combinaciones, además de las sales minerales del medio Murashige y Skoog (1962) (MS) a 100, 75 y 50 % de su concentración total. Se lograron brotes y raíces adventicias por la vía de la organogénesis con 100 % de supervivencia durante la aclimatación. El mejor porcentaje de inducción de callos proembriogénicos a partir de botones y pétalos (100 y 52.3 % respectivamente) se logró con 2 mg L⁻¹ de 2,4-D en un periodo de tiempo de 1.5 a 2 meses respectivamente. Se presentó una gran cantidad de masas proembriogénicas verdes por explante (20.0) con 1 mg L⁻¹ de BA y sin 2,4-D. Para evaluar el efecto de la radiación gamma ⁶⁰Co se irradiaron tubérculos en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) con dosis de 0 a 30 Gray (Gy) con intervalos de 5 Gy entre tratamientos. De los tubérculos irradiados se extrajeron bulbos laterales y se establecieron *in vitro* en un medio MS y los tubérculos que quedaron se sembraron en un sustrato conformado por suelo, tierra de hojas y tezontle en proporción de 1:1:1. Al aumentar las dosis de radiación disminuyó el desarrollo de las plantas tanto *in vitro* como *in vivo*. Las plantas irradiadas presentaron mayor variación en el largo y ancho de las hojas que las no irradiadas; además, presentaron hojas deformes, brotes apilados y brotes que

se secaban repentinamente. Las plantas procedentes de brotes aclimatados bajo condiciones de invernadero presentaron una LD₅₀ (9.09 Gy) menor a la de las establecidas *in vivo* (LD₅₀ de 25.91 Gy) donde las plantas expuestas a dosis de 30 Gy murieron a los 5 meses de cultivo.

GENERAL SUMMARY

(*Polianthes tuberosa* L.) a plant endemic to Mexico is important as raw material for both the pharmaceutical and perfume industry and as a cut flower, thus is justified the development of techniques such as plant tissue culture and induction of mutations to facilitate genetic improvement of this species, however, the identification and control of fungal contaminants that occur during the establishment *in vitro* in this species is required due to its persistent presence. Mycelium was extracted from contaminated explants tuberosa established *in vitro* and it was inoculated on Petri dishes with 10 mL of potato dextrose agar (PDA), then purified and identified using Barnet and Hunter (1998) keys, bioassays were performed subsequently with fungicides Tecto 60[®] (0.6 g L⁻¹), Cercobin M[®] (0.6 g L⁻¹) Swicht[®] (0.6 g L⁻¹) and tribasic copper sulfate[®] (2.0 g L⁻¹). Identified fungi pertained to the genera *Fusarium* and *Rhizopus*. As result of the bioassays, Tecto 60[®] completely inhibited *Fusarium in vitro*, whereas, Swicht[®] produced the best inhibition of the fungus *Rhizopus*. To achieve *in vitro* morphogenesis different plant growth regulators like 2,4 - dichlorophenoxyacetic (2,4-D), benzyladenine (BA) and acid naphthaleneacetic (NAA) and combinations thereof were tested, as well varying concentrations of Murashige and Skoog (1962) (MS) salts 50, 75 and 100 %. Adventitious shoots and roots were obtained through organogenesis with 100 % of survival rate during acclimatization. The highest rate of proembriogenic callus induction from buttons and petals (100 and 52.3% respectively) was achieved with 2 mg L⁻¹ 2,4-D over a period of time from 1.5 to 2 months respectively. High amounts of green proembriogenic masses (about 20.0 green masses per explant) were obtained with 1 mg L⁻¹ BA and without 2,4-D. To assess the effect of ⁶⁰Co gamma radiation at the tuberosa, tubers were irradiated at doses from 0 to 30 Gy with 5 Gray intervals in May at the National Institute of Nuclear Research (ININ). From the irradiated tubers side bulbs were removed and settled *in vitro* in a MS medium and tubers were planted in a substrate comprised of soil, organic soil and volcanic rock in 1:1:1 rate. As radiation dose increased the development of plants both *in vitro* and *in vivo* decreased, irradiated plants showed greater variation in the length and width of leaves compared with those non-irradiated. Shoots from acclimated plants showed a LD₅₀ (9.09 Gy) lower than those set out *in vivo* (LD₅₀ of 25.91 Gy), in this case, plants exposed to 30 Gy died after 5 months of cultivation.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La familia Agavaceae comprende nueve géneros con casi 300 especies, entre los que se encuentra el género *Polianthes*, que es considerado pequeño por estar compuesto sólo por 13 especies, todas originarias de México. Este género presenta plantas herbáceas que en su mayoría tienen flores blanquecinas, entre las que destaca la especie *Polianthes tuberosa* L. (conocida como nardo) por sus flores y fragancia (Rocha *et al.* 2006).

A nivel mundial el nardo es utilizado como ornamental, para jardinería, flor cortada, así como materia prima para la extracción de volátiles para obtener perfumes y cosméticos (Gonzatti 1981). En México se cultiva principalmente para arreglos florales. Los principales estados productores de esta especie son Guerrero, México, Morelos, Puebla y Veracruz (Camino *et al.* 2001).

El nardo presenta poca variabilidad genética porque sólo se propaga a través de tubérculos que se producen a partir de yemas situadas en la base de estructuras caulinarias (Shillo 1992), por lo que es necesario incrementar la variabilidad genética de esta especie para facilitar el desarrollo de nuevas variedades.

Las técnicas empleadas para la inducción de mutaciones son la herramienta más útil para aumentar la variabilidad genética (Toker *et al.* 2007), y con las técnicas de cultivo *in vitro* se obtienen varias ventajas sobre los métodos de mutagénesis convencionales (Van Harten 1998), porque permiten el tratamiento de un gran número de individuos y la multiplicación de los genotipos seleccionados en un espacio reducido, en un corto tiempo y bajo condiciones libres de patógenos. Además después de ser tratados con el agente de mutagénico, los tejidos quiméricos pueden ser separados en sectores mutados y no mutados, sin la pérdida de plantas, lo cual no ocurre en las técnicas convencionales (Ahloowalia 1995).

Actualmente existen pocos reportes específicos para el cultivo *in vitro* de *P. tuberosa* L.; uno de estos describe la obtención de metabolitos a partir de pétalos de nardo (Otsuji *et al.* 1994), también se han desarrollado métodos de propagación con los que sólo se regeneran brotes (Sangavai y Chellapandi 2008), aunque no mencionan que agentes contaminantes pueden presentarse en el cultivo *in vitro* de esta especie ni cómo controlarlos. Por otra parte, en cultivos *in vitro* de *A. tequilana* Weber var. *azul* se logró controlar la contaminación con el empleo de un extracto comercial de toronja (Citricidal[®]) al 0.1 % (Obledo-Vázquez *et al.* 2004). En el caso del cultivo *in vitro*, se han realizado estudios en otras especies de la familia

Agavaceae, como *Agave vitoria-reginae* T. Moore, donde se produjeron callos al ser cultivados en medio MS con 2.26 μM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), además de lograrse la regeneración de brotes múltiples a partir de yemas axilares cultivadas en medio MS con 2.2-4.4 μM de 6-benziladenina (BA), y con 92 % de supervivencia al aclimatar las plantas en invernadero (Martínez-Palacios *et al.* 2003). En *Yucca valida* se propagaron 17 líneas a partir de la germinación *in vitro* de semillas silvestres para evaluar y comparar su rendimiento en campo con plantas obtenidas en un vivero (Arce-Montoya *et al.* 2006).

En los estudios efectuados en la India sobre irradiación de tubérculos de *P. tuberosa* L., se encontró que la dosis óptima para la especie es de 2 Krad que equivaldría a 20 Gy (Younis y Borham 1975, Abraham y Desai 1976). En México, se estudió el efecto de las radiaciones gamma de ^{60}Co sobre tubérculos de *P. tuberosa* L. y se encontró que la DL_{50} para esta especie es de 23.8 Gy y la DL_{100} es de 37.5 Gy; además se identificaron 14 posibles mutantes en la primera propagación vegetativa (Escalante 2003). Sin embargo, no se han realizado estudios con materiales nacionales en los que se combinen las técnicas de mutagénesis con las de cultivo *in vitro*.

Debido a lo anterior, se justifica el desarrollo de técnicas que faciliten el mejoramiento genético de esta planta, por lo que se planteó desarrollar un protocolo de propagación *in vitro* para el nardo y después aplicar la técnica de inducción de mutaciones con radiaciones gamma ^{60}Co para inducir variabilidad genética.

Objetivo general

Propagar plantas de nardo *in vitro* e identificar los hongos contaminantes y evaluar el efecto de rayos gamma sobre el desarrollo de las plantas de nardo.

Objetivos específicos

- Desarrollar un protocolo para el cultivo *in vitro* de nardo *Polianthes tuberosa* L.
- Identificar y controlar los hongos contaminantes del cultivo *in vitro* de nardo.
- Inducir variabilidad mediante el uso de radiación gamma ^{60}Co en tubérculos y tejidos cultivados *in vitro*.
- Establecer la curva de radiosensibilidad en tubérculos y plantas *in vitro* de nardo.

Hipótesis

- Es posible identificar y controlar los hongos contaminantes de cultivos *in vitro* para obtener plantas aclimatadas.
- Las radiaciones gamma ^{60}Co aumentan la variación morfológica en plantas de nardo.

METODOLOGÍA GENERAL

En esta sección se resume brevemente la metodología empleada en este trabajo de investigación dividido en tres capítulos. El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y en los invernaderos de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en Uruapan, Michoacán. Los materiales biológicos empleados fueron tubérculos de nardo comprados en San Andrés, Municipio de Zumpahuacan, Estado de México, e inflorescencias de nardo compradas en Tenancingo, Estado de México.

En el primer capítulo se identificaron los hongos contaminantes presentes en el establecimiento de cultivos *in vitro* de nardo (*Polianthes tuberosa* L.); posteriormente se realizaron bioensayos para su control con los fungicidas Tecto 60[®], Cercobin M[®], Sulfato tribásico de cobre[®] y Swicht[®].

En el segundo capítulo se realizaron experimentos para generar el protocolo de propagación *in vitro*, al inicio se probó el efecto de tres concentraciones de las sales del medio Murashige y Skoog (MS) (50, 75 y 100 %) y seis combinaciones de benciladenina (BA) (0.0, 1.0 y 2.0 mg L⁻¹) y ácido naftalenacético (ANA) (0.0 y 0.5 mg L⁻¹) en bulbos de nardo para inducir una respuesta organogénica. También se realizaron tres experimentos donde se probaron cinco concentraciones de ácido 2,4-diclorofenxiacético (2,4-D) (0.0, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 mg L⁻¹) en botones florales y pétalos, además de probar nueve combinaciones de 2,4-D (0.0, 0.5 y 1.0 mg L⁻¹) y BA (0.0, 0.5 y 1.0 mg L⁻¹) en callos para inducir una respuesta embriogénica.

En el tercer capítulo tubérculos de nardo con 2 a 21 bulbos se llevaron al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) para exponerlos a dosis de radiación gamma de 0 a 30 Gray (Gy) con intervalos de 5 Gray entre tratamientos. Los bulbos fueron sembrados *in vitro* en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Facultad de Agrobiología Presidente Juárez y los tubérculos en macetas dentro de los invernaderos de la misma Institución.

CAPITULO 1
IDENTIFICACIÓN Y CONTROL DE HONGOS CONTAMINANTES DE CULTIVOS
***in vitro* DE NARDO (*Polianthes tuberosa* L.)**

I. RESUMEN

La presencia persistente de hongos contaminantes durante el establecimiento *in vitro* de bulbos de nardo (*Polianthes tuberosa* L.) justifica la identificación de estos microorganismos para proponer métodos de desinfección más eficientes para su eliminación. Los bulbos de nardo se lavaron con agua del grifo y detergente, se sumergieron en una solución con Benlate[®] (1 g L⁻¹), se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio comercial a 70 % v/v (6 % de cloro activo) y se sembraron explantes en medio Murashige y Skoog (MS); a los tres días se extrajo micelio de los explantes contaminados y se sembró en cajas Petri con 10 mL de medio papa, dextrosa y agar (PDA). Los hongos que se desarrollaron en las cajas Petri se purificaron e identificaron utilizando las claves de Barnett y Hunter (1998); posteriormente se realizaron bioensayos con los fungicidas Tecto 60[®] (0.6 g L⁻¹), Cercobin M[®] (0.6 g L⁻¹), Swicht[®] (0.6 g L⁻¹) y Sulfato tribásico de cobre[®] (2.0 g L⁻¹). Los hongos identificados pertenecen a los géneros *Fusarium* y *Rhizopus*. En los bioensayos Tecto 60[®] inhibió completamente el desarrollo *in vitro* de *Fusarium*; mientras que Swicht[®] produjo la mejor inhibición del hongo *Rhizopus*.

Abstract

Persistent presence of fungal contaminants during *in vitro* establishment of bulbs of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) justifies the identification of fungal contaminants to propose more efficient methods of disinfection for removal. Tuberose bulbs were washed with tap water and detergent and immersed in a solution of Benlate[®] (1 g L⁻¹) and disinfected with a solution of commercial sodium hypochlorite 70% v / v (6% chlorine active) and then explants were sown on Murashige and Skoog (1962) (MS) medium, after three days of incubation was extracted mycelium from contaminated explants and it was inoculated on in Petri dishes with 10 mL of potato dextrose agar (PDA). Fungi that developed on the plates were purified and identified using the keys of Barnett and Hunter (1998), subsequently bioassays were performed with Tecto 60[®] (0.6 g L⁻¹), Cercobin M[®] (0.6 g L⁻¹), Swicht[®] (0.6 g L⁻¹) and tribasic

copper sulfate[®] (2.0 g L⁻¹) fungicides. Identified fungi pertained to the genera *Fusarium* and *Rhizopus*. In the bioassays Tecto 60[®] inhibited the *in vitro* development of *Fusarium*, while Swicht[®] produced the best inhibition of the fungus *Rhizopus*.

II. INTRODUCCIÓN

La asepsia es un requisito indispensable para los cultivos *in vitro* debido a que el medio de cultivo posee sales minerales, azúcares, vitaminas, hormonas y agua necesarios para la reproducción de las plantas; estas características originan el desarrollo excesivo de microorganismos, que presentan una mayor tasa de crecimiento que la de las plantas, por lo que el cultivo puede ser totalmente invadido (George 1993). Las pérdidas causadas por microorganismos contaminantes, principalmente hongos y bacterias, constituyen un gran problema a escala mundial en los laboratorios de micropropagación por su capacidad para obstaculizar el uso comercial de las técnicas de cultivo *in vitro* (Skirvin *et al.* 1999). Todos los desinfectantes usados en micropropagación son capaces de remover superficialmente a los hongos y las bacterias exógenas en el explante; sin embargo, para eliminar los contaminantes endógenos es necesario incluir fungistáticos o antibióticos en el medio de cultivo (Roca y Mroginski 1991), los cuales deben ser evaluados antes de ser aplicados en un programa de micropropagación masiva ya que pueden presentar efectos fitotóxicos (George 1993).

El empleo de fungicidas y antibióticos se ha utilizado en plantas cultivadas *in vitro* como *Yucca valida* en la que fue necesario adicionar al medio Cefotaxine (250 mg L⁻¹), Gentamicina (10 mg L⁻¹), Benlate[®] (DuPont) al 5 % (p/v) y Captan[®] (Bayer) al 5 % (p/v) para reducir la contaminación a 15 % en explantes extraídos de yemas apicales y brotes laterales (Arce-Montoya *et al.* 2007), o *Curcuma longa* donde fue necesario adicionar al medio de cultivo sulfato de estreptomycin (750 mg L⁻¹) para reducir la contaminación a cerca de 30 % en explantes de rizoma (Salvi *et al.* 2002). En plántulas *in vitro* de *Agave tequilana* se logró el control de los contaminantes con la adición de extracto comercial de toronja (Citricidal[®]) a 0.1 % en el medio de cultivo; sin embargo, dosis a 1 % o mayores son capaces de reducir la longitud de la plántulas de 7.6 a 4.2 cm (Obledo-Vázquez *et al.* 2004). La contaminación es un problema importante para el cultivo *in vitro* de *Polianthes tuberosa*, por lo que es importante identificar a los agentes contaminantes de este cultivo para lograr un control más eficiente de éstos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización del sitio experimental

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivos Vegetales *in vitro* de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en Uruapan, Michoacán.

3.2 Material vegetal

Los materiales biológicos utilizados en este experimento fueron tubérculos e inflorescencias de nardo selección San Andrés, comprados en San Andrés, Municipio de Zumpahuacán y en Tenancingo, Estado de México.

3.3 Establecimiento del cultivo aséptico

Se escogieron tubérculos de nardo sin daños mecánicos visibles y con 3 a 10 bulbos laterales formados; se lavaron con agua del grifo y detergente para eliminar la mayor cantidad de suelo posible y se sumergieron durante 30 minutos en una solución compuesta por el fungicida Benlate® (Benomilo 50 % i.a.) (1 mg L^{-1}). La desinfección se efectuó con una solución de hipoclorito de sodio comercial a 70 % v/v (6 % de cloro activo) durante 20 minutos. En la campana de flujo laminar se retiró la solución con cloro y se enjuagaron los explantes de cuatro a cinco veces con agua estéril.

Se colocaron de dos a tres bulbos en frascos de 100 mL de capacidad, con 15 mL de medio de cultivo líquido con las sales minerales de Murashige y Skoog (MS) a 100 % suplementados con benciladenina (BA) (1 mg L^{-1}), ácido naftalenacético (ANA) (0.2 mg L^{-1}) y el fungicida Switch® (1 mg L^{-1}). Los frascos con los explantes se incubaron en un fotoperiodo de 16 horas con luz blanca fría fluorescente de 75 W y una radiación fotosintéticamente activa de $45 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

3.4 Identificación de los agentes causales

De los frascos con explantes contaminados se transfirieron hongos contaminantes al centro de cajas Petri con 10 mL de medio PDA (Papa, dextrosa y agar), se sellaron con Kleen pack®. A los ocho días de establecidos los cultivos, se transfirieron secciones de agar con

micelio a cajas con medio PDA fresco para obtener los cultivos fúngicos puros. De las colonias purificadas se hicieron preparaciones fijas, mediante la técnica de raspadura con aguja de disección en agua, que consistió en colocar una pequeña gota de agua destilada en un portaobjetos, se sumergió la punta de la aguja de disección en la superficie de la colonia y se tomó micelio y estructuras, se colocó en un cubreobjetos y se procedió a observar en el microscopio. La determinación de las características morfológicas de crecimiento de micelio y esporulación se efectuó por medio de comparación con las claves de Barnett y Hunter (1998).

3.5 Bioensayo con fungicidas bajo condiciones *in vitro* para el control de los agentes contaminantes durante la micropropagación de nardo

En el centro de cajas con medio de PDA fresco se colocó un disco de agar de 5 mm con micelio proveniente de colonias puras y cuatro discos de papel filtro a una distancia equidistante del centro, impregnados por tres minutos con los fungicidas Tecto 60[®], Cercobin M[®], Sulfato Tribásico de cobre[®] y Swicht[®], con la dosis media recomendada por el fabricante para el control de pudriciones radicales en diferentes especies ornamentales (Cuadro 1). Se establecieron cinco tratamientos conformados por los cuatro fungicidas mencionados y un testigo (disco de papel filtro con agua estéril); en cada tratamiento se establecieron cinco repeticiones.

Cuadro 1. Fungicidas e ingredientes activos utilizados para el control de *Fusarium sp.* y *Rhizopus sp.* aislados de cultivos *in vitro* de nardo. n=25.

Fungicida	Ingrediente activo	Dosis g L ⁻¹
Tecto 60 [®]	Tiabendazol:2-(4-tiazinil)-1H-benzimidazol	0.6
Cercobin M [®]	Tiofanato metílico dimetil 4,4-0-fenilencenbis(3 Tioalofanato)	0.6
Swicht [®]	Ciprodimil, Fudioxonil	0.6
Sulfato tribásico de cobre [®]	Sulfato tribásico de cobre	2.0

Se registró el crecimiento de las colonias (una colonia por caja Petri) en centímetros a partir del primer día del establecimiento del experimento y hasta que el hongo del tratamiento testigo colonizó al 100 % la caja Petri. Los datos de esta variable para cada día muestreado se sometieron a análisis de varianza de una sola vía con el procedimiento PROC ANOVA, y se efectuó la prueba de Tukey ($p \geq 0.05$), con el paquete estadístico SAS versión 9.0 (SAS 2004).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Identificación de los agentes causales de la contaminación de cultivos *in vitro* de nardo

A partir del segundo día de establecido el cultivo *in vitro* de nardo se observó el desarrollo de cinco tipos de micelio; los más comunes de color blanco a rosado, esponjoso (45 %); de color negro a gris, granuloso con abundantes esporas (40 %), y el menos usual de color amarillo a verde pardo (15 %) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Descripción del micelio de hongos contaminantes de cultivos in vitro de nardo en cada tratamiento.

Presencia en el cultivo %	Descripción del micelio
45	Color blanco a rosado esponjoso
40	Color negro a gris granuloso con abundantes esporas
15	Color amarillo a verde pardo

Por medio de la comparación con las claves de Barnett y Hunter (1998), se identificaron como agentes causales de la contaminación *in vitro* de nardo a *Fusarium* sp. y *Rhizopus* sp. durante la etapa de establecimiento. También se encontró *Penicillium* como agente contaminante del cultivo *in vitro* de nardo, pero no se tomó en cuenta porque este microorganismo es muy común en el medio ambiente.

El hongo *Fusarium* sp. se caracterizó por producir micelio abundante, algodonoso, que invadió totalmente la caja Petri en ocho días. Además de ser de color blanco a rosa en los extremos y púrpura en el centro. Los conidióforos fueron simples, cortos, ramificados irregularmente con presencia de un conjunto de fiálides simples o agrupadas, en un esporodoquio o en falsas cabezas. Los conidios hialinos, fueron de dos tipos: macroconidios ligeramente curvados o doblados en los extremos, con forma típica de canoa, predominantemente de cuatro a seis septos y microconidios de una sola célula, individuales; algunos conidios intermedios de 1 a 2 células, de forma ovoide a oblonga ligeramente curvados (Figura 1).

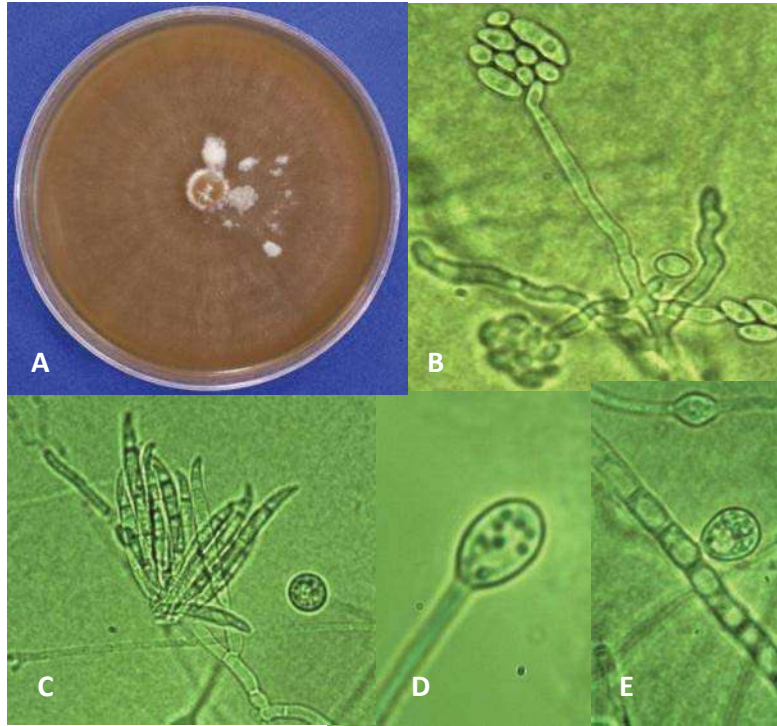


Figura 1. Desarrollo de la colonia y estructuras del hongo *Fusarium* sp. bajo condiciones *in vitro* a los 8 días de establecido el experimento. A) Cepa pura de *Fusarium* sp. B) Microconidios dispuestos en falsas cabezas. C) Esporodocio con macroconidios. D y E) Clamidiosporas.

El hongo *Rhizopus* sp. mostró micelio cenocítico aéreo con ramas o estolones. En los puntos de contacto con el medio de cultivo se formaron pequeñas ramificaciones llamadas rizoides. Los esporangióforos se originaron en los estolones en el lado opuesto al punto de origen de los rizoides; los esporangioforos generalmente fueron simples, fasciculados y delgados. Los esporangios fueron terminales, globosos multiesporulados con columna prominente hemisférica de color blanco cuando joven y negro al madurar. A los 8 días de establecido el experimento el micelio mostró un color negro y un crecimiento de 4 cm en las cajas Petri purificadas (Figura 2).

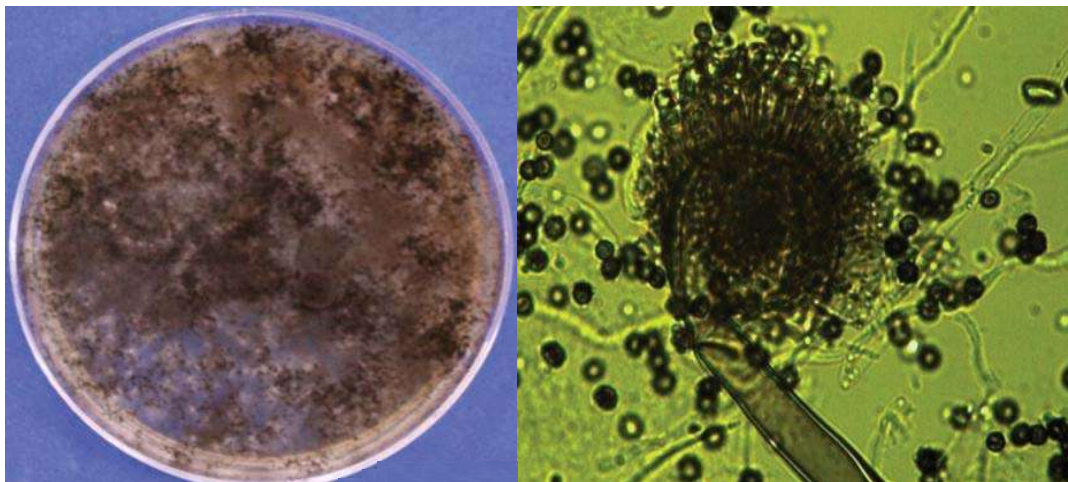


Figura 2. Desarrollo de la colonia y estructuras del hongo *Rhizopus sp.* bajo condiciones *in vitro*.

4.2 Efecto de fungicidas para el control de *Fusarium sp.* bajo condiciones *in vitro*

Todos los fungicidas inhibieron el desarrollo del hongo a partir del segundo día después de la siembra (Figura 3), aunque Tecto 60[®] fue el más eficiente de ellos (0.10 cm) y mantuvo este efecto inhibitorio durante los 8 días que duró la evaluación.

Los fungicidas Swicht[®] y Cercobin M[®] fueron menos eficientes para el control del desarrollo del hongo que el Tecto 60[®]; sin embargo inhibieron parcialmente hasta 45 % el desarrollo *in vitro* del hongo a partir del segundo día de la evaluación en comparación con el testigo (0.65 cm).

El Sulfato Tribásico de cobre[®] disminuyó el crecimiento del micelio de *Fusarium sp.* los primeros cuatro días, pero a partir del sexto día, el desarrollo del hongo en el medio de cultivo con este fungicida y el testigo fueron estadísticamente iguales (2.11 y 2.12 cm) respectivamente.

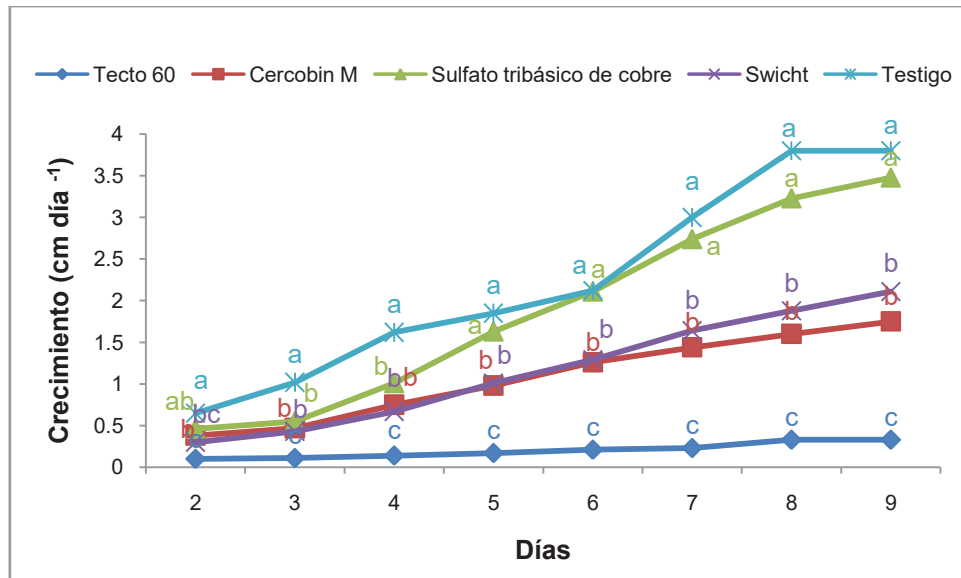


Figura 3. Efecto del tipo de fungicida sobre el control del desarrollo in vitro de *Fusarium sp.* Letras diferentes en cada día de observación indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). $n=25$.

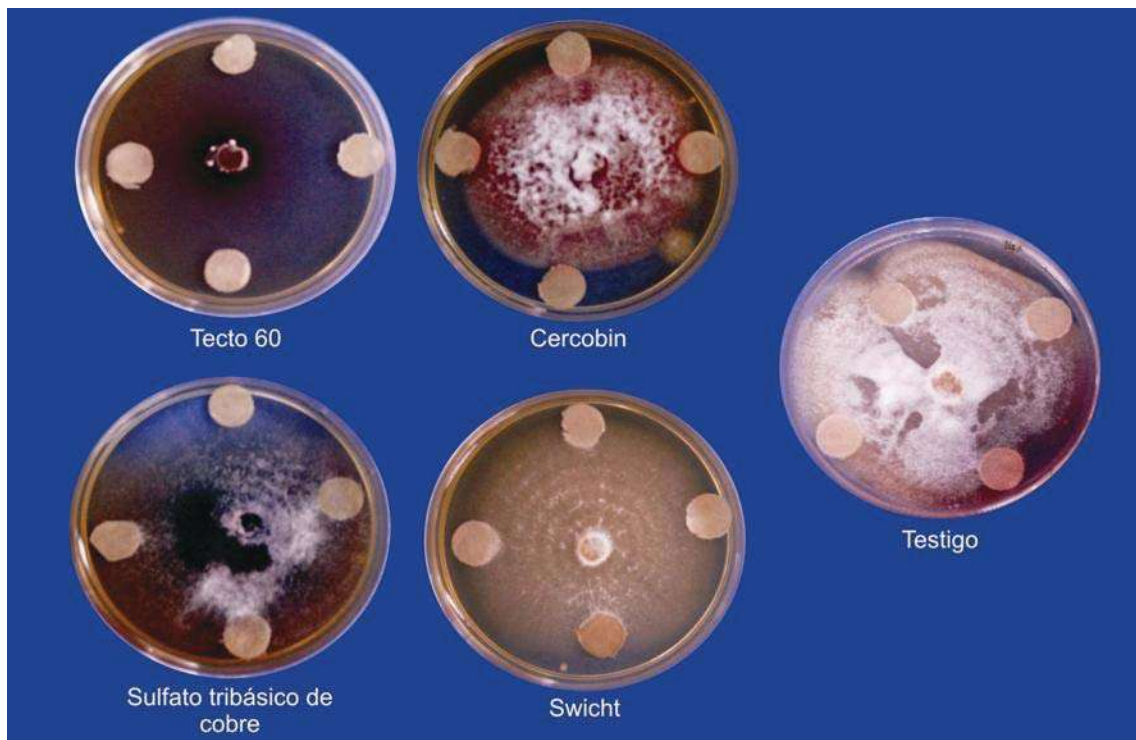


Figura 4. Inhibición del crecimiento de colonias de *Fusarium sp.* por fungicidas sistémicos y de contacto.

Tecto 60[®] es un fungicida muy usado para el control de hongos del género *Fusarium* sp. en plantas de *Heliconia* (*Heliconia wagneriana*) con síntomas de pudrición radicular. En plantas de *Heliconia* procedentes de Minitas municipio de Gabriel Zamora, Michoacán se encontró que Tecto 60[®], Benomyl 50[®] y Derosal 500D[®] inhiben completamente el desarrollo *in vitro* de este microorganismo, a partir del quinto día de su aplicación (Negrete *et al.* 2007). Resultados similares fueron reportados en plantas de Ginger (*Alpinia purpurata*) con pudrición radicular producida por *Fusarium* sp. donde se observó que Tecto 60[®] y Derosal 500D[®] disminuían hasta 90 % el desarrollo del hongo con respecto al testigo (Jiménez *et al.* 2007); mientras que el crecimiento *in vitro* de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen extraído de platas de jitomate fue inhibido completamente hasta por 144 horas con una dosis de 0.6 g L⁻¹ de Tecto 60[®] (López-Benítez *et al.* 2005); resultados que coinciden con los observados en el presente trabajo (Figura 4).

4.3 Efecto de fungicidas para el control de *Rhizopus* sp. bajo condiciones *in vitro*

Para el caso de *Rizophus* sp. se observó que el fungicida Swicht[®] inhibió completamente el desarrollo del patógeno desde el primer y hasta el octavo día del establecimiento del experimento en contraste con el testigo (Figura 6). El fungicida Tecto 60[®] se caracterizó por permitir un lento desarrollo de *Rhizopus* sp. desde el primer y hasta el último día de establecido el bioensayo (0.82 y 2.05 cm respectivamente). Al cuarto día los fungicidas Cercobin M[®] y Sulfato Tribásico de cobre[®] fueron iguales de acuerdo al análisis estadístico (1.77 y 1.79 cm respectivamente); mientras que a partir del séptimo día el resto de los tratamientos fueron estadísticamente similares al testigo (3.55, 3.72 y 3.85 cm respectivamente) (Figuras 5 y 6). En general, el tipo y concentración de los fungicidas es indispensable para reducir la contaminación *in vitro* (Watts y King 1973).



Figura 5. Inhibición del crecimiento de colonias de *Rhizopus* sp. por fungicidas sistémicos y de contacto.

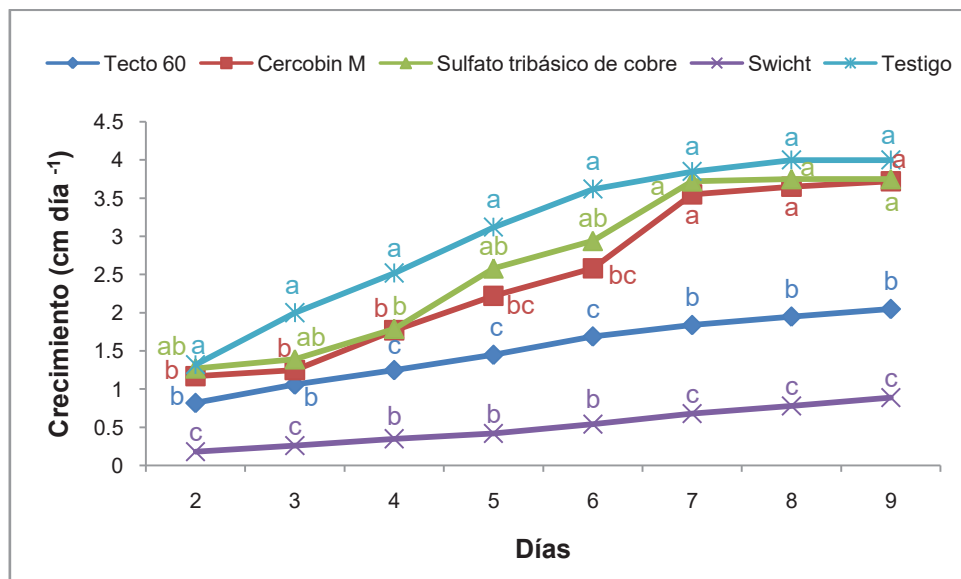


Figura 6. Efecto del tipo de fungicida sobre el control del desarrollo in vitro de *Rhizopus* sp. Letras diferentes en cada día de observación indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). $n=25$.

4.4 Efecto del tipo de acción de los fungicidas para el control de *Fusarium* sp. y *Rhizopus* sp. bajo condiciones *in vitro*

El control de *Fusarium* sp. en condiciones *in vitro* fue superior con los fungicidas sistémicos (Tecto 60[®], Cercobim M[®] y Swicht[®]), los cuales superaron al producto de contacto (Sulfato tribásico de cobre[®]) y al testigo a partir del tercer día de establecido el experimento, situación que se mantuvo hasta al final de la evaluación (Figura 7). El fungicida de contacto se comportó estadísticamente igual que el testigo desde el segundo día de la evaluación hasta finalizar el experimento (0.46, 3.48 y 0.26, 3.86 cm respectivamente) excepto el cuarto día (1.01 cm).

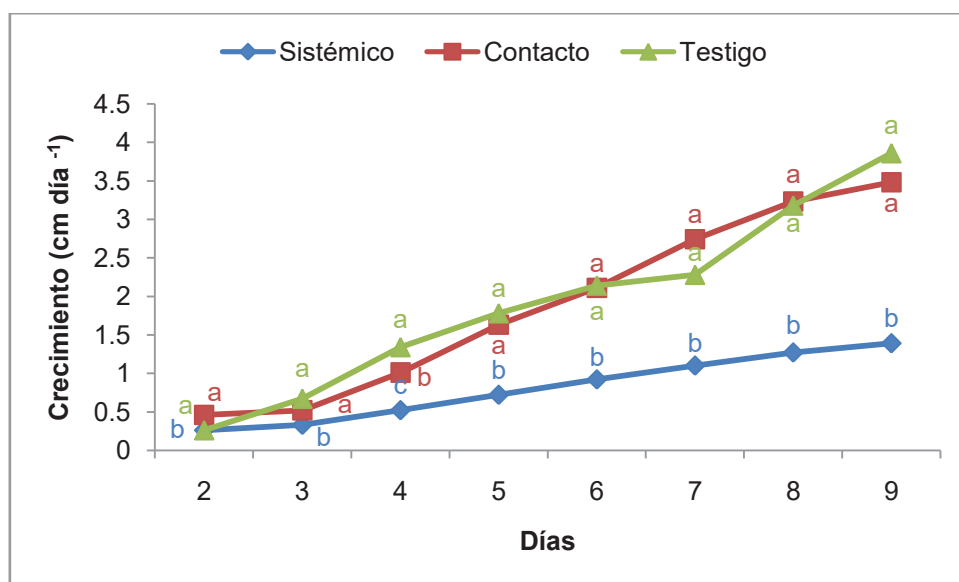


Figura 7. Acción del tipo de fungicida sobre el control del desarrollo *in vitro* de *Fusarium* sp. Letras diferentes en cada día de observación indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). $n=25$.

Estos resultados, coinciden con los obtenidos en el control de *Fusarium* sp. donde los fungicidas de acción sistémica fueron mejores que los de acción de contacto en plantas de Ginger y Heliconia respectivamente (Jiménez *et al.* 2007, Negrete *et al.* 2007).

Los fungicidas de acción sistémica inhibieron mejor el desarrollo del micelio del hongo que los de contacto (1.32 y 10.72 cm respectivamente); esta diferencia estadística significativa inició desde el segundo día y se mantuvo durante todo el experimento (Figura 8).

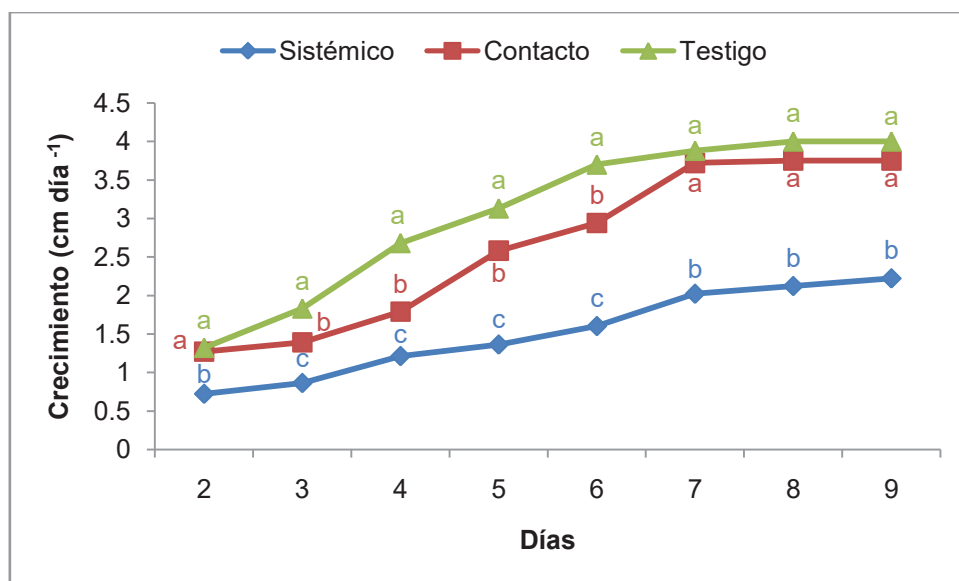


Figura 8. Acción del tipo de fungicida sobre el control del desarrollo *in vitro* de *Rhizopus* sp. Letras diferentes en cada día de observación indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). $n=25$.

Resultados similares se obtuvieron de los fungicidas de acción sistémica bajo condiciones *in vitro* para el control de *Pestalotia* en las orquídeas *Oncidium cavendishianum* Bateman y *Laelia autumnalis* Lindl en donde el efecto inhibitorio del crecimiento del hongo se logró con el fungicida Tecto 60[®] (Sánchez *et al.* 2008). Al considerar la acción del fungicida para el control de *Rhizopus* sp. *in vitro*, se observó que los de acción sistémica inhiben el crecimiento de micelio del hongo desde el segundo día, esta tendencia se mantuvo durante todo el periodo de evaluación con respecto al testigo.

V. CONCLUSIONES

1. Los hongos *Fusarium* sp. y *Rhizopus* sp. son los agentes contaminantes que se desarrollan en el establecimiento de cultivos *in vitro* del nardo.
2. El fungicida Tecto 60[®] inhibió significativamente el desarrollo *in vitro* del hongo *Fusarium* sp. durante los 8 días que duró la evaluación.
3. El fungicida Swicht[®] disminuyó significativamente el desarrollo *in vitro* de *Rhizopus* sp. desde el primer y hasta el octavo día del establecimiento del experimento.

4. Los fungicidas de acción sistémica inhibieron el crecimiento del micelio del hongo *Fusarium* sp. mejor que los de acción de contacto.

5. El fungicida de contacto no inhibió el crecimiento del hongo *Rhizopus* sp.

VI. LITERATURA CITADA

- Arce-Montoya, M., J. A. Hernández-González, M. Rodríguez-Álvarez and M. L. Robert. 2007. **No correlation between the growth of *in vitro* cultured *Yucca valida* clones and the growth of their mother plants in the field.** *Plant Cell Tiss Organ Cult* 88: 35-40.
- Barnett, H. L., and Hunter B. B. 1998. **Illustrated genera of imperfect fungi.** 4 Edition. Burgess Publishing Company, Minnesota, Minnesota. USA. pp: 2-227.
- George, E. F. 1993. **Plant propagation by tissue culture.** Part 1. The Technology. 2nd. Ed. Exegetics Limited. Edington, England. 574 p.
- Jiménez, C. M., T. del C. Ávila V., M. E. Pedraza S. y G. Rodríguez A. 2007. **Etiología de la pudrición radical en ginger *Alpinia purpurata* k. Schum y su control químico *in vitro*.** Memoria de Resúmenes de la Quincuagésima Tercera Reunión Anual de la Sociedad Internacional para la Horticultura Tropical. Morelia, Michoacán, México, del 7 al 12 de octubre de 2007.
- López-Benítez, A., S. R. López-Betancourt, M. E. Vázquez-Badillo, S. A. Rodríguez-Herrera, M. Mendoza-Elos y E. Padrón-Corral. 2005. **Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Verticillium dahliae* Kleb. Mediante extractos vegetales acuosos.** *Revista Mexicana de Fitopatología* 23(2): 183-190.
- Murashige. T., and Skoog F. 1962. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.** *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Negrete, G. R., M. E. Pedraza S., S. Fernández P., T. del C. Ávila V. y R. Negrete N. 2007. **Etiología y Control Químico *in vitro* de la Pudrición Radical en *Heliconia wagneriana*.** Memoria de Resúmenes de la Quincuagésima Tercera Reunión Anual de la Sociedad Internacional para la Horticultura Tropical. Morelia, Michoacán, México, del 7 al 12 de octubre de 2007.

- Obledo-Vázquez, E.N., N. Flores-Verduzco y J. Cervantes-Martínez. 2004. **Detección del efecto de un extracto vegetal antimicrobiano sobre plantas de agave (*Agave tequilana* Weber var *azul*) cultivadas *in vitro* utilizando fluorescencia inducida por láser (LIF).** *Revista Mexicana de Fitopatología* 22 (3): 328-332.
- Roca, W. M., y Mroginski A. 1991. **Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales.** Centro Internacional de Agricultura. Cali, Colombia. pp: 2-17.
- Salvi, N. D., L. George and S. Eapen. 2002. **Micropropagation and field evaluation of micropropagated plants of turmeric.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 143-151.
- Sánchez, L. J., T. C. Ávila-Val y M. E. Pedraza-Santos. 2008. **Etiología y control químico *in vitro* de la mancha foliar en *Oncidium cavendishianum* Bateman y *Laelia autumnales* Lindl.** XI Congreso Nacional y IV Congreso Internacional de Horticultura Ornamental. Cuernavaca Morelos, del 10 al 14 de marzo del 2008. 14 p.
- SAS Institute (2004) **SAS/STAT User's Guide.** Release 9 Edition. Cary, NC. USA.
- Skrvin, S. S., Mutoike M., Norton M., Ozgur K., Juboory A. and Means O Mc (1999) **On micropropagation establishment of contaminant free perennial plants "*in vitro*" cell.** *Biol-Plant* 35: 278-280. *Biotechnología Vegetal* 2(2): 73-76 p.
- Watts, J. W., and King J. M. 1973. **The Use of Antibiotics in the Culture of Non- Sterile Plant Protoplast.** *Planta (Berl.)* 113: 271-277.

CAPÍTULO 2

MORFOGÉNESIS *in vitro* EN NARDO (*Polianthes tuberosa* L.)

I. RESUMEN

El nardo (*Polianthes tuberosa* L) es una planta de ornato endémica de México importante para la industria farmacéutica y del perfume, por lo que se justifica el desarrollo de técnicas que faciliten el mejoramiento genético de esta especie. Para lograr la propagación *in vitro* a partir de bulbos, botones florales y pétalos, se probó el efecto de diferentes reguladores del crecimiento como ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA) y sus combinaciones, además del efecto las sales minerales del medio Murashige y Skoog (1962) (MS) a 100, 75 y 50 % de su concentración total. Se lograron brotes y raíces adventicias por la vía de la organogénesis que presentaron 100 % de supervivencia durante la aclimatación. El mejor porcentaje de inducción de callos proembriogénicos a partir de botones y pétalos (100 y 52.3 % respectivamente) se logró con 2 mg L⁻¹ de 2,4-D de en un periodo de tiempo de 1.5 a 2 meses respectivamente. Se presentó una gran cantidad de masas proembriogénicas verdes (20.0 masas verdes por explante) con 1 mg L⁻¹ de BA y sin 2,4-D.

Abstract

The tuberose (*Polianthes tuberosa* L) an ornamental plant native to Mexico is important as raw material for both the pharmaceutical and perfume industry and as a cut flower, thus is justified the development of techniques to facilitate the breeding of this species. To achieve its *in vitro* propagation the effect of different growth regulators 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), benzyladenine (BA) and naphthaleneacetic acid (NAA) and their combinations, including the effect of different concentrations of Murashige and Skoog (1962) (MS) mineral salts (50, 75 and 100 %) was tested. Shoots and roots were obtained by means of adventitious organogenesis that showed 100% survival during acclimatization. The highest percentage of callus induction from proembryogenic buttons and petals (100 and 52.3% respectively) was obtained with 2 mg L⁻¹ 2,4-D over a period of time from 1.5 to 2 months respectively. There was a lot of green proembryogenic masses (20.0 green areas per explant) with 1 mg L⁻¹ BA and without 2,4-D.

II. INTRODUCCIÓN

El género *Polianthes* es endémico de México y desde tiempos prehispánicos es importante a nivel científico, económico, y cultural (Solano y Patricia 2007). Entre sus especies se encuentra *P. tuberosa*, conocida con el nombre común de nardo, considerada como planta de ornato e importante para la industria farmacéutica y del perfume debido a que presentan una producción de metabolitos secundarios y compuestos de valor comercial (Gonzatti 1981, Sangavai y Chellapandi 2008).

El nardo presenta poca variabilidad genética porque sólo se propaga a través de tubérculos (Shillo 1992). Las técnicas de cultivo *in vitro* pueden combinarse con técnicas de inducción de mutaciones para aumentar la variabilidad genética en las plantas (Van Harten 1998, Toker *et al.* 2007).

La regeneración de callos *in vitro* de *P. tuberosa* se ha efectuado a partir de explantes de pétalos (Otsuji *et al.* 1994) y la obtención de brotes a partir de secciones de tubérculo (Sangavai y Chellapandi 2008); ambos métodos aplicados principalmente para la producción de metabolitos secundarios y no se han regenerado plantas completas, ni se ha trabajado con variedades de nardo mexicanas. Alternativamente existen varios trabajos acerca de la propagación *in vitro* de otras agaváceas como *Yucca aloifolia* (Karpov 2004), *Yucca valida* (Arce-Montoya *et al.* 2007), *Agave tequilana* (Valenzuela-Sánchez *et al.* 2006, Portillo *et al.* 2007, Ramírez-Malagón *et al.* 2008), *A. sisalana* (Hazra *et al.* 2002, Nikam *et al.* 2003), *A. victoriae-reginae* (Martínez-Palacios *et al.* 2003, Ramírez-Malagón *et al.* 2008), *A. oscura* (Domínguez *et al.* 2008, Ramírez-Malagón *et al.* 2008), *A. vera-cruz* (Tejavathi *et al.* 2007), *A. cupreata*, *A. difformis*, *A. karwinskii* y *A. potatorum* (Domínguez *et al.* 2008), *A. duranguensis*, *A. pigmaea* y *A. salmiana* sp. *crassispina* (Ramírez-Malagón *et al.* 2008) y *A. inaequidens* (Aureoles-Rodríguez *et al.* 2008).

Por lo antes mencionado se justifica el desarrollo de un sistema de propagación *in vitro* en variedades mexicanas de nardo, que sirva como base para aplicar técnicas de inducción de mutaciones en tejidos vegetales.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización del sitio experimental

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivos Vegetales *in vitro* de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en Uruapan, Michoacán.

3.2 Material vegetal

Los materiales biológicos utilizados en este experimento fueron tubérculos e inflorescencias de nardo selección San Andrés, comprados en San Andrés, Municipio de Zumpahuacán y en Tenancingo, Estado de México.

3.3 Organogenesis a partir de bulbos y tubérculos

3.3.1 Establecimiento del cultivo aséptico

Se escogieron tubérculos de nardo sin daños mecánicos visibles y con 3 a 10 bulbos laterales; se lavaron con agua del grifo y detergente para eliminar la mayor cantidad de suelo posible y se sumergieron durante tres horas en una solución compuesta por los fungicidas Benlate® (Benomilo 50 % i.a.) (1 g L⁻¹), Switch® (Cyprodinil 37.5 % y Fludioxonil 25 % i.a.) (1 g L⁻¹) y Cercobin M (Tiofanato metílico 70 % i.a.) (2 g L⁻¹). La desinfección se efectuó con una solución de hipoclorito de sodio comercial a 70 % v/v (6 % de cloro activo) durante 20 minutos. En la campana de flujo laminar se retiró la solución con cloro y se enjuagaron los explantes de cuatro a cinco veces con agua estéril.

Se colocaron de dos a tres bulbos en frascos de 100 mL de capacidad, con 15 mL de medio de cultivo líquido con las sales minerales de Murashige y Skoog (MS) a 100 % suplementados con benciladenina (BA) (1 mg L⁻¹), ácido naftalenacético (ANA) (0.2 mg L⁻¹) y el fungicida Switch (1 g L⁻¹). Los frascos con los explantes se incubaron en un fotoperiodo de 16 horas con luz blanca fría fluorescente de 75 W y una radiación fotosintéticamente activa de 45 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

3.3.2 Efecto de diferentes concentraciones de sales minerales del medio MS en el desarrollo de plantas de nardo

Se cultivaron bulbos en medio de cultivo MS con tiamina (0.4 mg L^{-1}), mio-inositol (100 mg L^{-1}), sacarosa (30 g L^{-1}) y agar (6 g L^{-1}) y se sometieron a tres tratamientos (Cuadro 1) conformados por diferentes concentraciones de sales minerales MS (50, 75 y 100 %). Los tratamientos se distribuyeron de acuerdo con un diseño estadístico completamente al azar con cinco repeticiones.

Cuadro 1. Tratamientos utilizados para evaluar el efecto de la concentración de sales del medio MS en el desarrollo de brotes de nardo. n=15.

Tratamiento	Concentración de sales (%)
1	50
2	75
3	100

Se sembró un explante por frasco de vidrio de 100 mL de capacidad, con 15 mL de medio de cultivo MS suplementados con BA (1 mg L^{-1}), y se incubaron bajo las condiciones descritas en el inciso 3.3.1. A los 30 días de la siembra se tomaron los datos de la variable altura en todos los explantes.

3.3.3 Efecto de diferentes dosis de BA y ANA en bulbos de nardo

Se escogieron bulbos asépticos de 0.5 a 1.5 cm de longitud para cultivarlos en un medio de cultivo líquido con las sales minerales del medio MS con soporte de papel filtro, con tiamina (0.4 mg L^{-1}), mio-inositol (100 mg L^{-1}), sacarosa (30 g L^{-1}). Los explantes se sometieron a seis tratamientos (Cuadro 2) conformados por tres concentraciones de BA (0.0, 1.0 y 2.0 mg L^{-1}) combinados con dos de ANA (0.0 y 0.5 mg L^{-1}), con seis repeticiones, distribuidos en un diseño estadístico completamente al azar con arreglo factorial 3X2.

Cuadro 2. *Tratamientos utilizados para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA) en bulbos de nardo. n=36.*

Tratamientos	BA (mg L ⁻¹)	ANA (mg L ⁻¹)
1	0.0	0.0
2	0.0	0.5
3	1.0	0.0
4	1.0	0.5
5	2.0	0.0
6	2.0	0.5

Se sembró un explante por frasco y se incubaron bajo las condiciones descritas en el inciso 3.3.1. A los 15 días de la siembra se tomaron los datos de las variables número y longitud de brotes y raíces en la totalidad de los explantes.

3.3.4 Aclimatación

Para la aclimatación de las plántulas de nardo regeneradas en los experimentos, éstas se transfirieron a macetas de 113.4 g con Peat moss® como sustrato y se colocaron en contenedores de plástico herméticos dentro de un invernadero, por un periodo de 30 días. Después de ese tiempo, las plántulas se consideraron aclimatadas, se quitó la tapa de los recipientes y se transfirieron a contenedores de 226.8 g.

3.4 Embriogénesis somática a partir de explantes florales de nardo

3.4.1 Establecimiento del cultivo aséptico de inflorescencias

Se seleccionaron botones de inflorescencias sin daños mecánicos visibles y se lavaron con detergente y agua del grifo; después se sumergieron durante 30 minutos en solución con los fungicidas Benlate® (Benomilo 50 % i.a.) (1 mg L⁻¹), Switch® (Cyprodinil 37.5 % y Fludioxonil 25 % i.a.) (1 mg L⁻¹) y Cercobin M (Tiofanato metílico 70 % i.a.) (2 mg L⁻¹). La desinfección se efectuó con una concentración de hipoclorito de sodio comercial 30 % v/v (6 % de cloro activo). Se sembraron tres explantes por frasco de vidrio de 100 mL de capacidad, con 15 mL de medio de cultivo MS con benciladenina (BA) (1 mg L⁻¹), ácido naftalenacético (ANA) (0.2 mg L⁻¹) y se incubaron bajo las mismas condiciones que en el inciso 3.3.1.

3.4.2 Efecto de diferentes dosis de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en botones y pétalos de nardo

Se sembraron botones cerrados y pétalos sin daños mecánicos en un medio de cultivo con las sales minerales de MS con tiamina (0.4 mg L^{-1}), mio-inositol (100 mg L^{-1}), sacarosa (30 g L^{-1}) y agar (6 g L^{-1}). Los explantes se sometieron a cinco tratamientos (Cuadro 3) conformados por cinco concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (0.0 , 1.0 , 2.0 , 3.0 y 5.0 mg L^{-1}) distribuidos en un diseño experimental totalmente a azar con seis repeticiones por tratamiento para el caso de los botones y siete repeticiones por tratamiento para el caso de los pétalos.

Cuadro 3. Tratamientos utilizados para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D en botones florales y pétalos de nardo.

Tratamiento	Concentraciones de 2,4-D (mg L^{-1})
1	0
2	1
3	2
4	3
5	5

n=30 para los botones y n=35 para pétalos.

Se sembró un botón o tres pétalos por frasco y se cultivaron en oscuridad. A los dos meses de cultivados los botones se midieron las variables de número de explantes que presentaron respuesta morfogénica, número de explantes necrosados y diámetro de masas; mientras que, en los pétalos se midieron las variables número de explantes con respuesta, número de masas por explante y peso fresco de masas.

3.4.3 Efecto de diferentes concentraciones de BA y 2,4-D en masas proembriónicas de nardo

De los experimentos anteriores se seleccionaron masas proembriónicas sin daños aparentes ni oxidación para cultivarlas en un medio con las sales minerales de MS con tiamina (0.4 mg L^{-1}), mio-inositol (100 mg L^{-1}), sacarosa (30 g L^{-1}) y agar (6 g L^{-1}). Las masas fueron sometidas a nueve tratamientos (Cuadro 4) conformados por tres concentraciones de 2,4-D (0.0 , 0.5 y 1.0 mg L^{-1}) y tres concentraciones de BA (0.0 , 0.5 y 1.0 mg L^{-1}) distribuidos en un

diseño experimental totalmente al azar con un arreglo factorial 3X3 con cuatro repeticiones por tratamiento.

Cuadro 4. *Tratamientos utilizados para evaluar el efecto de la combinación de diferentes concentraciones 2,4-D y BA en masas proembriónicas de nardo.*

Tratamiento	2,4-D (mg L ⁻¹)	BA (mg L ⁻¹)
1	0.0	0.0
2	0.0	0.5
3	0.0	1.0
4	0.5	0.0
5	0.5	0.5
6	0.5	1.0
7	1.0	0.0
8	1.0	0.5
9	1.0	1.0

2,4-D=ácido 2,4-diclorofenoxiacético, BA=benciladenina, n=36.

Se sembró un explante por frasco y se incubaron bajo las condiciones descritas en el inciso 3.3.1. A los 30 días de la siembra se subcultivaron en frascos con 15 mL de medio de cultivo MS suplementados con 2,4-D (1.0 mg L⁻¹) y BA (0.5 mg L⁻¹) se tomaron los datos de las variables diámetro, número de masas con raíces, número de masas necrosadas, número de masas verdes y peso fresco de masas, en la totalidad de los explantes.

3.5 Análisis estadístico

En todos los experimentos sujetos a un diseño estadístico se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía con el procedimiento PROC ANOVA, así como una prueba de comparación de medias (Tukey $\alpha=0.05$) utilizando el programa estadístico SAS versión 9.0 (SAS 2004).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Organogénesis en nardo

4.1.1 Establecimiento del cultivo aséptico

Debido a que las plantas interaccionan de manera constante con microorganismos, la asepsia en los cultivos *in vitro* es indispensable porque los hongos y bacterias presentan una

tasa de crecimiento mayor que las plantas en el medio de cultivo y éstas pueden ser invadidas completamente (Obledo-Vázquez *et al.* 2004). Con el proceso de desinfección se obtuvo 70 % de explantes asépticos a partir de tejidos extraídos de tubérculos, en 30 % de los explantes contaminados se identificaron hongos pertenecientes a los géneros *Fusarium* y *Rhizopus*. Estos microorganismos contaminantes aparecieron entre los tres y 20 días después de la siembra. Este porcentaje de asepsia se logró mediante el uso del método de desinfección generado en el capítulo uno de esta investigación debido a que los porcentajes de contaminación que se obtenían eran hasta de 100 %.

La presencia de microorganismos también ha sido informada en tejidos procedentes de yemas apicales y brotes laterales de *Y. valida*, en donde fue necesario usar un medio líquido adicionado con Cefotaxine (250 mg L⁻¹), Gentamicina (10 mg L⁻¹), Benlate (DuPont) al 5 % (p/v) y Captan (Bayer) al 5 % (p/v) para reducir la contaminación a un 15 %; sin embargo, no fue posible eliminar la contaminación por completo (Arce-Montoya *et al.* 2007). Por otra parte, en cultivos *in vitro* de *A. tequilana* Weber var. *azul* se logró controlar la contaminación con el empleo de un extracto comercial de toronja (Citricidal®) al 0.1 % (Obledo-Vázquez *et al.* 2004).

4.1.2 Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de sales minerales del medio MS en el desarrollo de plantas de nardo

La concentración total de sales minerales no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre el número de brotes por explante y la altura de las plantas regeneradas, por lo que para cultivar esta especie se puede utilizar cualquier concentración de sales indistintamente, sin afectar la caulogénesis. Aunque nuestros resultados indican que los explantes de nardo no requieren concentraciones mayores a 50 % de las sales del medio MS es necesario evaluar el efecto de éstas sales en otras variables como el número y desarrollo de raíces en los explantes, porque existen informes en donde se muestra que la concentración de sales minerales modifica la formación de raíces en algunas especies de agaváceas. En *A. inaequidens* se tuvieron diferencias estadísticamente significativas en el desarrollo de raíces en plántulas cultivadas con las sales minerales MS a diferente concentración; con el medio MS a 50 % se obtuvieron 4.40 raíces por plántula con la concentración a 100 % se obtuvieron 5.47 raíces por plántula (Aureoles-Rodríguez *et al.* 2008). Por otra parte, en la propagación *in vitro*

de *Curcuma longa* L. las concentraciones altas de las sales MS (75 y 100 %) produjeron la mayor cantidad de brotes por explante (3.78 y 3.80) que además presentaron una mayor longitud (2.20 y 2.11 cm) y con un mayor número de hojas (3.40 y 2.45) y raíces (6.65 y 7.55) por explante después de 30 días de cultivo (Espinosa *et al.* 2009).

4.1.3 Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de BA y ANA en el desarrollo de bulbos de nardo

El balance hormonal auxina/citocinina (ANA/BA) no afectó el desarrollo de brotes y raíces adventicias a partir de bulbos laterales (Núm. de raíces P=0.23, Longitud de raíces P=0.22, Núm. de brotes nuevos P=0.46 y Longitud de brotes nuevos P=0.44) (Cuadro 5). Es posible que la falta de diferencia estadística se deba a una gran variación en el contenido de hormonas endógenas y nutrientes contenidos en los bulbos. En otra investigación con tubérculos de nardos se obtuvo una frecuencia de diferenciación de brotes de 2.2 ± 1.2 con la combinación de 1.5 mg L^{-1} de BA y 0.5 mg L^{-1} de ácido indolacético (AIA) (Sangavai y Chellapandi 2008), mientras que, en *Y. aloifolia* se regeneraron de 7 a 8 brotes por explante con la combinación de 1.5 mg L^{-1} de BA y de 0.06 a 0.1 mg L^{-1} de ANA (Karpov 2004). Por otra parte, en *A. cupreata* y *A. karwinskii* se obtuvieron 10.5 y 6.1 brotes por explante con 1.5 y 1 mg L^{-1} de BA, respectivamente (Domínguez *et al.* 2008).

Cuadro 5. Efecto de diferentes concentraciones de benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA) en el desarrollo de bulbos de nardo.

BA (mg L^{-1})	ANA (mg L^{-1})	Número de raíces (r e)	Longitud de raíces (cm)	Número de brotes nuevos (bn e)	Longitud de brotes nuevos (cm)
0.0	0.0	0.50 a	0.02 a	0.17 a	0.10 a
0.0	0.5	1.50 a	0.21 a	0.00 a	0.00 a
1.0	0.0	0.00 a	0.00 a	0.50 a	0.30 a
1.0	0.5	1.33 a	0.09 a	0.33 a	0.33 a
2.0	0.0	2.20 a	0.27 a	0.00 a	0.00 a
2.0	0.5	3.75 a	0.19 a	0.25 a	0.15 a

r e=Raíces por explante, cm=Centímetros y bn e =Brotes nuevos por explante. n=36. Letras diferentes presentan diferencias significativas ($P \leq 0.05$). n = 36.

En cuanto al efecto independiente de la citocinina y la auxina, tampoco se presentaron diferencias estadísticas significativas (Núm. de raíces P=0.09 y P=0.17, Longitud de raíces P=0.13 y P=0.37, Núm. de brotes nuevos P=0.22 y P=0.90 y Longitud de brotes nuevos

P=0.16 y P=0.83, respectivamente). Es posible que los bulbos de nardo contengan gran cantidad de hormonas endógenas capaces de inhibir parcialmente a las hormonas adicionadas al medio; por lo que, se recomienda ver la evolución de los explantes después de varios subcultivos, probar dosis más altas de estos reguladores del crecimiento o probar otras auxinas y citocininas; además, se recomienda establecer otros explantes como yemas y secciones transversales del tubérculo o con segmentos de tallo floral de las inflorescencias de nardo.

4.1.4 Aclimatación

Después de 30 días del trasplante en Peat moss[®] la totalidad de las plántulas sometidas al proceso de aclimatación sobrevivieron y no fue necesario subcultivar los brotes enraizados a un medio sin hormonas antes de pasarlos al sustrato (Figura 1). Un resultado similar se obtuvo en brotes de *Agave inaequidens* Koch. en los que no fue necesaria la adición de reguladores del crecimiento al medio cultivo para propiciar la formación de raíz *in vitro* y mostraron una sobrevivencia del 100 % (Aureoles-Rodríguez *et al.* 2008).

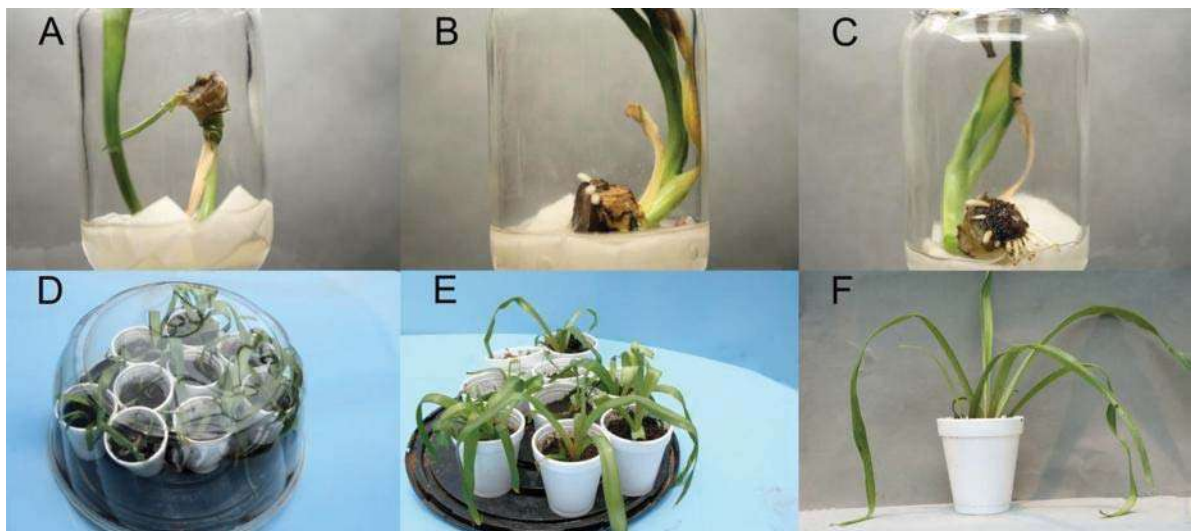


Figura 1. Aclimatación de brotes *in vitro* de nardo A) Brote previo al desarrollo de raíces, B) Inicio del desarrollo de raíces, C) Desarrollo de raíces completo, D) Brotes en proceso de aclimatación, E) y F) Brotes aclimatados.

4.2 Embriogénesis somática en nardo

4.2.1 Establecimiento del cultivo aséptico

Los explantes florales no presentaron contaminación después de 15 días de haber sido sometidos al proceso de desinfección, a diferencia de los explantes extraídos de tubérculos, es posible que esto se deba al origen de los explantes. La elección de los tejidos es muy importante porque los explantes que están en contacto con el suelo por un periodo de tiempo largo tienen una gran cantidad de microorganismos edáficos (Mroginski y Roca 1991, Espinosa *et al.* 2009).

4.2.2 Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en botones y pétalos de nardo

La presencia de auxinas fue necesaria para el desarrollo de callo proembriogénico a partir de los botones, tomando en cuenta que los explantes sembrados en el medio sin fitohormonas continuaron creciendo, se abrieron y posteriormente se marchitaron en lugar de generar callo. En los explantes con respuesta morfogénica, el callo se empezó a desarrollar entre las primeras dos a tres semanas después de la siembra y se originaron del peciolo de los botones florales. Después de 45 días inició la formación de masas embriogénicas, que continuaron su desarrollo hasta cubrir la mayor parte del callo inicial (Figura 2).

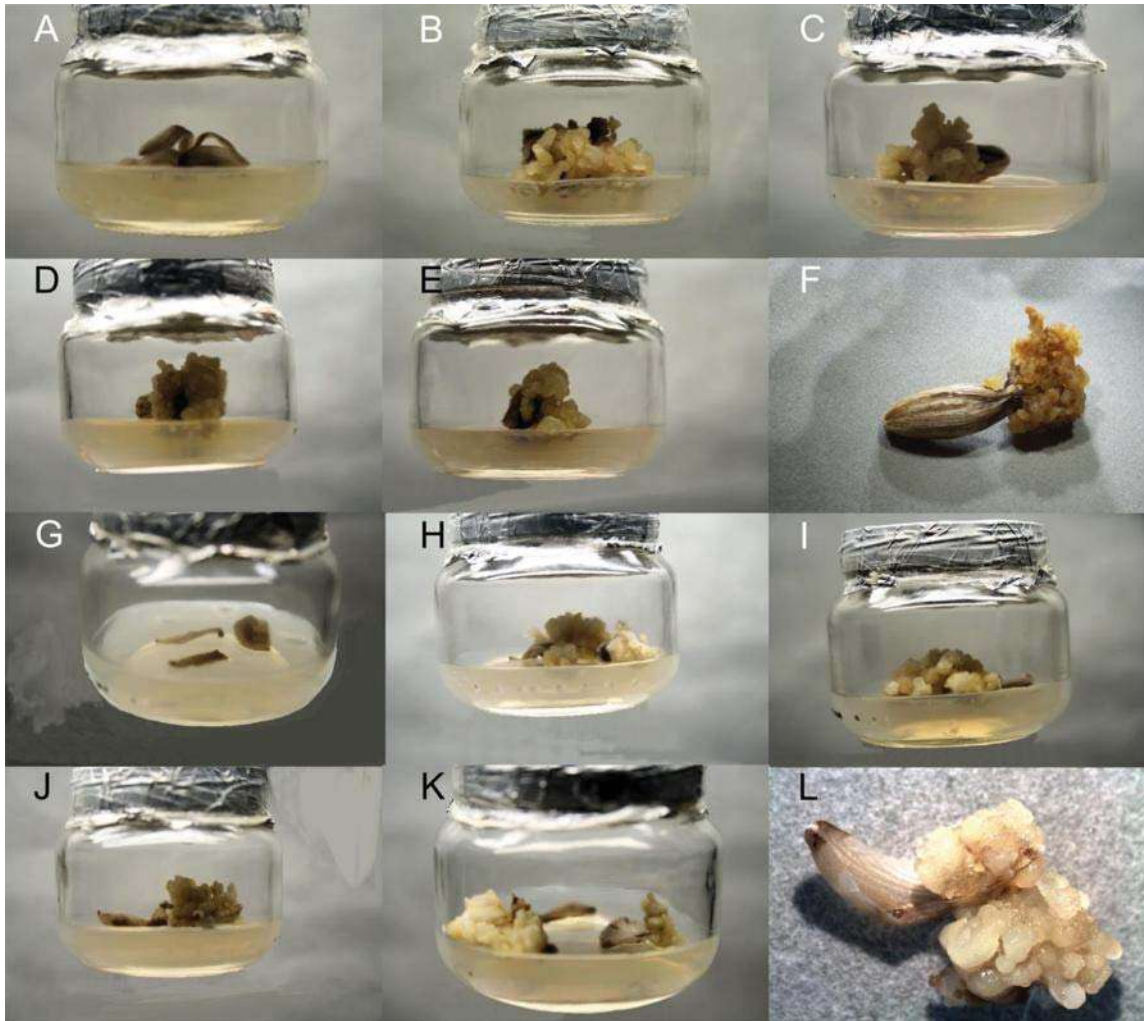


Figura 2. Callos embriogénicos desarrollados a partir de botones florales y pétalos A) botón que no fue expuesto al 2,4-D, B), C), D) y E) botones expuestos a 1, 2, 3 y 5 mg L⁻¹ de 2,4-D, respectivamente, F) vista al microscopio de callo embriogénico de botón floral de nardo. G) pétalos que no fueron expuestos al 2,4-D, H), I), J) y K) pétalos expuestos a 1, 2, 3 y 5 mg L⁻¹ de 2,4-D, respectivamente y L) vista al microscopio de callo embriogénico pétalo de nardo.

La mayor inducción y desarrollo de callos se presentó con 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, concentración con la que se obtuvo 100 % de explantes con respuesta. El porcentaje de respuesta de los explantes fue indiferente a las dosis de 2,4-D probadas (Figura 3). Al aumentar la dosis de 2,4-D también aumentó la necrosis de los callos (Figura 4). Esto coincide con lo observado en brotes de inflorescencias axilares de *Agave sisalana*, en los que se obtuvieron callos proembriogénicos en el 100 % de los explantes con 1 y 0.5 mg L⁻¹ de 2,4-D más 1 a 2 mg L⁻¹ de BA o Kin (Nikam *et al.* 2003).

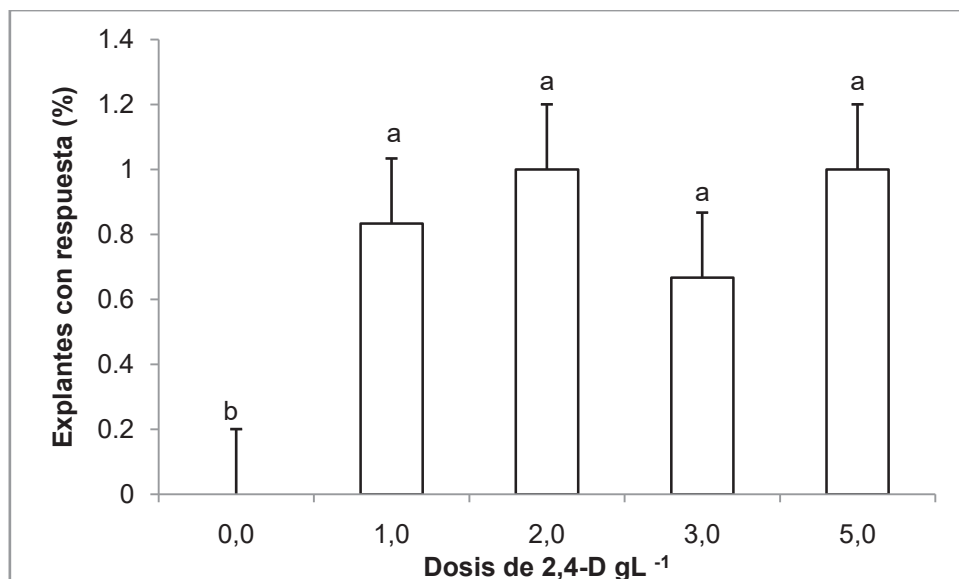


Figura 3. Efecto de cinco dosis de 2,4-D en la inducción de callo a partir de botones florales de nardo después de dos meses de cultivo in vitro. Las líneas verticales sobre las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$). $n=30$.

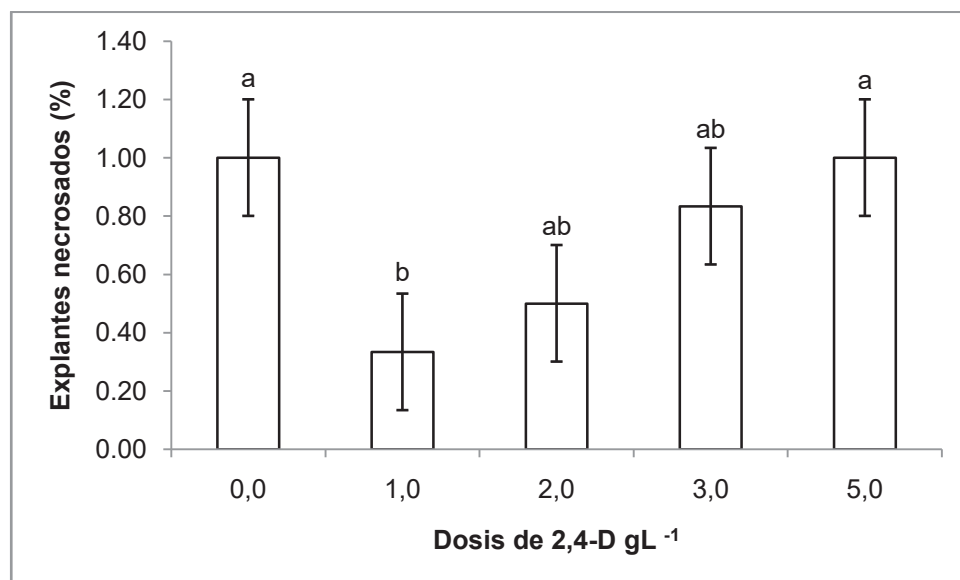


Figura 4. Efecto de cinco dosis de 2,4-D en el necrosamiento de callos inducidos a partir botones florales de nardo después de dos meses de cultivo in vitro. Las líneas verticales sobre las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). $n=30$.

Aunque la concentración de 5 mg L⁻¹ produjo masas proembriogénicas de 0.72 cm de diámetro, la mayoría de los callos desarrollados empezaron a necrosarse antes que los

generados en el resto de las concentraciones de 2,4-D (Figura 5). Hay que tomar en cuenta que las masas proembriogénicas con un mayor diámetro (1.48 cm) se desarrollaron con la concentración de 2 mg L⁻¹ de 2,4-D.

Las masas cubiertas de un líquido viscoso se desprendieron fácilmente del explante y callo inicial; de forma similar, en el cultivo *in vitro* de otras plantas como *Alstroemeria* y *Allium cepa* se presentó una sustancia mucilaginosa que redujo el desarrollo de callo y la maduración de embriones somáticos (Zheng *et al.* 1998, Pedraza 2004).

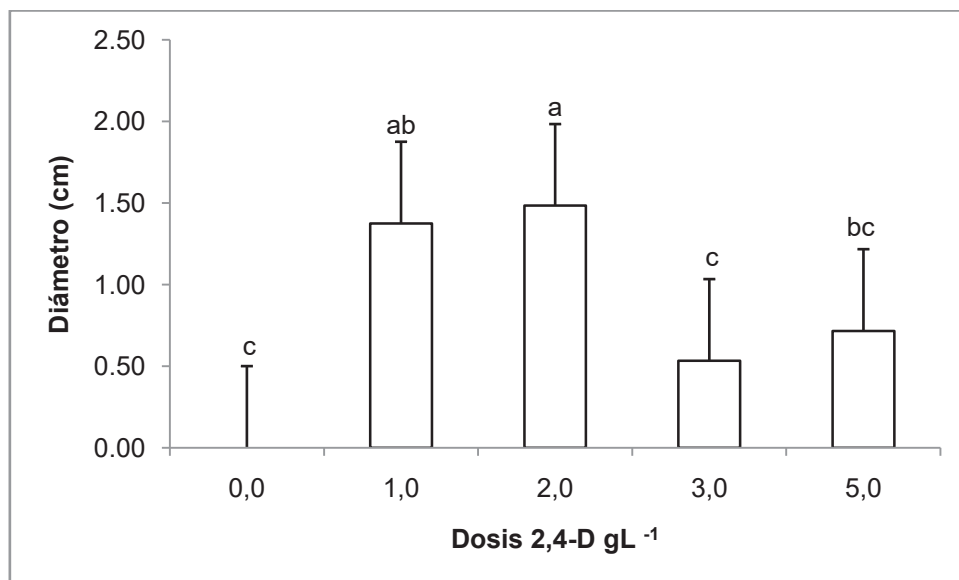


Figura 5. Efecto de cinco dosis de 2,4-D en el diámetro de masas proembriogénicas desarrolladas en callos inducidos a partir de botones florales de nardo después de dos meses de cultivo *in vitro*. Las líneas verticales sobre las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). $n=30$.

En el caso de los pétalos, el mayor porcentaje de explantes con callo (52.3 %) se obtuvo con 2 mg L⁻¹ de 2,4-D (Figura 6); sin embargo, no hubo diferencia estadística significativa en el peso fresco de las masas embriogénicas, ni en el número de masas por explante en las diferentes concentraciones probadas. Este resultado contrasta con los obtenidos, en un experimento realizado en pétalos de nardo en el que se obtuvieron valores elevados (15.2 g L⁻¹ y 15.9 g L⁻¹ respectivamente) en el peso seco en callos derivados de pétalos de nardo al agregar 10⁻⁵ M (2.61 mg L⁻¹) de 2,4-D y 10⁻⁵ (2.25 mg L⁻¹) o 10⁻⁶ M (0.23 mg L⁻¹) de BA o con 10⁻⁵ M (1.86 mg L⁻¹) de ANA y 10⁻⁶ M (0.23 mg L⁻¹) de BA, a los 30 días de iniciado el cultivo (Otsuji *et al.* 1994).

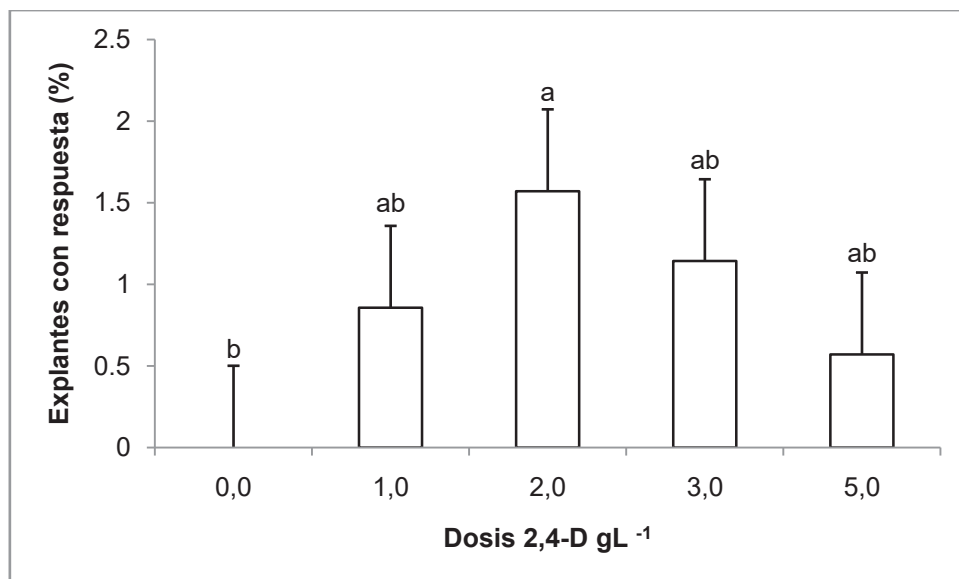


Figura 6. Efecto de cinco dosis de 2,4-D en la inducción de callos a partir de pétalos de nardo después de tres meses de cultivo *in vitro*. Las líneas verticales sobre las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). $n=35$.

Los callos se empezaron a desarrollar en la parte basal y en el centro del pétalo después de dos meses de haber sido sembrados y en todas las concentraciones de 2,4-D probadas (Figura 2); mientras que los pétalos en el tratamiento testigo murieron sin formar callos. Estos callos tuvieron un aspecto más granulado y friable que los desarrollados a partir de botones florales, por lo que es posible que tengan mejores cualidades embriogénicas; sin embargo, la respuesta de los pétalos al 2,4-D parece ser inferior a la de los botones florales al presentar un menor número de masas por explante (3.39 a 9.03) en comparación con las generadas a partir de los botones (11.8 a 29.8 masas por explante).

4.2.3 Evaluación del efecto de la combinación de diferentes concentraciones de BA y 2,4-D en masas proembriogénicas de nardo

Al exponer las masas proembriogénicas desarrolladas en los experimentos anteriores a diferentes combinaciones de 2,4-D y BA algunas desarrollaron grupos de pelos radiculares y otras empezaron a tornarse de color verde. El número de masas con raíces aumentó en los tratamientos donde no se adicionó a la hormona 2,4-D (Figura 7), y fue mayor (29.75 masas con raíces por explante) en el tratamiento sin fitohormonas; el menor desarrollo de raíces (2.50 masas embriogénicas con raíces por explante) se presentó con los tratamientos con 0.5 mg L^{-1}

de 2,4-D y 1.0 mg L⁻¹ de BA y de 1.0 mg L⁻¹ de 2,4-D sin citocininas; sin embargo, la primera combinación de hormonas presentó un gran necrosamiento de masas (24.00 masas necrosadas por explante) (Figura 8).

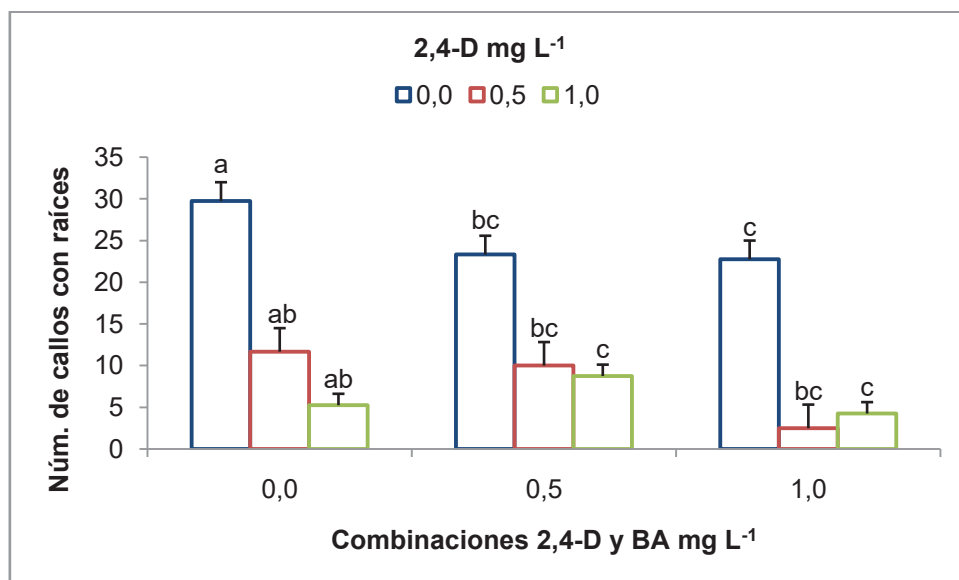


Figura 7. Efecto de nueve combinaciones de 2,4-D y BA en el número de masas con raíces después de 30 días de cultivo *in vitro*. Las líneas verticales sobre las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). $n=36$.

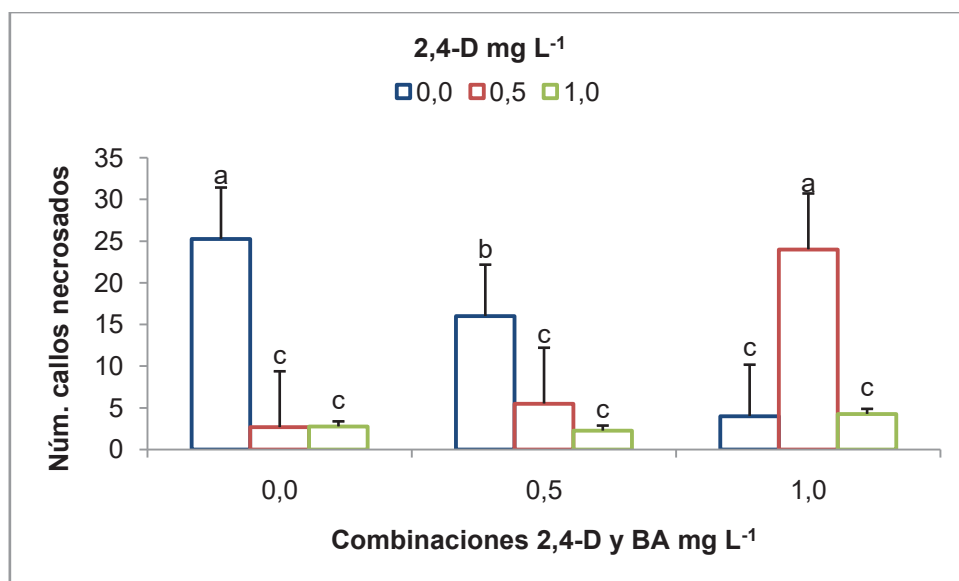


Figura 8. Efecto de nueve combinaciones de 2,4-D y BA en el número de masas necrosadas después de 30 días de cultivo *in vitro*. Las líneas verticales sobre las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). $n=36$.

La mayor cantidad de masas que empezaron a tomar una coloración verde (20.00 masas verdes por explante) (Figura 9) se presentó con 1.0 mg L⁻¹ de BA y sin 2,4-D, por lo que se puede concluir que la coloración verde en las masas proembriogénicas no requiere de auxinas pero sí de citocininas, lo que no concuerda con los resultados en *A. vera-cruz* donde se obtuvieron callos verdes embriogénicos con 4.52 μM (1.1 mg L⁻¹) de 2,4-D o 5.53 μM (1.0 mg L⁻¹) de ANA (Tejavathi *et al.* 2007).

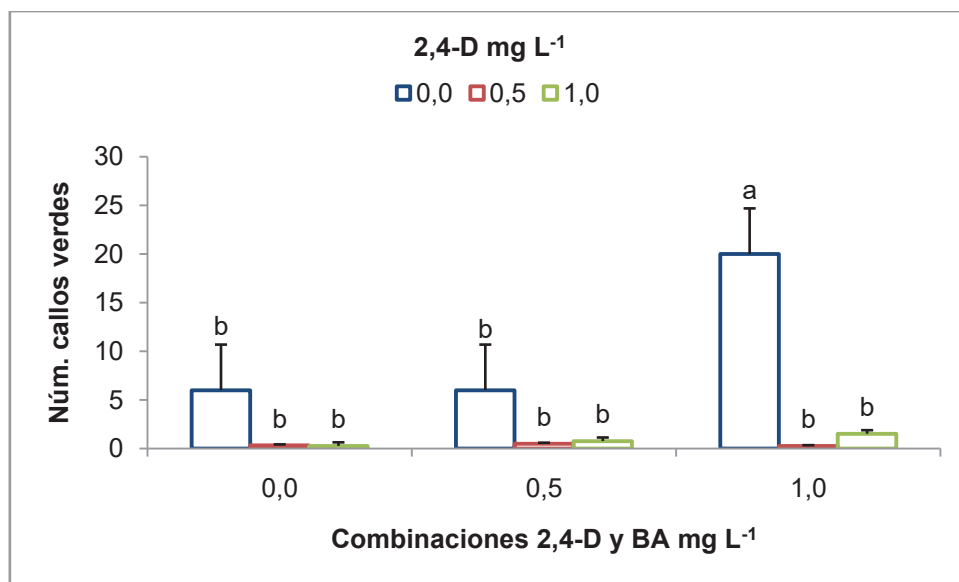


Figura 9. Efecto de nueve combinaciones de 2,4-D y BA en el número de masas verdes después de 30 días de cultivo *in vitro*. Las líneas verticales sobre las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). $n=36$.

En presencia de la auxina 2,4-D se produce una reducción en el número de masas proembriogénicas que desarrollaron grupos de raíces y de masas que se tornaron de color verde, ya que la mayor cantidad de estas se presentaron en ausencia de esta hormona; mientras que la citocinina BA no parece tener un efecto significativo en el número de masas que desarrollaron raíces, aunque causan un aumento en el número de masas que se tornaron de color verde (Figura 10); sin embargo, la presencia de luz que estuvo presente durante todo el experimento podría influir en el desarrollo de raíces y masas verdes. Por ello, se sugiere repetir este experimento en condiciones de oscuridad. En *A. tequilana* Weber los embriones somáticos producidos con altas concentraciones de auxinas tenían un color crema, mientras

que los desarrollados con altas concentraciones de citocininas tenían un color amarillo (Portillo *et al.* 2007).

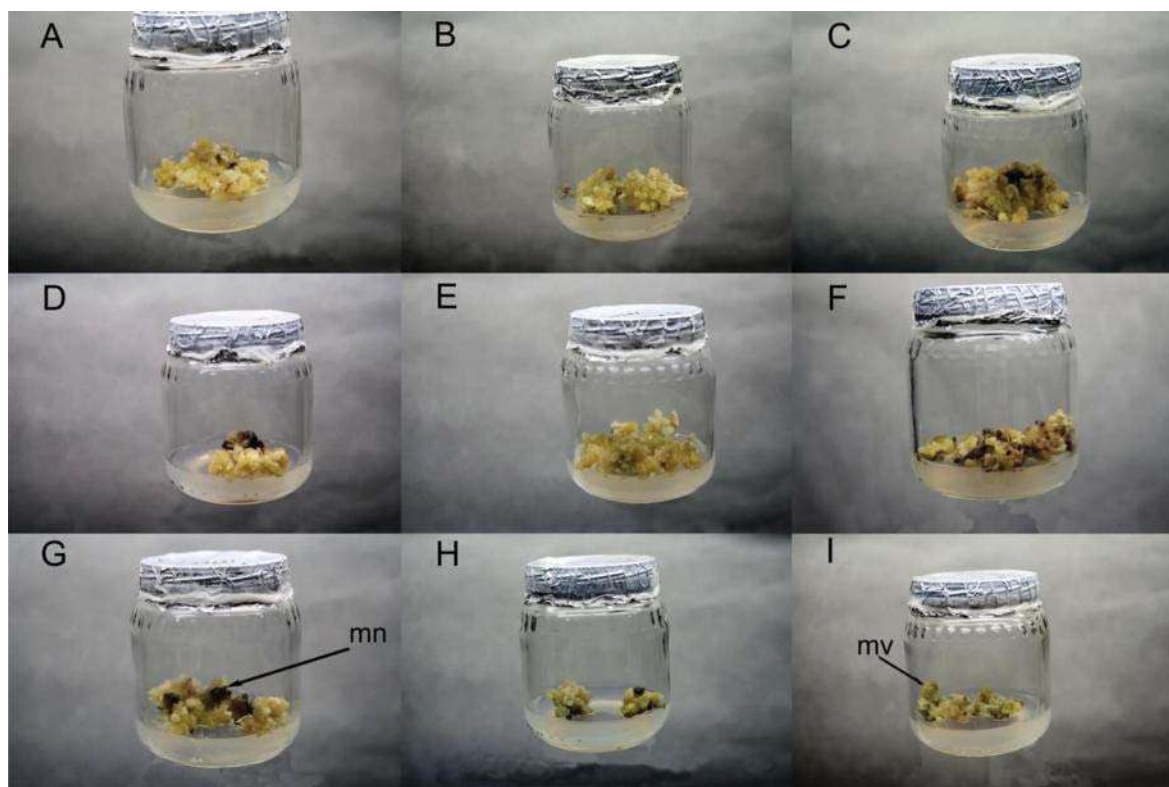


Figura 10. Callos de nardo expuestos a diferentes combinaciones de ANA y BA A), B) y C) callos expuestos a 1 mg L^{-1} de 2,4-D y 0, 0.5 y 1 mg L^{-1} de BA, respectivamente, D), E) y F) callos expuestos a 0.5 mg L^{-1} de 2,4-D y 0, 0.5 y 1 mg L^{-1} de BA, respectivamente, G), callo en un medio de cultivo libre reguladores del crecimiento, H) e I) callos expuestos a 0 mg L^{-1} de 2,4-D y 0.5 y 1 mg L^{-1} de BA respectivamente, mn = masa proembriónica necrosada y mv = masa proembriónica verde.

El necrosamiento de masas se presentó tanto en presencia de 2,4-D y BA como en ausencia de estas fitohormonas; sin embargo, los tratamientos expuestos a una dosis de 2,4-D de 1 mg L^{-1} parecen desarrollar menos masas necrosadas (Figuras 11 y 12).

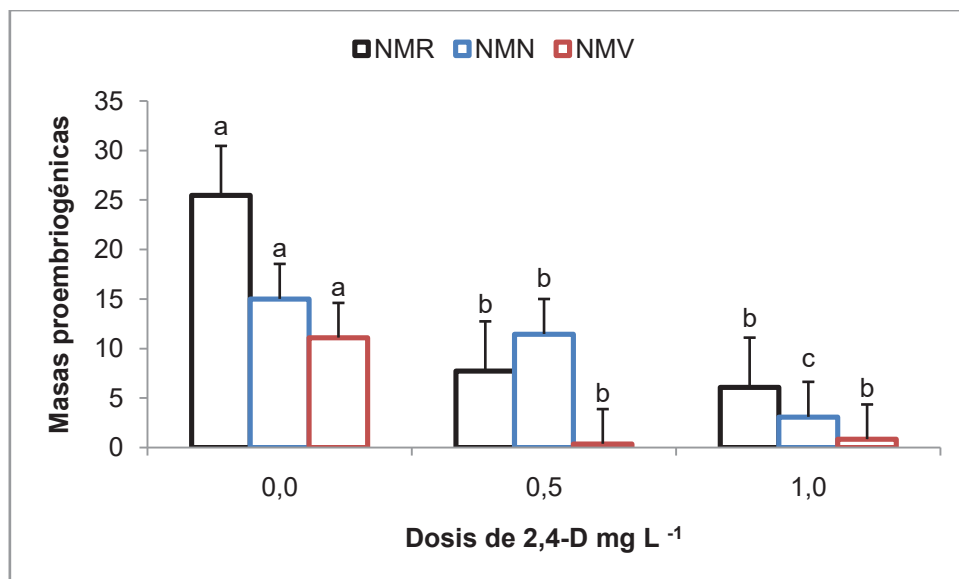


Figura 11. Efecto de la auxina 2,4-D en el número de masas con raíces (NMR), número de masas necrosadas (NMN) y número de masas verdes (NMV) después de 30 días de cultivo *in vitro*. Las líneas verticales sobre las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). $n=36$.

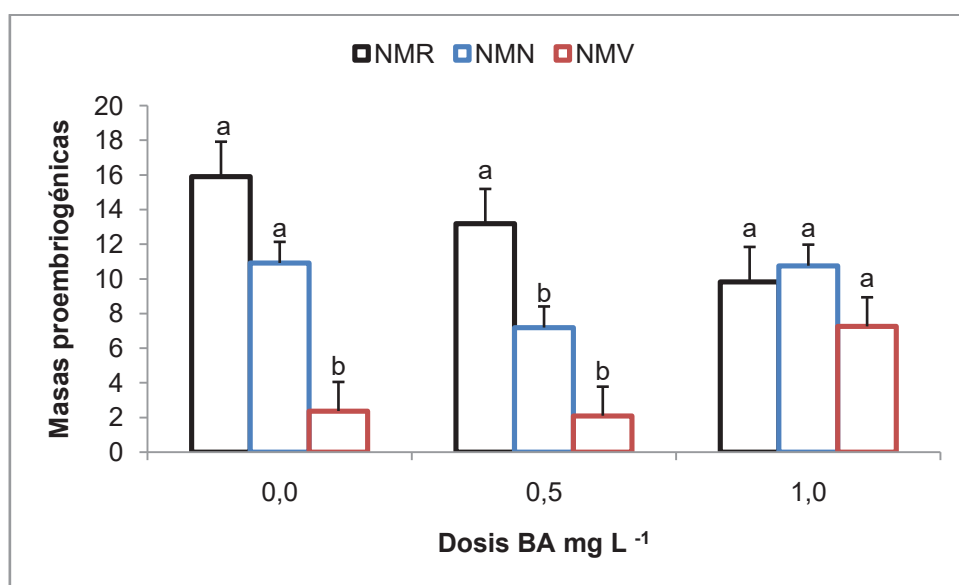


Figura 12. Efecto de la citocinina BA en el número de masas con raíces (NMR), número de masas necrosadas (NMN) y número de masas verdes (NMV) después de 30 días de cultivo *in vitro*. Las líneas verticales sobre las barras indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). $n=36$.

La ausencia de citocininas en el medio de cultivo provocó una baja germinación en los embriones somáticos de *A. fourcroydes* Lem. mientras que la combinación de 0.11 μM de 2,4-D y 22.2 μM de BA produjo una gran germinación de embriones somáticos (30 plantas por cada 40 embriones) (González *et al.* 2002); por otra parte, en *A. tequilana* Weber los embriones somáticos sólo maduraron y germinaron en un medio MS reducido a 5 mM de NH_4NO_3 y con las vitaminas L2, 500 mg L^{-1} de L-glutamina, 250 mg L^{-1} caseína hidrolizada y sin reguladores del crecimiento (Portillo *et al.* 2007).

Las masas continuaron presentando un líquido viscoso y seguían desprendiéndose con facilidad como en los experimentos anteriores.

V. CONCLUSIONES

1. Los métodos tradicionales para la desinfección de explantes de nardo para el cultivo *in vitro* son insuficientes para los explantes procedentes de tubérculo, pero no para los explantes florales.

2. Los brotes de nardo derivados a partir de tubérculos presentan un buen desarrollo sin importar la concentración de sales MS en el medio de cultivo.

3. La concentración de 2 mg L^{-1} de 2,4-D presentó la mejor respuesta a la inducción y desarrollo de callos embriogénicos en botones florales y pétalos de nardo.

4. La ausencia de 2,4-D produce una tendencia a un mayor número de masas con raíces y masas verdes.

VI. LITERATURA CITADA

Arce-Montoya, M., J. A. Hernández-González, M. Rodríguez-Álvarez and M. L. Robert. 2007. **No correlation between the growth of *in vitro* cultured *Yucca valida* clones and the growth of their mother plants in the field.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 88: 35-40.

Aureoles-Rodríguez, F., J. L. Rodríguez-de la O, J. P. Legaria-Solano, J. Sahagún-Castellanos y M. G. Peña-Ortega. 2008. **Propagación *in vitro* del ‘Maguey Bruto’ (*Agave inaequidens* Koch), una especie amenazada de interés económico.** *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14 (3):263-269.

- Domínguez R., M. S., A. G. Alpuche S., N. L. Vasco M. y E. Pérez MB. 2008. **Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de *Agaves* mexicanos.** *Revista Fitotecnia Mexicana* 31(4): 317-322.
- Espinosa R., A., J. J. Silva P., M. Borges G., L. Fajardo R., J. Pérez P., O. González P. y S. Sario F. 2009. **Establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Curcuma longa* L.** *Bioteología Vegetal* 9 (1):53-59.
- González O., G., S. Alemán G., F. Barredo y M. L. Robert G. 2002. **Embriogénesis somática en *Agave fourcroydes* Lem.** *Bioteología Vegetal* 2(1): 3-8.
- Gonzatti, C. 1981. **Flora Taxonómica Mexicana** II Ed CENEI. Guadalajara, México. 87-88p.
- Hazra, S. K., S. Das and A. K. Das. 2002. **Sisal plant regeneration via organogenesis.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 235-240.
- Karpov, P. 2004. **Clonal propagation of *Yucca aloifolia* L.** *Acta Universitaris Latviensis, Biology* 676: 177-182.
- Martínez-Palacios, A., M. P. Ortega-Larrocea, V. M. Chavez and R. Bey. 2003. **Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoria-reginae*: Considerations for its conservation.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 135-142.
- Mroginski, L. A. y W. M. Roca. 1991. **Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*.** *In: Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones.* Roca W. M. y L. A. Mroginski (ed). CIAT. p 19-40.
- Murashige T and Skoog F. 1962. **A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture.** *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Nikam, T.D., G.M. Bansude and K.C. Aneesh K. 2003. **Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. Ex. Engelman).** *Plant Cell Reports* 22: 188-194.
- Obledo-Vázquez, E.N., N. Flores-Verduzco y J. Cervantes-Martínez. 2004. **Detección del efecto de un extracto vegetal antimicrobiano sobre plantas de agave (*Agave tequilana* Weber var *azul*) cultivadas *in vitro* utilizando fluorescencia inducida por láser (LIF).** *Revista Mexicana de Fitopatología* 22 (3): 328-332.
- Otsuji, K., Y. Honda, Y. Sugimura and A. Takei. 1994. **Production of polysaccharides in liquid cultures of *Polianthes tuberosa* cells.** *Biotechnology Letters* 16 (9): 943-948.
- Pedraza S. M. E. 2004. **Regeneración *in vitro* de *Alstroemeria* sp.** Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México. 247 p.

- Portillo, L., F. Santacruz-Ruvalcaba, A. Gutiérrez-Mora and B. Rodríguez-Garay. 2007. **Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul.** *In Vitro Cellular & Development Biology-Plant* 43:569-575.
- Ramírez-Malagón, R., A. Borodanenko, L. Pérez-Moreno, M. S. Salas-Araiza, H. G. Nuñez-Palenius and N. Ochoa-Alejo. 2008. **In vitro propagation of three *Agave* species used for liquor distillation and three for landscape.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 94: 201-207.
- Sangavai, C., and Chellapandi P. 2008. **In vitro propagation of a tuberose plant (*Polianthes tuberosa* L.).** *Electronic Journal of Biology* 4 (3): 98-101.
- Shillo, R. 1992. **The tuber community holds the answer to flowering problems in *Polianthes tuberosa*.** *Acta Horticulturae* 325: 139-364.
- Solano, E., and T. Patricia F. 2007. **Ecological niche modeling and geographic distribution of the genus *Polianthes* L. (Agavaceae) in Mexico: using niche modeling to improve assessments of risk status.** *Biodiversity and Conservation* 16: 1885-1900.
- Tejavathi, D. H., M. D. Rajanna, R. Sowmya and K. Gayathamma. 2007. **Induction of somatic embryos from cultures of *Agave vera-cruz* Mill.** *In Vitro Cellular & Development Biology-Plant* 43: 423-428.
- Toker, C., S. S. Yadav and I. S. Solanki. 2007. **Mutation breeding.** En: **Lentil: An ancient crop for modern times** (S. S. Yadav, D. McNeil and P. C. Stevenson Eds.).Springer. pp. 209-224.
- Valenzuela-Sánchez, K. K., R. E. Juárez-Hernández, V. Olalde-Portugal, M. Elena V. and O. Paredes-López. 2006. **Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogenesis.** *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 42: 336-340.
- Van Harten, A. M. 1998. **Mutation breeding: theory and practical applications.** Cambridge University Press, Cambridge, UK. 353 pp.
- Zheng, S., B. Henken, E. Sofiari, E. Jacobsen, F.A. Krens and C. Kik. 1998. **Factors influencing induction, propagation and regeneration of mature zygotic embryos-derived callus from *Allium cepa*.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53: 99-105.

CAPÍTULO 3

EFECTO DE RAYOS GAMMA ^{60}Co EN NARDO (*Polianthes tuberosa* L.)

I. RESUMEN

Las plantas que se reproducen asexualmente como el nardo (*Polianthes tuberosa* L.) presentan poca variabilidad genética, por lo que se justifica el empleo de técnicas que permitan inducir esa variabilidad como la mutagénesis. Por esto, en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) se irradiaron tubérculos de nardo que tenían de dos a 21 bulbos laterales con siete dosis de radiación gamma ^{60}Co desde cero a 30 Gray (Gy) con intervalos de 5 Gy entre tratamientos. De los tubérculos irradiados se extrajeron bulbos laterales sin daños mecánicos y se establecieron *in vitro* en un medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) (MS) con 1 mg L⁻¹ de benciladenina (BA) y 0.5 mg L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA), los tubérculos que quedaron después de la extracción de bulbos se sembraron en un sustrato conformado por suelo, tierra de hojas y tezontle en una proporción de 1:1:1. El desarrollo de las plantas de nardo disminuyó al aumentar las dosis de radiación tanto *in vitro* como *in vivo*, las plantas irradiadas presentaron mayor variación en el largo y ancho de hojas que las no irradiadas, además presentaron hojas deformes, brotes arrosados y brotes que se secaban repentinamente. Las plantas procedentes de brotes aclimatados de nardo presentaron una LD₅₀ (9.09 Gy) menor a la de los tubérculos establecidos *in vivo* (LD₅₀ de 25.91 Gy) en los que la dosis de 30 Gy fue letal para todas las plantas después de cinco meses de cultivo.

Abstract

Asexually propagated plants as tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) have low genetic variability thus the use of techniques to induce variability as mutagenesis is justified, were tubers that had from two to 21 lateral bulbs were irradiated with seven doses of ^{60}Co gamma radiation ranging from zero to 30 Gy at intervals of five Gray among treatments at the National Institute for Nuclear Research (ININ). Lateral bulbs without mechanical damage were removed from irradiated tubers bulbs and settled *in vitro* in culture medium Murashige and Skoog (1962) (MS) with 1 mg L⁻¹ of benzyladenine (BA) and 0.5 mg L⁻¹ naphthaleneacetic acid (ANA). Remaining tubers after extraction of bulbs were planted in a substrate composed of soil, organic soil and volcanic rock in a ratio of 1:1:1. The development

of tuberose plants decreased as radiation dose increased both *in vitro* and *in vivo*. Irradiated plants showed greater variation in length and width of leaves compared to non-irradiated ones. Irradiated plants exhibited deformed leaves, rosette forming shoots and quickly withering shoots. Plants acclimated from shoots of nard had a LD₅₀ (9.09 Gy) less than that of plants obtained from tubers established *in vivo* (LD₅₀ of 25.91 Gy) in which dose of 30 Gy was lethal for all plants after five months of culture.

II. INTRODUCCIÓN

La mutagénesis es una herramienta importante en el mejoramiento genético de los cultivos además de que está libre de las restricciones y regulaciones impuestas a los organismos genéticamente modificados (Parry *et al.* 2009). Hasta el año 2007 el número de variedades desarrolladas a partir de mutagénesis que oficialmente fueron liberadas y registradas en la Base de Datos de Variedades Mutantes de la Organización para la Agricultura y Alimentación/Agencia Internacional de Energía Atómica (FAO/IAEA) son cerca de 2300 (Toker *et al.* 2007).

El uso de la radiación ionizante como los rayos X, rayos gamma y neutrones, así como los mutágenos químicos para inducir variación está bien establecido (Ahloowalia y Maluszynski 2001), debido a la gran cantidad de trabajos en el área de la mutagénesis convencional y en varios cultivos como en jitomate (Watanabe *et al.* 2007, Matsukura *et al.* 2007) y comino negro (Kumar y Gupta 2007). La combinación entre las técnicas de inducción de mutantes y de cultivo *in vitro* pueden ofrecer muchas ventajas como la separación de quimeras, la capacidad de producir grandes poblaciones en poco tiempo y la posibilidad de obtener clones de un solo brote (Van Harten 1998). La dosis de radiación es un factor clave para lograr mutaciones en el material vegetal. En el caso de las plantas cultivadas *in vitro* sólo unos miligramos de tejido son irradiados por lo que se requieren dosis bajas (Ahoowalia y Maluszynski 2001). Existen varios trabajos en los que se realiza la inducción de mutaciones *in vitro* en plantas como caña de azúcar (García *et al.* 2001) plátano (Kulkarni *et al.* 2007), cacahuete (Muthusamy *et al.* 2007) y camote (Luan *et al.* 2007).

El nardo presenta poca variabilidad genética porque sólo se propaga a través de tubérculos (Shillo 1992), por lo que se justifica el desarrollo de técnicas que permitan incrementos en la variabilidad genética de esta especie, como la mutagénesis causada por la

exposición de tejidos vivos a radiaciones gamma o la combinación de cultivo *in vitro* y radiaciones gamma.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización del sitio experimental

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales y en los invernaderos de la Facultad de Agrobiología Presidente Juárez, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en Uruapan, Michoacán.

3.2 Material vegetal

Los materiales biológicos empleados en este experimento fueron tubérculos de nardo de primera generación comprados en la zona de San Andrés, Estado de México. Los tubérculos con 2 a 21 bulbos pequeños (diámetro de 0.7 a 3 cm y longitud de 1 a 3.4 cm), se dejaron secar por 30 días y posteriormente se clasificaron por tamaños, se colocaron en sobres tamaño carta de color amarillo cada una con cinco o seis tubérculos y se identificaron según su tratamiento.

3.3 Irradiación del material vegetal

La irradiación de los tubérculos se realizó en el Departamento del Irradiador Gamma del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), con un irradiador Gammacell 220. Se establecieron siete dosis de radiación de ^{60}Co (Cuadro 1).

Cuadro 1. Relación de dosis a las que fueron expuestos los tubérculos de nardo.

Tratamientos	Dosis (Gy)
1	0
2	5
3	10
4	15
5	20
6	25
7	30

Gy = Gray

3.4 Pruebas de radiosensibilidad

3.4.1 Establecimiento *in vitro* de explantes de tubérculos irradiados

De los tubérculos irradiados se extrajeron los bulbos laterales sin daños mecánicos visibles, se separaron por tratamientos y posteriormente se desinfectaron utilizando el protocolo descrito en el inciso 3.3.1 del Capítulo 2; se distribuyeron en un diseño estadístico completamente al azar con 27 repeticiones por tratamiento. Cuando los explantes estaban incubándose en medio con fungicida se midieron las variables número de explantes con brotes, porcentaje de contaminación y altura de brotes. Después de subcultivarlos a un medio sin fungicida y se midió la variable altura de brotes. Los brotes se aclimataron bajo condiciones de invernadero como se describe en el inciso 3.3.4 del Capítulo 2, aunque no todos los brotes desarrollaron raíces.

Los brotes de nardo que sobrevivieron a la contaminación y aclimatación se distribuyeron en un diseño estadístico bloques al azar con 15 bloques y una repetición por bloque; después se trasplantaron a vasos de unicel con 226.8 g de un sustrato conformado por suelo (extraído de tierras de cultivo) y Peat moss[®] en proporción 1:1 y un mes después se trasplantaron nuevamente a recipientes con capacidad de un litro y utilizando suelo como sustrato. Los brotes de nardo aclimatados recibieron dos riegos por semana con solución nutritiva Steiner al 70 % durante los dos primeros meses después de ser aclimatados. En los meses siguientes se fertilizaron con 2-3 g de Fórmula Especial Jardín 12-24-12[®] una vez al mes. A los cuatro meses de aclimatar los brotes de nardo se tomaron los datos de las variables largo y ancho de hojas. Un mes después se contó el número de plantas aclimatadas supervivientes.

3.4.2 Establecimiento *in vivo* de tubérculos irradiados

Los tubérculos que quedaron después de la extracción de explantes para cultivar *in vitro* se sembraron en recipientes de unicel con capacidad para dos litros utilizando un sustrato conformado por suelo, tierra de hojas y tezontle en una proporción de 1:1:1, y se distribuyeron en un diseño bloques al azar con cinco bloques y una repetición por bloque. Posteriormente se tomaron los datos de inicio de la brotación de tubérculos, fin de la brotación de tubérculos y porcentaje de bulbos que brotaron por tubérculos por dosis de radiación. Al terminar la

brotación también se midieron las variables número de brotes por maceta, número de hojas por brote, largo y ancho de hojas. A los cuatro meses de la siembra se tomaron nuevamente los datos de las variables largo y ancho de hojas, un mes después se contó el número de plantas supervivientes.

Los tubérculos se fertilizaron con 2 a 3 g del mismo fertilizante que se utilizó en los brotes de nardo aclimatados; al quinto mes se adicionó de 4 a 5 g de Sulfato de magnesio[®] al fertilizante. Todos los nardos recibieron un ataque severo por araña roja (*Tetranychus urticae* Koch), que se controló con aplicaciones de Supresor[®] (Naleb 58 %) (1.25 mL L⁻¹), Talstar 100 CE[®] (Bifentrina 12.15 %) (0.4 mL L⁻¹) y Avalanch[®] (Abamectina 1.80 %) (0.25 mL L⁻¹) por lo menos una vez cada 15 días, sin repetir el mismo insecticida acaricida dos veces seguidas para evitar aparición de resistencia.

3.4.3 Análisis estadístico

En todas las evaluaciones se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con el procedimiento PROC GLM y prueba de comparación de medias de Tukey con el procedimiento Tukey lines utilizando el programa SAS versión 9 (SAS 2004). Con el número de plantas de nardo sobrevivientes se obtuvieron los porcentajes de supervivencia y se realizaron pruebas de regresión lineal. Además se calculó el error estándar y coeficientes de variación con el comando Distribution del menú Analyze del programa JMP versión 8 (SAS 2008).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Pruebas de radiosensibilidad

4.1.1 Establecimiento *in vitro* de explantes irradiados de nardo e *in vivo* de tubérculos irradiados

Todas las variables evaluadas en las plántulas *in vitro* derivadas de tubérculos irradiados presentaron diferencias estadísticas significativas (Brotación P=0.0001, Contaminación P=□ .0001 y Altura P=□ .0001) por lo que se puede afirmar que las diferentes dosis de radiación empleadas influyeron en la brotación y desarrollo de las plántulas. La

brotación inició a los tres días de la siembra *in vitro* y terminó a los siete días. La dosis de radiación gamma de 5 Gy presentó una brotación igual a la del tratamiento testigo (100 %) y esta variable disminuyó conforme se aumentó las dosis de radiación (Cuadro 2). Resultados similares fueron reportados para la regeneración *in vitro* de brotes adventicios a partir de secciones internodales de clavel, donde el desarrollo de brotes se redujo de 1.1 a 0.1 brotes por explante al aumentar las dosis de radiación gamma de 5 a 30 Gy en intervalos de 5 Gy (Jerzy y Zalewska 2000). La contaminación fue mayor en el tratamiento expuesto a la dosis de 5 Gy (85.3 %). Las plántulas expuestas a 5 y 10 Gy presentaron una altura superior (2.63 y 2.66 cm respectivamente) a la del tratamiento testigo (1.87 cm), probablemente por el efecto estimulante de bajas dosis de radiación (González *et al.* 2004). En ápices de henequén expuestos a dosis de radiación gamma ^{60}Co de 0 a 50 Gy con intervalos de 10 Gy, ninguno de los tratamientos expuestos a radiación pudo superar al testigo (3.5 brotes por explante) (González *et al.* 2007). Sin embargo, los brotes *in vitro* de las variedades de uva 3309, Helwani y Cabernet Franc expuestos a una dosis de radiación gamma de 7 Gy produjeron una longitud de brote (LB) (5.33, 4.11 y 7.46 cm) y número de hojas (NH) (14.66, 10.00 y 8.66) que superaron a los de los tratamientos testigo (5.03, 1.40 y 2.90 cm en LB y 8.33, 5.00 y 2.66 en NH) (Charbaji y Nabulsi 1999).

Cuadro 2. Desarrollo de plántulas *in vitro* derivadas de tubérculos de nardo irradiados con ^{60}Co .

Dosis (Gy)	Brotación (%)	Contaminación (%)	Altura de plántulas (cm) Media ± ES
0	100.0 a	62.0 abc	1.87 ± 0.33 ab
5	100.0 a	85.3 a	2.63 ± 0.29 a
10	96.3 a	70.3 ab	2.66 ± 0.23 a
15	92.7 a	33.3 bc	1.07 ± 0.21 b
20	66.7 b	26.0 c	1.07 ± 0.23 b
25	85.3 ab	37.0 bc	1.77 ± 0.28 ab
30	77.7 ab	44.3 bc	1.39 ± 0.24 b

Letras diferentes presentan diferencias significativas ($P \leq 0.05$). ES = Error estándar. n = 189.

En el caso de los tubérculos irradiados que se establecieron *in vivo*, sólo se presentaron diferencias estadísticas significativas en el largo y ancho de las hojas ($P \leq .0001$ y $P \leq .0001$, respectivamente). Al igual que en las plántulas *in vitro*, las plantas *in vivo* expuestas a una dosis de radiación gamma de 5 Gy presentaron un desarrollo muy similar a las del tratamiento

testigo y el desarrollo de las plantas pareció disminuir al aumentar las dosis de radiación (Cuadro 3). Resultados similares fueron observados en plantas de comino negro (*Nigella sativa* L) donde la altura de las plantas derivadas de semillas disminuyó de 54.86 ± 0.45 a 36.84 ± 0.29 cm con el incremento de la radiación gamma de 0 a 300 Gy en intervalos de 50 Gy (Kumar y Gupta 2007). La brotación de las plantas de nardo inició a los cinco días de la siembra y terminó a los dos meses de ésta.

Cuadro 3. Desarrollo vegetativo de plantas derivadas de tubérculos de nardo (*Polianthes tuberosa* L.) irradiados con ^{60}CO .

Dosis (Gy)	Brotación (%)	Largo de hojas (cm) Media \pm ES	Ancho de hojas (cm) Media \pm ES
0	60 a	17.76 ± 1.32 a	1.27 ± 0.02 a
5	100 a	19.07 ± 1.11 a	1.27 ± 0.02 a
10	100 a	11.56 ± 0.91 b	1.34 ± 0.04 a
15	100 a	13.92 ± 0.90 ab	1.22 ± 0.04 a
20	60 a	11.56 ± 0.87 b	1.19 ± 0.04 a
25	100 a	9.11 ± 1.08 b	1.13 ± 0.05 a
30	80 a	3.38 ± 0.77 c	0.86 ± 0.07 b

Letras diferentes presentan diferencias significativas ($P \leq 0.05$). ES = Error estándar. n = 35 para brotación y n = 312 para hojas.

Las diferencias estadísticas que se encontraron en los tubérculos establecidos *in vivo* después de la brotación se conservaron después de cuatro meses de cultivo (Cuadro 4). Por otra parte, los brotes que fueron aclimatados también presentaron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.01$) después de un periodo de cultivo igual al de los tubérculos establecidos *in vivo*. En los brotes aclimatados, la dosis que presentó una variación más elevada en las variables largo y ancho de hojas (51.37 y 26.80 CV, respectivamente) fue de 25 Gy (Cuadro 4), mientras que en los tubérculos establecidos *in vivo* la mayor variación en el largo de hojas (51.14 CV) se presentó en la dosis de 25 Gy, aunque la mayor variación en el ancho de hojas (25.56 CV) se presentó en la dosis de 5 Gy. Brotes *in vitro* de pera (*Pyrus communis* L.) irradiados con rayos gama (3.5 Gy) presentaron frecuencias de variación de 0.81 y 3.64 % en rasgos de la fruta para las variedades Doyenné d'Hiver y Passe Crassane en comparación con las plantas no irradiadas (Predieri y Zimmerman 2001). Al comparar la variación en las variables ya mencionadas entre los tratamientos testigo, muestran que los brotes aclimatados (31.76 y 26.04 CV) presentan mayor variación que los tubérculos establecidos *in vivo* (27.12 y 18.93 CV); sin embargo, esto tal vez se debe a que no todos los

brotos desarrollaron raíces antes de ser aclimatados, por lo que no presentaron un desarrollo uniforme en el sustrato. En un caso opuesto el cultivo *in vitro* redujo la variación en el desarrollo de plantas silvestres de *Yucca valida* Brandegee de 39.46 a 9.11 CV (Arce-Montoya *et al.* 2006).

Cuadro 4. Desarrollo vegetativo de plantas derivadas de brotes *in vitro* y tubérculos de nardo (*Polianthes tuberosa* L.) irradiados con ^{60}CO después de cuatro meses.

Dosis (Gy)	Brotos aclimatados de nardo			
	Largo de hoja (cm)		Ancho de hoja (cm)	
	Media \pm ES	CV	Media \pm ES	CV
0	15.83 \pm 0.89 a	31.76	1.39 \pm 0.06 a	26.04
5	12.44 \pm 0.69 ab	42.82	1.27 \pm 0.04 ab	25.60
10	10.22 \pm 0.78 bcd	38.06	1.04 \pm 0.03 bc	17.72
15	9.13 \pm 0.67 bcd	29.36	1.07 \pm 0.04 bc	15.17
20	8.70 \pm 0.55 cd	39.34	0.93 \pm 0.04 c	24.91
25	7.77 \pm 1.15 d	51.37	0.90 \pm 0.07 c	26.80
30	12.16 \pm 0.63 abc	33.07	1.12 \pm 0.04 bc	21.86

	Tubérculos de nardo establecidos <i>in vivo</i>			
	Largo de hojas (cm)		Ancho de hojas (cm)	
	Media \pm ES	CV	Media \pm ES	CV
0	28.85 \pm 0.94 a	27.12	1.43 \pm 0.03 abc	18.93
5	26.63 \pm 0.92 a	32.24	1.48 \pm 0.04 ab	25.56
10	27.38 \pm 1.04 a	31.00	1.56 \pm 0.03 a	16.70
15	23.54 \pm 0.62 ab	28.13	1.49 \pm 0.03 ab	24.54
20	16.84 \pm 0.86 bc	38.06	1.32 \pm 0.04 abc	22.09
25	12.53 \pm 0.90 cd	51.14	1.08 \pm 0.03 c	21.76
30	3.75 \pm 1.25 d	47.14	1.15 \pm 0.05 bc	6.14

Letras diferentes presentan diferencias significativas ($P \leq 0.05$). ES = Error estándar. CV = Coeficiente de variación. n = 224 para hojas de brotes aclimatados. n = 446 para hojas de tubérculo.

En los brotes aclimatados los valores promedio de las variables estudiadas disminuyeron conforme aumentaban las dosis de radiación; sin embargo, los brotes expuestos a 30 Gy presentaron hojas con un largo y ancho (12.16 ± 0.63 y 1.12 ± 0.04 cm) comparable con los obtenidos con las dosis de 5 y 10 Gy (12.44 ± 0.69 y 1.27 ± 0.04 , y 10.22 ± 0.78 y 1.04 ± 0.03 cm respectivamente); mientras que, en los tubérculos establecidos *in vivo* las dosis de 5, 10 y 15 Gy presentaron hojas más anchas (1.48 ± 0.04 , 1.56 ± 0.03 y 1.49 ± 0.03 cm) que las del testigo (1.43 ± 0.03 cm), resultado similar al obtenido en plantas de cacahuate

germinadas a partir de embriones somáticos desarrollados en callos embriogénicos irradiados de las variedades Co. 5 y Co. 7, que presentaron en las dosis de 10, 20 y 30 Gy una altura en condiciones de campo (37.2, 38.5 y 45.2 cm para Co. 5 y 37.4, 39.4 y 40.4 cm para Co. 7) superiores a los de los tratamientos testigo (35.8 y 36.4 cm) (Muthusamy *et al.* 2007).

Aunque los brotes aclimatados generaron algunas plantas muy vigorosas con la dosis de 30 Gy, éstos presentaron una LD₅₀ de 9.09 Gy obtenida con la formula de regresión $y = 101.41 - 7.3529x + 0.1869x^2$ (Figura 1), un resultado similar se presento en callos irradiados de papa de la variedad Desirée donde se obtuvo una LD₅₀ de 12.51 Gy (Veitía *et al.* 2007). En el caso de los tubérculos establecidos *in vivo* se obtuvo una LD₅₀ de 25.91 Gy con la formula de regresión $y = 93.81 + 3x - 0.181x^2$ (Figura 2), resultado cercano a la dosis con la que se alcanzo la mayor variación en el largo y ancho de las hojas (25 Gy) y mayor al conseguido en un trabajo previo en *Polianthes tuberosa* L., donde se calculó una DL₅₀ de 23.8 Gy (Escalante 2003) y menor a la de otras plantas como el henequén donde se presento una DL₅₀ de 30 Gy (González *et al.* 2007), o las DL₅₀ de 28 y 27 Gy calculadas para las variedades de aguacate Duke y Hass (Fuentes *et al.* 2004). En los tubérculos establecidos *in vivo* la dosis de 30 Gy fue letal después de cinco meses de cultivo.

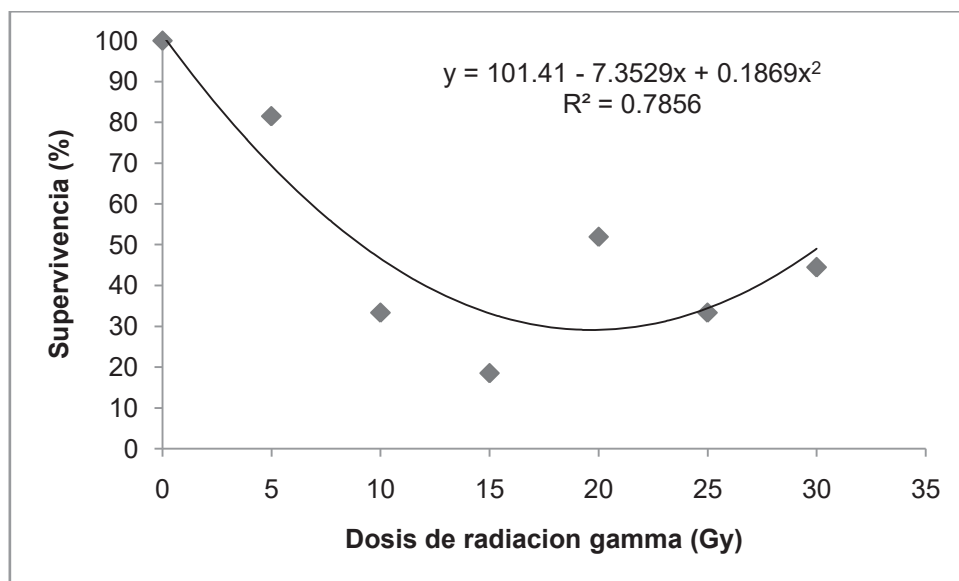


Figura 1. Efecto de rayos gamma ⁶⁰Co en la supervivencia de brotes después de cinco meses de ser aclimatados.

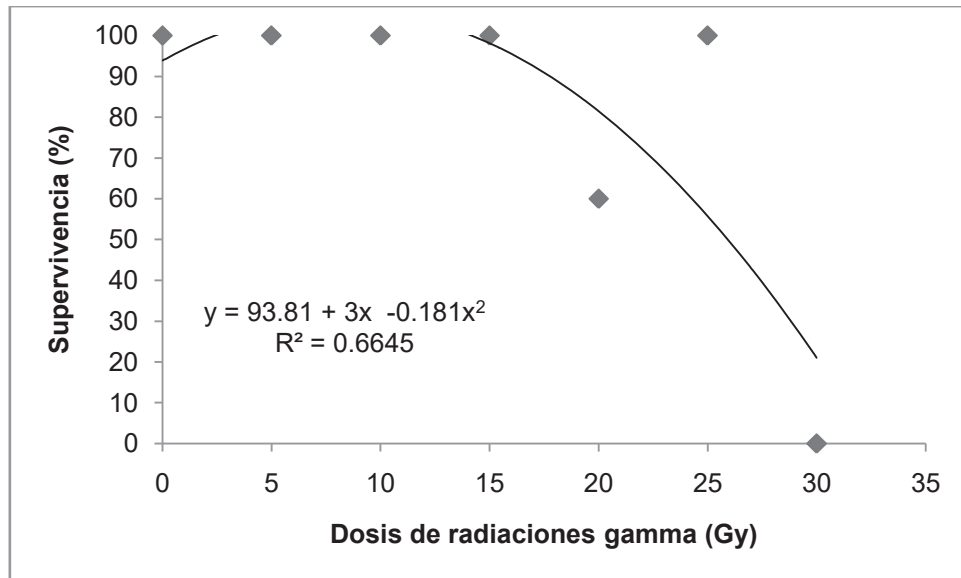


Figura 2. Efecto de rayos gamma ^{60}Co en la supervivencia de tubérculos establecidos *in vivo* después de cinco meses de cultivo.

En los materiales establecidos *in vivo*, las plantas expuestas a 30 Gy murieron porque los tubérculos de estas plantas no desarrollaron raíces; así que estas plantas sobrevivieron hasta que agotaron sus reservas. Por otra parte, también se presentaron deformaciones en las hojas (hojas torcidas o muy delgadas), brotes que surgían muy arrosados y brotes que se secaban repentinamente (Figura 3), a los 11 meses de la siembra de los tubérculos establecidos *in vivo* una planta expuesta a una dosis de 10 Gy empezó a desarrollar una inflorescencia, a las tres semanas de este hecho otra planta expuesta a 15 Gy también empezó a desarrollar una inflorescencia.

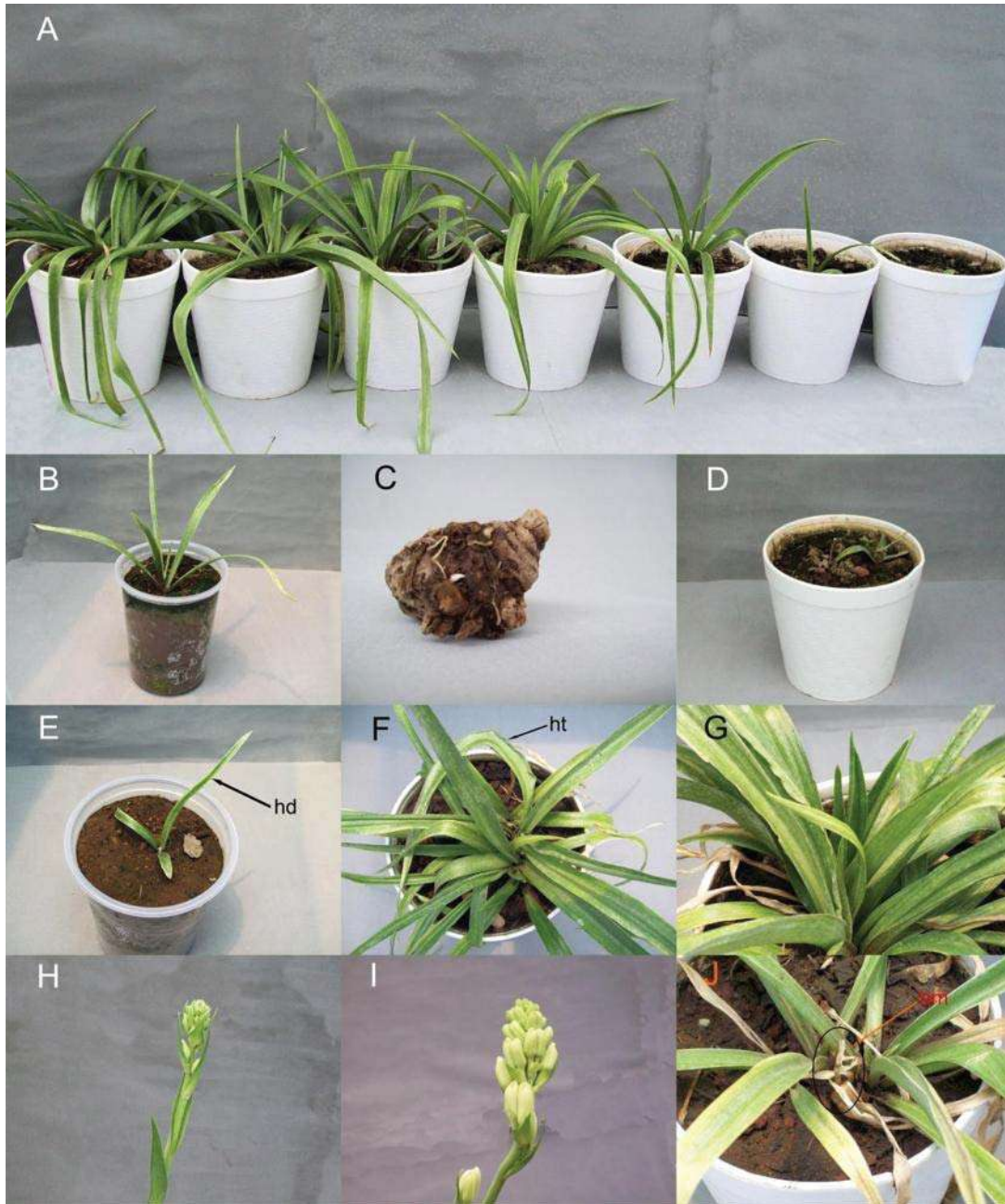


Figura 3. Efecto de las radiaciones gamma en plantas de nardo A) disminución del vigor de plantas de nardo al aumentar la dosis de radiación, B) brote aclimatado expuesto a 30 Gy, C) tubérculo de nardo necrosado de una planta expuesta a 30 Gy, D) planta expuesta a 30 Gy antes de morir, E) y F) brote aclimatado plantas in vivo con deformaciones en hojas, G) plantas arrosetadas, H) e I) inflorescencias que se desarrollaron en una plantas expuestas a 15 y 10 Gy respectivamente, J) planta con un brote muerto repentinamente, ht = hoja torcida, hd = hoja delgada y bm = brote muerto.

Plantas de tomate miniatura var. Micro-Tom expuestas a radiación gamma (300 Gy) presentaron plantas con hojas pálidas, otras con hojas y frutos de color verde amarillento similares a las plantas silvestres, o también con frutos de color rosa (Matsukura *et al.* 2007); por otra parte, plantas de comino negro (*Nigella sativa* L.) presentaron flores con un pétalo extra (Kumar y Gupta 2007).

V. CONCLUSIONES

1. Al aumentar la dosis de radiación disminuye el desarrollo de las plantas de nardo, tanto en plantas desarrolladas a partir de brotes aclimatados como en las desarrolladas a partir de tubérculos establecidos *in vivo*.

2. Las plantas irradiadas presentan una mayor variación en el largo y ancho de hojas que las plantas no irradiadas.

3. La LD₅₀ de las plantas desarrolladas a partir de brotes aclimatados (9.09 Gy) fue menor a la LD₅₀ de plantas desarrolladas a partir de tubérculos establecidos *in vivo* (25.91 Gy).

4. La dosis de radiación de 30 Gy fue letal para las plantas desarrolladas a partir de tubérculos establecidos *in vivo*.

VI. LITERATURA CITADA

- Ahloowalia, B. S. and M. Maluszynski. 2001. **Induced mutations – A new paradigm in plant breeding.** *Euphytica* 118: 167-173.
- Arce-Montoya, M., M. Rodríguez-Álvarez, J. A. Hernández-González and M. L. Robert. 2006. **Micropropagation and field performance of *Yucca valida*.** *Plant Cell Reports* 25: 777-783.
- Charbaji, T., and I. Nabulsi. 1999. **Effect of low doses of gamma irradiation on *in vitro* growth of grapevine.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 57: 129-132.
- Escalante P., C. 2003. **Inducción de variabilidad genética en nardo (*Polianthes tuberosa* L.) con raios gamma de ⁶⁰Co.** Tesis de Licenciatura, Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo México. 51p.

- Fuentes, J. L., L. Santiago, Y. Valdés, M. Guerra, I. M. Ramírez, E. F. Prieto, N. N. Rodríguez and B. Velázquez. 2004. **Mutation induction in zygotic embryos of avocado (*Persea americana* Mill).** *Biotechnología Aplicada* 21 (2): 82-84.
- García R., L., P. Orellana P., L. García R., J. N. Pérez P., N. Veitía R., I. Bermúdez C., J. Clavero G. y C. Romero Q. 2001. **Empleo de la mutagénesis en la mejora al grosor del tallo del somaclón IBP 89-169 de caña de azúcar.** *Biotechnología Vegetal* 1 (2): 71-75.
- González L. M., R. Ramírez, L. Licea, E. Porra y B. García. 2004. **Acción estimulante de las dosis bajas de rayos X en plantas *Lactuca sativa*.** *Universidad y Ciencia* 20 (39): 1-6.
- González O., G., S. Alemán G., M. Garriga, R. Ortiz and C. de la Fe. 2007. **Radiosensitivity to gamma rays (^{60}Co) in shoot tips of henequen.** *Biotechnología Vegetal* 7 (2): 115-117.
- Jerzy, M. and M. Zalewska. 2000. **Effect of X and gamma rays on *in vitro* adventitious bud production of pot carnation (*Dianthus gratianopolitanus* Vill.).** *Revista Chapingo Serie Horticultura* 6 (1): 49-52.
- Kulkarni, V. M., T. R. Ganapathi, P. Suprasanna and V. A. Bapat. 2007. ***In vitro* mutagenesis in banana (*Musa spp.*) using gamma irradiation.** En: Jain, S. M. and H. Häggman (eds.) **Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits.** Springer. pp. 534-559.
- Kumar, G. and P. Gupta. 2007. **Mutagenic efficiency of lower doses of gamma rays in black cumin (*Nigella sativa* L.).** *Cytologia* 72 (4): 435-440.
- Luan, Y., J. Zhang, X. Gao and L. An. 2007. **Mutation induced by ethylmethanesulphonate (EMS), *in vitro* screening for salt tolerance and plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.).** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 88: 77-81.
- Matsukura, C., I. Yamaguchi, M. Inamura, Y. Ban, Y. Kobayashi, Y. Yin, T. Saito, C. Kuwata, S. Imanishi and S. Nishimura. 2007. **Generation of gamma irradiation-induced mutant lines of the miniature tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar 'Micro-Tom'.** *Plant Biotechnology* 24: 39-44.
- Murashige T and Skoog F. 1962. **A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture.** *Physiologia Plantarum* 15:473-497.

- Muthusamy, A., K. Vasanth, D. Sivasankari, B. R. Chandrasekar and N. Jayabalan. 2007. **Effects of mutagens on somatic embryogenesis and plant regeneration in groundnut.** *Biologia Plantarum* 51 (3): 430-435.
- Parry, M. A. J., P. J. Madgwick, C. Bayon, K. Tearall, A. Hernández-López, M. Baudo, M. Rakszegi, W. Hamada, A. Al-Yassin, H. Ouabbou, M. Labhilili and A. L. Phillips. 2009. **Mutation discovery for crop improvement.** *Journal of Experimental Botany* 60 (10): 2817-2825.
- Predieri, S. and R. H. Zimmerman. 2001. **Pear mutagenesis: *In vitro* treatment with gamma-rays and field selection for productivity and fruit traits.** *Euphytica* 117: 217-227.
- SAS Institute. 2004. **SAS/STAT User's Guide.** Release 9 Edition. Cary, NC. USA.
- SAS Institute. 2008. **JMP User's Guide.** Release 8 Edition. Cary, NC. USA.
- Shillo, R. 1992. **The Cuber Community Holds the Answer to Flowering Problems in Polianthes Tuberosa.** *Acta Horticulture* 325: 139-364.
- Toker, C., S. S. Yadav and I. S. Solanki. 2007. **Mutation breeding.** En: S. S. Yadav et al. (eds.) **Lentil: An ancient crop for modern times.** Springer. pp. 209-224.
- Van Harten, A. M. 1998. **Mutation breeding: theory and practical applications.** Cambridge University Press, Cambridge, UK. 353 pp.
- Veitía, N., L. R. García, I. Bermúdez-Caraballoso, P. Orellana, Y. Padrón y D. Torres. 2007. **Efecto de las radiaciones gamma sobre callos de papa var. 'Desirée'.** *Biotechnología Vegetal* 7 (1): 57-61.
- Watanabe, S., T. Mizoguchi, K. Aoki, Y. Kubo, H. Mori, S. Imanishi, Y. Yamazaki, D. Shibata and H. Ezura. 2007. **Ethylmethanesulfonate (EMS) mutagenesis of *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom for large-scale mutant screens.** *Plant Biotechnology* 24: 33-38.

DISCUSIÓN GENERAL

La contaminación causada por diversos tipos de microorganismos (hongos, levaduras, bacterias, fitoplasmas y virus) es uno de los principales problemas que se presentan cuando se tratan de establecer plantas *in vitro*, porque el ambiente generado para crecer los explantes – medio de cultivo – condiciones físicas de incubación es altamente propicio para el desarrollo de estos microorganismos capaces de destruir los cultivos *in vitro* (Mroginski *et al.* 2004). La identificación de los hongos contaminantes presentes en las plantas donadoras y explantes contaminados permite diseñar estrategias de control adecuadas (Acosta-Suárez *et al.* 2008).

En el caso del nardo (*Polianthes tuberosa* L.) se identificaron como agentes contaminantes durante el establecimiento *in vitro* a los hongos del genero *Fusarium* sp. y *Rhizopus* sp. por lo que, se utilizaron los fungicidas Tecto 60[®], Swicht[®] y Cercobin M[®] en la fase de desinfección durante el establecimiento *in vitro*; debido a que, estos fungicidas inhibieron el desarrollo del micelio de estos hongos durante los bioensayos realizados para su control. Estos fungicidas también se aplicaron en las plantas donadoras de explantes que estuvieron establecidas bajo condiciones de invernadero en un sistema hidropónico. El empleo de explantes que proceden de plantas expuestas a bajos niveles de patógenos pueden reducir o incluso resolver el problema de la contaminación por hongos y bacterias durante el establecimiento del cultivo *in vitro* (Olmos *et al.* 2004).

En otras investigaciones se logró el control *in vitro* de hongos como *Fusarium oxysporum* Schlechtend f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen con extractos de clavo (*Syzygium aromatum*) y gobernadora (*Larrea tridentata*) al 5 % (López-Benítez *et al.* 2005); mientras que, el control *in vitro* de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. se logró con 2 mg ml⁻¹ de quitosano (Hernández-Lauzardo *et al.* 2007); por otra parte, también se han utilizado mezclas de los fungicidas Carboxim-Tiram, Tolclofós metil, PCNB, Carbendazim, Fosetil-Al-Folped y Pencycuron para el control de ambos géneros de hongos en semillas de cacahuate con dosis que van desde los 200 a los 400 g por cada 100 kg de semillas (Cavallo *et al.* 2005).

Después de identificar los agentes causales de la contaminación en el establecimiento *in vitro* del nardo y de realizar los bioensayos correspondientes para su control, se intentó obtener una respuesta organogénica en bulbos de nardo de los que se lograron obtener brotes; sin embargo, los resultados no mostraron diferencias estadísticas significativas entre las

concentraciones de sales del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) (MS) ni entre las dosis de benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA) empleadas. Hay que tomar en cuenta que en otras plantas como *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl se obtuvieron diferencias estadísticas significativas en el desarrollo de raíces en semillas germinadas en medios de cultivo con concentraciones de las sales MS de 50 % (7.6 mm) y 100 % (19.4 mm) (Flores *et al.* 2008); por otra parte, la combinación de auxinas con diferentes citocininas podría ser muy útil para el cultivo *in vitro* del nardo debido a que en otras plantas como *Curcuma longa* L. cv elite fue posible obtener 6.3 brotes por explante con 1 μ M de ANA y 10 μ M de metatopolin N6-(hidroxibencil) adenina (m-T) aunque la mayor longitud de brotes se obtuvo con las combinaciones de 1 μ M de ANA y Kinetina (14.3 cm) o adenina (12.7 cm) (ambas con 10 μ M) (Salvi *et al.* 2002). En cuanto a la respuesta embriogénica, tanto los botones florales como los pétalos de nardo respondieron a las diferentes concentraciones de ácido 2,4-diclorofenixiacético (2,4-D); sin embargo, los botones florales desarrollaron callos un mes antes que los pétalos.

Los rayos gamma ^{60}Co son capaces de destruir gérmenes por lo que se les utiliza en la esterilización de productos sensibles al calor y al vapor como los productos médicos (Brandan *et al.* 2003). En el caso de los bulbos de nardo cultivados *in vitro* aparentemente esta capacidad germicida de las radiaciones redujo la contaminación al aumentar las dosis de radiación. La LD₅₀ de las plantas aclimatadas (9.09 Gy) fue menor que la LD₅₀ de los tubérculos establecidos *in vivo* (25.91 Gy). Sin embargo, hay que tomar en cuenta que la contaminación *in vitro* puede causar la muerte de suficientes explantes como para alterar significativamente la supervivencia de los brotes aclimatados, lo que explica porque hay plantas aclimatadas muy vigorosas en la dosis de 30 Gy. La dosis de 30 Gy fue letal para las plantas desarrolladas a partir de tubérculos establecidos *in vivo*.

RECOMENDACIONES

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo de investigación se presentan las siguientes recomendaciones para futuras investigaciones.

1. Realizar una caracterización morfológica y molecular de las plantas irradiadas.
2. Realizar análisis del crecimiento y fenología floral de las plantas irradiadas.
3. Identificar a los agentes contaminantes hasta el nivel de especie y probar un rango más amplio de productos para su control.
4. Probar otros reguladores del crecimiento y dosis más altas de estos, así como diferentes medios de cultivo.
5. Realizar cruces entre plantas mutadas y con variedades elite de nardo para generar nuevas variedades, además de probar otros agentes mutagénicos y realizar análisis genéticos de poblaciones mutadas.

BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

- Abraham, V. and B.M. Desai. 1976. **Radiation induced mutant in tuberose. Indian Journal of Genetics. Plant Breeding** 36 (3): 328-331.
- Acosta-Suárez, M., Y. Alvarado-Capó, M. Cruz-Martín, B. Roque, C. Sánchez-García, M. Leiva-Mora, M. Freire-Seijo, Y. García-Ramírez, Z. Pérez, T. Salabarría, M. Tejada, M. González y O. Hurtado. 2008. **Micobiota de plantas donadoras y contaminantes fúngicos del establecimiento *in vitro* de especies de bambúes. Biotecnología Vegetal.** 8 (1): 57-61.
- Ahloowalia, B. 1995. **Induced mutation and molecular techniques for crop improvement (*in vitro* mutagenesis for the improvement of vegetatively propagated plants).** IAEA. Austria. 531-541.
- Arce-Montoya, M., M. Rodríguez-Álvarez, J.A. Hernández-González and M.L. Robert. 2006. **Micropropagation and field performance of *Yucca valida*. Plant Cell Reports** 25: 777-783.
- Brandan, M. E., R. Díaz P. y P. Ostrosky. 2003. **La radiación al servicio de la vida.** 3a ed. La ciencia para todos 99. Fondo de cultura económica. México. 128 pp.
- Camino, L., G. V. Castrejo, B. R. Figueroa, LL. L. Aldama, E. M. E Valdez, y R. C. Hernandez. 2001. **Identificación y estimación del daño causado por el picudo negro en el nardo (*Polianthes tuberosa* L.)**- IX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Hortícolas 2001, Vol. 8 No 3. 262 p.
- Cavallo, A. R., R. J. Novo y M. A. Pérez. 2005. **Eficiencia de fungicidas en el control de la flora fúngica transportada por semillas de maní (*Arachis hypogaea* L.) en la Argentina. Agriscientia** 22 (1): 9-16.
- Escalante P., C. 2003. **Inducción de variabilidad genética en nardo (*Polianthes tuberosa* L.) con rayos gamma de ⁶⁰Co.** Tesis de Licenciatura, Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo México. 51p.
- Flores G., A., J. G. Álvarez M., J. L. Rodríguez O. y A. Corona A. 2008. **Germinación *in vitro* de semillas de *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl. Foresta Veracruzana** 10 (2): 27-33.
- Gonzatti, C. 1981. **Flora Taxonómica Mexicana** II Ed CENEI. Guadalajara, México. 87-88p.
- Hernández-Lauzardo, A. N., M. Hernández-Martínez, M. G. Velázquez-del Valle, M. G. Guerra-Sánchez y G. E. Melo-Giorgana. 2007. **Actividad antifúngica del Quitosano**

- en el control de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. y *Mucor spp.* *Revista Mexicana de Fitopatología* 25 (2): 109-113.
- López-Benítez, A., S. R. López-Betancourt, M. E. Vázquez-Badillo, S. A. Rodríguez-Herrera, M. Mendoza-Elos y E. Padrón-Corral. 2005. **Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Verticillium dahliae* Kleb. Mediante extractos vegetales acuosos.** *Revista Mexicana de Fitopatología* 23(2): 183-190.
- Martínez-Palacios, A., M. P. Ortega-Larrocea, V. M. Chavez and R. Bey. 2003. **Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoria-reginae*: Consideration for its conservation.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 135-142.
- Mroginski, L., P. Sansberro y E. Flaschland. 2004. **Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales.** En: Echonique, V., C. Rubinsten y L. Mroginski (Eds.) **Biología y mejoramiento vegetal.** Parte II. Capítulo 2. Ediciones INTA. Buenos Aires, Argentina. P 37.
- Murashige T and Skoog F. 1962. **A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture.** *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Obledo-Vázquez, E.N., N. Flores-Verduzco y J. Cervantes-Martínez. 2004. **Detección del efecto de un extracto vegetal antimicrobiano sobre plantas de agave (*Agave tequilana* Weber var *azul*) cultivadas *in vitro* utilizando fluorescencia inducida por láser (LIF).** *Revista Mexicana de Fitopatología* 22 (3): 328-332.
- Olmos, S., G. Luciani y E. Galdeano. 2004. **Micropropagación.** En: Echonique, V., C. Rubinsten y L. Mroginski (Eds.) **Biología y mejoramiento vegetal.** Parte V. Capítulo 1. Ediciones INTA. Buenos Aires, Argentina. P 163.
- Otsuji, K., Y. Honda, Y. Sugimura and A. Takei. 1994. **Production of polysaccharides in liquid cultures of *Polianthes tuberosa* cells.** *Biotechnology Letters* 16 (9): 943-948.
- Rocha, M., S. V. Good-Avila, F. Molina-Freaner, H. T. Arita, A. Castillo, A. Garcia-Mendoza, A. Silva-Montellano, B. S. Gaut, V. Souza, and L. L. Eguiarte. 2006. **Pollination biology and adaptive radiation of Agavaceae, with special emphasis on the genus *Agave*.** *Aliso* 22: 329-344.

- Salvi, N. D., L. George and S. Eapen. 2002. **Micropropagation and field evaluation of micropropagated plants of turmeric.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 143-151.
- Sangavai, C., and Chellapandi P. 2008. ***In vitro* propagation of a tuberose plant (*Polianthes tuberosa* L.).** *Electronic Journal of Biology* 4 (3): 98-101.
- Shillo, R. 1992. **The cuber community holds the answer to flowering problems in *Polianthes tuberosa*.** *Acta Horticulturae* 325: 139-364.
- Toker, C., S. S. Yadav and I. S. Solanki. 2007. **Mutation breeding.** En: S. S. Yadav et al. (eds.) **Lentil: An ancient crop for modern times.** Springer. pp. 209-224.
- Van Harten, A. M. 1998. **Mutation breeding: theory and practical applications.** Cambridge University Press, Cambridge, UK. 353 pp.
- Younis , S. E., and J. H. Borham. 1975. **The effects of gamma irradiation on *Polianthes tuberosa*.** *Egyptian Journal of Botany* 217 p.

APÉNDICE

Cuadro 1A. *Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento in vitro de Fusarium sp. al segundo día de establecido el experimento.*

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	4	0.67	0.167	12.88	<.0001
Error	18	0.23	0.013		

Cuadro 2A. *Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento in vitro de Fusarium sp. al tercer día de establecido el experimento.*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	4	1.61	0.403	31.13	<.0001
Error	18	0.23	0.013		

Cuadro 3A. *Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento in vitro de Fusarium sp. al cuarto día de establecido el experimento.*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	4	4.49	1.121	36.63	<.0001
Error	18	0.55	0.031		

Cuadro 4A. *Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento in vitro de Fusarium sp. al quinto día de establecido el experimento.*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	4	7.48	1.871	25.92	<.0001
Error	18	1.30	0.072		

Cuadro 5A. *Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento in vitro de Fusarium sp. al sexto día de establecido el experimento.*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	4	11.22	2.806	21.02	<.0001
Error	18	2.40	1.335		

Cuadro 6A. Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento *in vitro* de *Fusarium sp.* al séptimo día de establecido el experimento.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	4	21.60	5.400	21.26	<.0001
Error	18	4.57	0.254		

Cuadro 7A. Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento *in vitro* de *Fusarium sp.* al octavo día de establecido el experimento.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	4	32.15	8.036	30.56	<.0001
Error	18	4.73	0.263		

Cuadro 8A Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento *in vitro* de *Fusarium sp.* al noveno día de establecido el experimento.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	4	34.42	8.606	27.22	<.0001
Error	18	5.69	0.316		

Cuadro 9A. Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento *in vitro* de *Rhizopus sp.* al segundo día de establecido el experimento.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	4	6.05	1.511	19.6	<.0001
Error	18	1.39	0.077		

Cuadro 10A. Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento *in vitro* de *Rhizopus sp.* al tercer día de establecido el experimento.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	4	6.45	1.612	17.14	<.0001
Error	18	1.69	0.094		

Cuadro 11A. Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento *in vitro* de *Rhizopus sp.* al cuarto día de establecido el experimento.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	4	10.74	2.685	55.1	<.0001
Error	18	0.88	0.049		

Cuadro 12A. Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento *in vitro* de *Rhizopus sp.* al quinto día de establecido el experimento.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	4	19.25	4.812	32.39	<.0001
Error	18	2.67	0.149		

Cuadro 13A. Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento *in vitro* de *Rhizopus sp.* al sexto día de establecido el experimento.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	4	24.53	6.132	31.67	<.0001
Error	18	3.49	0.194		

Cuadro 14A. Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento *in vitro* de *Rhizopus sp.* al séptimo día de establecido el experimento.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	4	36.73	9.182	147.21	<.0001
Error	18	1.12	0.062		

Cuadro 15A. Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento *in vitro* de *Rhizopus sp.* al octavo día de establecido el experimento.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	4	36.23	9.057	132.6	<.0001
Error	18	1.23	0.068		

Cuadro 16A. Análisis de varianza para el efecto del tipo de fungicida sobre el crecimiento in vitro de *Rhizopus sp.* al noveno día de establecido el experimento.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	4	34.12	8.531	78.79	<.0001
Error	18	1.95	0.108		

Cuadro 17A. Análisis de varianza para el efecto de la concentración de sales del medio MS en el desarrollo de brotes de nardo.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	1	1.16	1.156	0.15	0.7063
Error	13	101.30	7.792		

Cuadro 18A. Análisis de varianza para el efecto de de diferentes concentraciones de BA y ANA en el número de raíces desarrolladas a partir de bulbos de nardo.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	5	37.78	7.557	1.50	0.2341
Error	20	100.72	5.036		

Cuadro 19A. Análisis de varianza para el efecto de de diferentes concentraciones de BA y ANA en la longitud de raíces desarrolladas a partir de bulbos de nardo.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	5	0.28	0.056	1.55	0.2190
Error	20	0.73	0.036		

Cuadro 20A. Análisis de varianza para el efecto de de diferentes concentraciones de BA y ANA en el número de brotes nuevos desarrollados a partir de bulbos de nardo.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	5	0.79	0.158	0.97	0.4594
Error	20	3.25	0.163		

Cuadro 21A. Análisis de varianza para el efecto de de diferentes concentraciones de BA y ANA en la longitud de brotes nuevos desarrollados a partir de bulbos de nardo.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	5	0.40	0.080	1.00	0.4436
Error	20	1.60	0.080		

Cuadro 22A. Análisis de varianza para el efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D en el número de explantes de botón floral de nardo con respuesta.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	4	4.13	1.033	11.92	□.0001
Error	25	2.17	0.087		

Cuadro 23A. Análisis de varianza para el efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D en el número de explantes botón floral de nardo necrosados.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	4	2.20	0.550	3.75	0.0160
Error	25	3.67	0.147		

Cuadro 24A. Análisis de varianza para el efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D en el diámetro de callos desarrollados a partir de botones florales de nardo.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	4	9.08	2.270	11.67	□.0001
Error	25	4.86	0.195		

Cuadro 25A. Análisis de varianza para el efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D en el número se explantes de pétalo de nardo con respuesta.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	4	9.83	2.457	3.49	0.0188
Error	30	21.14	0.705		

Cuadro 26A. *Análisis de varianza para el efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D en el número de masas por explante de pétalo de nardo.*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	4	293.40	73.350	1.92	0.1333
Error	30	1147.50	38.250		

Cuadro 27A. *Análisis de varianza para el efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D en el peso fresco de masas desarrolladas a partir de pétalos de nardo.*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	4	1.59	0.398	1.28	0.1406
Error	30	9.32	0.310		

Cuadro 28A. *Análisis de varianza para el efecto de la combinación de diferentes concentraciones 2,4-D y BA en el diámetro de masas proembriogénicas de nardo.*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	8	16.44	2.055	1.52	0.1995
Error	25	33.73	1.349		

Cuadro 29A. *Análisis de varianza para el efecto de la combinación de diferentes concentraciones 2,4-D y BA en el número de masas proembriogénicas con raíces de nardo.*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	8	2923.45	365.431	9.03	□.0001
Error	25	1012.08	40.483		

Cuadro 30A. *Análisis de varianza para el efecto de la combinación de diferentes concentraciones 2,4-D y BA en el número de masas proembriogénicas necrosadas de nardo.*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	8	2787.10	348.387	44.74	□.0001
Error	25	194.67	7.787		

Cuadro 31A. *Análisis de varianza para el efecto de la combinación de diferentes concentraciones 2,4-D y BA en el número de masas proembriogénicas verdes de nardo.*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	8	1321.08	165.135	14.19	□.0001
Error	25	290.92	11.637		

Cuadro 32A. *Análisis de varianza para el efecto de la combinación de diferentes concentraciones 2,4-D y BA en el peso de masas proembriogénicas de nardo.*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	8	9.84	1.23	0.66	0.7184
Error	25	46.39	1.86		

Cuadro 33A. *Análisis de varianza para el efecto de las dosis de radiación gamma ^{60}Co en la brotación in vitro de explantes de nardo.*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	6	7.65	1.275	5.64	0.0001
Error	56	12.67	0.226		

Cuadro 34A. *Análisis de varianza para el efecto de las dosis de radiación gamma ^{60}Co en la contaminación in vitro de explantes de nardo.*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	6	23.21	3.868	6.29	□.0001
Error	56	34.44	0.615		

Cuadro 35A. *Análisis de varianza para el efecto de las dosis de radiación gamma ^{60}Co en la altura de explantes de nardo in vitro.*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	6	72.04	12.01	6.55	□.0001
Error	182	333.76	1.83		

Cuadro 36A. *Análisis de varianza para el efecto de las dosis de radiación gamma ^{60}Co en la brotación in vivo de tubérculos de nardo.*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	10	1.66	0.166	1.51	0.1951
Error	24	2.63	0.110		

Cuadro 37A. *Análisis de varianza para el efecto de las dosis de radiación gamma ^{60}Co en el largo de hojas de plantas derivadas de tubérculos de nardo desarrollados in vivo después de brotar.*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	10	6531.12	653.112	10.89	<.0001
Error	301	18047.47	59.958		

Cuadro 38A. *Análisis de varianza para el efecto de las dosis de radiación gamma ^{60}Co en el ancho de hojas de plantas derivadas de tubérculos de nardo desarrollados in vivo después de brotar.*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	10	3.864	0.386	4.24	<.0001
Error	301	27.457	0.091		

Cuadro 39A. *Análisis de varianza para el efecto de las dosis de radiación gamma ^{60}Co en el largo de hoja de plantas aclimatadas de nardo después de cuatro meses de la aclimatación.*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	20	1528.13	76.406	3.96	<.0001
Error	203	3913.76	19.280		

Cuadro 40A. Análisis de varianza para el efecto de las dosis de radiación gamma ^{60}Co en el ancho de hoja de plantas aclimatadas de nardo después de cuatro meses de la aclimatación.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	20	6.54	0.327	4.24	<.0001
Error	203	15.65	0.077		

Cuadro 41A. Análisis de varianza para el efecto de las dosis de radiación gamma ^{60}Co en el largo de hojas de plantas desarrolladas a partir de tubérculos desarrollados in vivo después de cuatro meses de la siembra.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	10	14018.45	1401.845	25.68	<.0001
Error	435	23742.81	54.581		

Cuadro 42A. Análisis de varianza para el efecto de las dosis de radiación gamma ^{60}Co en el ancho de hojas de plantas desarrolladas a partir de tubérculos desarrollados in vivo después de cuatro meses de la siembra.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr>F
Tratamiento	10	10.34	1.034	10.53	<.0001
Error	435	42.73	0.098		