



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS

MEJORAMIENTO GENÉTICO POR MUTAGÉNESIS EN LA
ORQUÍDEA *Laelia autumnalis*

TESIS

Como requisito para obtener
el grado de Doctora en Ciencias Biológicas
en Conservación y Manejo de Recursos Naturales

Presenta:

M. C. SELENE HERNÁNDEZ MUÑOZ

Directora de Tesis

DRA. MARTHA ELENA PEDRAZA SANTOS

URUAPAN, MICHOACAN. AGOSTO DE 2018



ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE CUADROS DEL CAPÍTULO I.....	vi
ÍNDICE FIGURAS DEL CAPÍTULO II.....	vii
ÍNDICE DE CUADROS DEL CAPITULO III.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS DEL CAPÍTULO III.....	x
ÍNDICE DE CUADROS DEL CAPÍTULO IV.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS DEL CAPÍTULO IV.....	xi
INDICE DEL ÁPENDICE.....	xii
I. RESUMEN GENERAL.....	xiii
II. GENERAL ABSTRACT.....	xvi
III. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
IV. HIPÓTESIS.....	3
V. OBJETIVOS.....	4
VI. CAPÍTULO I. LA MUTAGÉNESIS EN EL MEJORAMIENTO DE PLANTAS ORNAMENTALES	6
Resumen.....	6
Abstract.....	8
Introducción.....	9
Importancia de las plantas ornamentales y su mejoramiento.....	10
Las mutaciones como fuente de variación.....	11
Agentes mutagénicos y su modo de acción.....	12
Mutágenos químicos.....	12

Mutágenos físicos.....	12
Radiación ionizante.....	13
Rayos gamma.....	13
Efecto de la radiación en las celulas vegetales.....	14
Radiosensibilidad y dosis letal media.....	15
Dosis letal media o dosis reductiva media.....	16
Radioinhibición.....	16
Radioestimulación.....	17
El cultivo <i>in vitro</i> en la mutagénesis.....	17
Mutación somaclonal.....	18
Identificación de mutantes.....	18
Variedades de plantas ornamentales generadas por mutagenésis.....	20
<i>Chrysanthemum</i>	22
<i>Rosa</i>	24
<i>Dahlia</i>	25
<i>Alstroemeria</i>	26
Plantas nativas de México mejoradas en el extranjero.....	27
Uso de la mutagénesis en México.....	29
Conclusiones.....	30
Literatura citada.....	31
VII. CAPÍTULO II. ESTIMULACIÓN DE LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO <i>in vitro</i> DE <i>Laelia autumnalis</i> CON RAYOS GAMMA.....	40
Resumen.....	40

Abstract.....	42
Introducción.....	43
Materiales y métodos.....	45
Irradiación con rayos gamma ⁶⁰ Co.....	45
Medio de cultivo.....	46
Establecimiento del cultivo aséptico.....	46
Variables evaluadas.....	47
Análisis estadístico.....	48
Resultados y discusión.....	48
Fenología de la germinación <i>in vitro</i> de semillas irradiadas de <i>L. autumnalis</i>	48
Efecto de la irradiación gamma ⁶⁰ Co sobre la germinación de semillas <i>in vitro</i>	52
Conclusiones.....	65
Literatura citada.....	65
VIII. CAPÍTULO III DETERMINACIÓN DE LA DL₅₀ Y GR₅₀ CON RAYOS GAMMA	
(⁶⁰ Co) EN PROTOCORMOS DE <i>Laelia autumnalis in vitro</i>	70
Resumen.....	70
Abstract.....	72
Introducción.....	73
Materiales y métodos.....	76
Material vegetal.....	77
Medio de cultivo.....	77
Establecimiento del cultivo aséptico.....	77
Irradiación con rayos gamma ⁶⁰ Co.....	78

Variables evaluadas en protocormos.....	78
Variables evaluadas en plántulas.....	79
Análisis estadístico.....	80
Resultados y discusión.....	80
Efecto de la radiación sobre el desarrollo de protocormos.....	80
Efecto de la radiación sobre el desarrollo de plántulas.....	85
Determinación de la DL ₅₀ y GR ₅₀	89
Conclusiones.....	93
Literatura citada.....	94
 IX. CAPÍTULO IV MUTAGENESIS <i>in vitro</i> EN SEMILLAS DE LA ORQUIDEA	
<i>Laelia autumnalis</i>	101
Resumen.....	101
Abstract.....	103
Introducción.....	105
Materiales y métodos.....	107
Material vegetal.....	107
Medio de cultivo.....	107
Prueba de germinación de semillas sin irradiar de <i>L. autumnalis</i>	107
Irradiación con rayos gamma ⁶⁰ Co.....	108
Prueba de tetrazolio.....	108
Establecimiento del cultivo aséptico.....	108
Variables evaluadas.....	109
Prueba de germinación de semillas sin irradiar.....	109

Viabilidad.....	109
Germinación de semillas irradiadas.....	109
Análisis estadístico.....	110
Resultados y discusión.....	110
Prueba de germinación de semillas sin irradiar de <i>L. autumnalis</i>	110
Efecto de la irradiación gamma sobre la viabilidad y germinación de semillas.....	111
Dosis letal media en semillas irradiadas.....	116
Curva de radiosensibilidad.....	116
Conclusiones.....	117
Literatura citada.....	118
X. DISCUSIÓN GENERAL.....	122
XI. CONCLUSIONES GENERALES.....	126
XII. LITERATURA CITADA COMPLEMENTARIA.....	127
XIII. APENDICE.....	130

ÍNDICE DE CUADROS DEL CAPÍTULO I

Cuadro		Página
1	Propiedades de los agentes mutágenicos físicos comúnmente usados.....	14
2	Géneros con variedades mutantes registradas en la base de datos de la Agencia Internacional de Energía Atómica.....	21
3	Variedades de <i>Chrysanthemum</i> registradas en la base de datos de la Agencia Internacional de Energía Atómica.....	23
4	Variedades de <i>Rosa</i> registradas en la base de datos de la Agencia Internacional de Energía Atómica.....	25
5	Variedades de <i>Dahlia</i> registradas en la base de datos de la Agencia Internacional de Energía Atómica.....	26
6	Variedades de <i>Alstroemeria</i> registradas en la base de datos de la Agencia Internacional de Energía Atómica.....	27

ÍNDICE DE FIGURAS DEL CAPÍTULO II

Figura	Página
1	Etapas fenológicas en la germinación de semillas de <i>Laelia autumnalis</i> A) imbibición, B) formación de protocormos fotosintéticos (FPF), C) protocormos en diferenciación (PD), D) desarrollo de promeristemas (DP), E) formación de hojas y F) formación de plántulas..... 49
2	Fenología de la germinación de semillas, formación de hojas y plántulas de <i>Laelia autumnalis</i> irradiadas con rayos gamma de 3 a 30 Gy y un testigo sin irradiar..... 51
3	Efecto de la irradiación gamma ^{60}Co sobre la imbibición <i>in vitro</i> de semillas de <i>L. autumnalis</i> . A) 5 días después de la siembra (dds), B) 10 dds, C) 20 dds y 30 dds y D) velocidad de imbibición de semillas..... 53
4	Efecto de la irradiación gamma ^{60}Co sobre la formación de protocormos fotosintéticos <i>in vitro</i> a partir de semillas de <i>L. autumnalis</i> . A) 10 días después de la siembra (dds), B) 20 dds, C) 30 dds y D) 40 dds, E) velocidad de formación de protocormos fotosintéticos..... 55
5	Efecto de la irradiación gamma ^{60}Co sobre la diferenciación de protocormos <i>in vitro</i> a partir de semillas de <i>L. autumnalis</i> . A) 30 días después de la siembra (dds), B) 40 dds, C) 50 dds y D) 60 dds, E) velocidad de formación de protocormos en diferenciación..... 57
6	Efecto de la irradiación gamma ^{60}Co sobre la formación de promeristemas <i>in vitro</i> a partir de semillas de <i>L. autumnalis</i> . A) 50 días después de la siembra (dds), B)

	60 dds, C) 70 dds y D) 80 dds, E) velocidad en la formación de promeristemas.....	59
7	Efecto de la irradiación gamma ^{60}Co sobre la formación de hojas en protocormos <i>in vitro</i> a partir de semillas de <i>L. autumnalis</i> . A) 60 días después de la siembra (dds), B) 70 dds, C) 80 dds y D) 90 dds, E) velocidad de formación de hojas en protocormos.....	61
8	Efecto de la irradiación gamma sobre la formación de plántulas <i>in vitro</i> a partir de semillas de <i>L. autumnalis</i> . A) 80 días después de la siembra (dds), B) 90 dds, C) 100 y D) 110 días después de la siembra, E) velocidad de formación de plántulas.....	64

ÍNDICE DE CUADROS DEL CAPÍTULO III

Cuadro		Página
1	Análisis de varianza para el efecto de la radiación gamma ^{60}Co en la supervivencia y desarrollo de protocormos de <i>Laelia autumnalis</i>	81
2	Correlación del efecto de la radiación gamma ^{60}Co sobre la supervivencia y desarrollo de protocormos de <i>Laelia autumnalis</i>	84
3	Análisis de varianza para el efecto de la radiación gamma ^{60}Co sobre el desarrollo de plántulas de <i>Laelia autumnalis</i>	85
4	Correlación del efecto de la radiación gamma ^{60}Co sobre el desarrollo de plántulas de <i>Laelia autumnalis</i>	91
5	Análisis de regresión para la supervivencia de protocormos y emergencia de hojas en protocormos de <i>Laelia autumnalis</i> irradiados con rayos gamma ^{60}Co	92

ÍNDICE DE FIGURAS DEL CAPÍTULO III

Figura		Página
1	Efecto de la radiación gamma ^{60}Co sobre la supervivencia y el desarrollo de protocormos de <i>Laelia autumnalis</i> , A) supervivencia de protocormos, B) protocormos fotosintéticos, C) materia fresca de protocormos, D) protocormos con promeristemas y E) protocormos con hojas.....	82
2	Efecto de la radiación gamma ^{60}Co sobre plántulas de <i>L. autumnalis</i> procedentes de protocormos irradiados con ^{60}Co , A) longitud, B) materia fresca, C) anchura de hojas, D) número de raíces y E) biomasa de plántulas.....	87
3	Plántulas de <i>L. autumnalis</i> procedentes de protocormos irradiados con rayos gama ^{60}Co (Gy) a diferentes dosis de radiación.....	88
4	Efecto de la radiación gamma ^{60}Co sobre protocormos de la orquídea <i>Laelia autumnalis</i> , A) porcentaje de supervivencia en protocormos y B) formación de hojas en protocormos.....	92

ÍNDICE DE CUADROS DEL CAPÍTULO IV

Cuadro	Página
1 Análisis de varianza sobre el efecto de la radiación gamma ^{60}Co en la supervivencia y germinación de semillas de <i>Laelia autumnalis</i>	111

ÍNDICE DE FIGURAS DEL CAPÍTULO IV

Figura	Página
1 Germinación <i>in vitro</i> de semillas de la orquídea <i>Laelia autumnalis</i> A) porcentaje de germinación y B) Porcentaje de germinación por etapas fisiológicas.....	110
2 Efecto de la irradiación gamma (^{60}Co) sobre la viabilidad y germinación de semillas de la orquídea <i>Laelia autumnalis</i> . A) porcentaje de semillas viables, B) porcentaje de supervivencia, C) porcentaje de semillas imbibidas y D) porcentaje de formación de protocormos.....	113
3 Viabilidad y germinación de semillas de <i>Laelia autumnalis</i> irradiadas con rayos gamma ^{60}Co . A) Genotipo a partir del cual se obtuvo semilla, B) semillas teñidas con tetrazolio, C) semillas imbibidas, D) formación de protocormos.....	114
4 Regresión del efecto de la radiación gamma ^{60}Co sobre la germinación de semillas de la orquídea <i>Laelia autumnalis</i> A) supervivencia y B) semillas imbibidas.....	115
5 Curva de radiosensibilidad de semillas de <i>Laelia autumnalis</i> proyectada con base en la ecuación de regresión lineal para la supervivencia de semillas.....	116

ÍNDICE DEL APÉNDICE

Portada del artículo Estimulación de la germinación y desarrollo <i>in vitro</i> de <i>Laelia autumnalis</i> con rayos gamma, publicado en la Revista Fitotecnia Mexicana.....	130
Portada del artículo Determinación de la DL ₅₀ y GR ₅₀ con rayos gamma (⁶⁰ Co) en protocormos de <i>Laelia autumnalis in vitro</i> , publicado en la Revista Agrociencia.....	131
Portada del artículo de divulgación Energía nuclear ¿benéfica para la agricultura, aceptado en la Revista Saber más.....	132

I. RESUMEN GENERAL

Laelia autumnalis es una orquídea silvestre con potencial ornamental por las atractivas características de sus flores. Sin embargo, es necesario inducir variabilidad de interés comercial en esta especie para generar variedades que cumplan con los estándares internacionales que demanda el mercado. Un método eficaz para generar variedades en los cultivos ornamentales es la mutagénesis que además se encuentra libre de restricciones y regulaciones impuestas a los organismos genéticamente regulados. Por lo anterior se planteó como objetivo general estudiar el efecto de la irradiación con rayos gamma ^{60}Co en la orquídea *Laelia autumnalis*. Se realizaron tres experimentos, en el primero se evaluó el efecto estimulante de la radiación gamma ^{60}Co sobre la germinación de semillas y el desarrollo *in vitro* de plántulas. Se irradiaron 22 frutos a diferentes dosis (3 a 30 Gy, con intervalos de 3 Gy) más un testigo. Las semillas se cultivaron en medio Murashige y Skoog (MS) sin fitohormonas. A los cinco días y posteriormente cada 10 días se cuantificó el número de semillas en las etapas de imbibición, formación de protocormos fotosintéticos, protocormos en diferenciación, desarrollo de promeristemos, hojas y plántulas. Se realizó un análisis de varianza y prueba de Tukey. Las semillas irradiadas entre 3 y 15 Gy formaron 61 % más protocormos fotosintéticos que las semillas sin irradiar. Todos los protocormos tratados con 3 Gy formaron hojas 60 días después de la siembra (dds); en contraste, sólo 12.5 % de las semillas no tratadas formaron hojas. Los resultados confirmaron el efecto radioestimulante de la radiación gamma a dosis bajas, lo que permite reducir el tiempo necesario para la obtención de plántulas. En un segundo ensayo se determinó la dosis letal media (DL_{50}) y dosis reductiva media (GR_{50}) a los rayos gamma en protocormos de *L. autumnalis* tratados con 5 a 50 Gy con intervalos de 5 Gy. A los 45 días después de la irradiación (ddi) se cuantificaron los porcentajes de supervivencia, protocormos fotosintéticos, protocormos con promeristemos, con

hojas y materia fresca de protocormos. A los 214 ddi, en 15 plántulas por tratamiento, se evaluó el número de hojas y raíces, longitud de plántulas, pseudobulbos y raíces, anchura de hojas y pseudobulbos, materia fresca y biomasa de plántula. Se aplicó análisis de varianza, correlación de Pearson, prueba de Tukey y regresión lineal. La radiación a dosis entre 20 y 30 Gy estimularon la presencia de clorofila. La longitud de plántulas se incrementó 32 % con 5 Gy. La correlación entre los niveles de radiación y la supervivencia de protocormos (-0.91), la formación de hojas (-0.90) y el peso de materia fresca de protocormos (-0.69) fue altamente significativa. La DL_{50} para la supervivencia de protocormos y la GR_{50} para formación de hojas fueron 53 y 28 Gy, respectivamente. Estas dosis se pueden utilizar para inducir variabilidad a partir de protocormos de *Laelia autumnalis*. En el tercer experimento se estableció la curva de radiosensibilidad y se determinó la DL_{50} en semillas irradiadas con rayos gamma (^{60}Co). Las semillas se sometieron a 10 dosis de irradiación (10 a 100 Gy con intervalos de 10) y un testigo; se realizó una prueba de viabilidad de las semillas, las semillas se germinaron *in vitro* en medio MS sin fitohormonas. Quince y 30 dds se cuantificó en microscopio estereoscópico la supervivencia, imbibición de semillas y formación de protocormos. Se realizó un análisis de varianza, correlación de Pearson, prueba de Tukey y regresión lineal. La supervivencia e imbibición se redujo conforme se incrementó la dosis de radiación, 30 dds la supervivencia se redujo a 41 % y la imbibición de semillas a 16 % al ser expuestas a 100 Gy. Se obtuvo un coeficiente de correlación altamente significativo entre las diferentes dosis de radiación aplicadas con la supervivencia de semillas (-0.96) y la viabilidad (-0.63), así como entre la supervivencia y viabilidad (0.61). La DL_{50} para supervivencia se determinó en 81 Gy y 65 Gy para imbibición de semillas. Se concluye que la radiación gamma ^{60}Co a dosis bajas estimula la germinación y acelera el desarrollo de plántulas. La irradiación con dosis entre 28 y 53 Gy en protocormos y a 81 Gy en semillas se puede emplear en un programa de mejoramiento genético para *L. autumnalis*. Estos resultados permiten reducir

el tiempo necesario para la germinación y obtención de plántulas listas para aclimatarse en invernadero. Además de que se determinó la DL_{50} y GR_{50} que es el primer paso en la inducción de mutaciones para la obtención de variedades de interés ornamental. Por lo que se cuenta con las bases para que con éste método se generen variantes adaptadas a las distintas condiciones de nuestro país y que posean las cualidades estéticas acordes al mercado consumidor internacional.

Palabras clave: Mutagénesis *in vitro*, germinación asimbiótica, radiación ionizante, rayos gamma y orquidia.

II. GENERAL ABSTRACT

Laelia autumnalis is a wild orchid with ornamental potential due to the attractive characteristics of its flowers. However, it is necessary to induce variability of commercial interest in this species to generate varieties that meet the international standards demanded by the market. An effective method for generating varieties in ornamental crops is mutagenesis, which is also free of restrictions and regulations imposed on genetically regulated organisms. For this reason, the general objective was to study the effect of gamma irradiation with ^{60}Co gamma rays on the orchid *Laelia autumnalis*. Three experiments were carried out, the first of which evaluated the stimulating effect of ^{60}Co gamma radiation on seed germination and *in vitro* seedling development. Twenty-two fruits were irradiated at different doses (3 to 30 Gy, with intervals of 3 Gy) plus a control. The seeds were grown in Murashige and Skoog (MS) medium without phytohormones. After five days and every 10 days thereafter, the number of seeds was quantified in the stages of imbibition, formation of photosynthetic protocorms, protocorms in differentiation, and development of promeristems, leaves and seedlings. An analysis of variance and Tukey's test were performed. The seeds irradiated between 3 and 15 Gy formed 61 % more photosynthetic protocorms than the non-irradiated seeds. All protocorms treated with 3 Gy formed leaves 60 days after sowing (das); by contrast, only 12.5 % of untreated seeds formed leaves. The results confirmed the radio-stimulating effect of gamma radiation at low doses, which reduces the time required to obtain seedlings. A second trial determined the median lethal dose (LD_{50}) and mean reductive dose (GR_{50}) to gamma rays in *L. autumnalis* protocorms treated with 5 to 50 Gy at 5 Gy intervals. At 45 days after irradiation (dai), the survival rates, photosynthetic protocorms, protocorms with promeristems, with leaves and fresh matter of protocorms were quantified. At 214 dai, in 15 seedlings per treatment, the number of leaves and roots, length of

seedlings, pseudobulbs and roots, width of leaves and pseudobulbs, fresh matter and seedling biomass were evaluated. Analysis of variance, Pearson correlation, Tukey's test and linear regression were applied. Radiation at doses between 20 and 30 Gy stimulated the presence of chlorophyll. Seedling length increased 32 % with 5 Gy. The correlation between radiation levels and protocorm survival (-0.91), leaf formation (-0.90) and protocorm fresh matter weight (-0.69) was highly significant. The LD₅₀ for protocorm survival and the GR₅₀ for leaf formation were 53 and 28 Gy, respectively. These doses can be used to induce variability from *Laelia autumnalis* protocorms. In the third experiment, the radiosensitivity curve was established and the LD₅₀ was determined in seeds irradiated with gamma rays (⁶⁰Co). The seeds were subjected to 10 doses of irradiation (10 to 100 Gy with intervals of 10) and a control; a seed viability test was carried out and the seeds were germinated *in vitro* in MS medium without phytohormones. Fifteen and 30 das, survival, seed imbibition and protocorm formation were quantified using a stereoscopic microscope. An analysis of variance, Pearson correlation, Tukey's test and linear regression were performed. Survival and imbibition were reduced as the radiation dose was increased; at 30 das, survival was reduced to 41 % and seed imbibition to 16 % when exposed to 100 Gy. A highly significant correlation coefficient was obtained between the different radiation doses applied and seed survival (-0.96) and viability (-0.63), as well as between survival and viability (0.61). The LD₅₀ for survival was determined at 81 Gy and 65 Gy for seed imbibition. It is concluded that ⁶⁰Co gamma radiation at low doses stimulates germination and accelerates seedling development. Irradiation with doses between 28 and 53 Gy in protocorms and 81 Gy in seeds can be used in a breeding program for *L. autumnalis*. These results allow reducing the time needed for germination and obtaining seedlings ready to acclimatize in greenhouses. In addition, the LD₅₀ and GR₅₀ were determined, which is the first step in inducing mutations to obtain varieties of ornamental interest. Therefore, we have the basis for this method to generate variants adapted to

the different conditions of our country and that possess the aesthetic qualities consistent with the international consumer market.

Keywords: *In vitro* mutagenesis, asymbiotic germination and ionizing radiation

III. INTRODUCCIÓN GENERAL

La floricultura es una de las actividades más rentables del sector agrícola, en los últimos años en el mercado internacional se ha incrementado la demanda de nuevas variedades de flores tropicales como anturios, aves de paraíso y orquídeas. Los principales países productores, medidos en superficie productiva, son China (con 40,000 ha en flor cortada y 60, 000 ha en planta en maceta) y la India (con 100,000 ha, tanto de flor como de planta). En cuanto al valor de la producción, los principales países son Italia, Países Bajos, Japón y EEUU. La producción europea es la primera del mundo en valor, con 10, 228 millones de euros que representa el 42% de la producción mundial. Por otra parte, cabe destacar que Colombia, Ecuador y Kenia, se caracterizan porque sus mercados se orientan casi exclusivamente a la exportación (AIPH, 2014).

A nivel internacional, la participación de México en esta importante cadena económica no corresponde con las ventajas que nuestro país posee: gran riqueza florística, ubicación geográfica idónea para facilitar la comercialización e infraestructura sólida en investigación biotecnológica de plantas; entre otras causas porque el sector nacional depende de variedades desarrolladas en el extranjero, lo que implica el pago de regalías inclusive para el caso de variedades derivadas de especies nativas mexicanas.

Entre las alternativas que tiene México para incrementar la competitividad de este sector, se encuentra la generación de variedades nacionales de gran demanda en el mercado ornamental, como las orquídeas. Los jardines botánicos y los bancos de germoplasma a través de colecciones de semillas y plantas son un recurso valioso para generar variedades comerciales de orquídeas, que permitan abastecer el mercado demandante, lo cual reducirá las presiones existentes sobre

colectas en las poblaciones de plantas silvestres. En México el Banco de Germoplasma del Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos (SINAREFI) conserva genotipos de la orquídea *L. autumnalis* que son una fuente importante de material vegetal para incorporarse en programas de mejoramiento genético, ya que esta orquídea es una especie silvestre de México con un gran potencial ornamental. Sin embargo es necesario inducir variabilidad para obtener genotipos de interés comercial de esta especie. Estos recursos representan la fuente biológica para desarrollar variedades con características atractivas que permitan ser consideradas con alto valor comercial, que cumplan con los estándares internacionales de calidad que demanda el mercado (Aramendiz *et al.*, 2006).

Un método rápido y eficaz para lograr variedades comerciales en diferentes cultivos es el fitomejoramiento mediante la inducción de mutaciones, hasta el 2007 se desarrollaron aproximadamente 2,300 variedades, las cuales fueron liberadas al mercado y registradas oficialmente en la base de datos de variedades mutantes de la Organización para la Agricultura y Alimentación-Agencia Internacional de Energía Atómica (FAO-IAEA) (Toker *et al.*, 2007). Este método presenta la ventaja de estar libre de restricciones y regulaciones impuestas a los organismos genéticamente modificados (Parry *et al.*, 2009). Entre los agentes mutagénicos que mayor cantidad de mutantes han inducido se encuentran las radiaciones gamma de ^{60}Co , las cuales han sido utilizadas con éxito en plantas ornamentales para obtener cambios en el color de las flores, tamaño de hojas y pétalos, así como en el tamaño y la arquitectura de las plantas. El uso combinado de las técnicas de mutagénesis y de cultivo *in vitro* ha hecho posible que se acorte el tiempo necesario para la obtención de una nueva variedad (González *et al.*, 2005), ya que pueden ofrecer muchas ventajas como la separación de quimeras, la capacidad de producir

grandes cantidades de los nuevos mutantes en poco tiempo y la obtención de clones de un solo brote (Estrada-Basaldua *et al.*, 2011).

Laelia autumnalis, es una de las orquídeas silvestres mexicanas más apreciadas, con potencial ornamental como flor de corte y en macetas por las atractivas características de sus flores que le permiten cumplir estándares internacionales de calidad y la convierten en una especie económicamente importante, por lo que se justifica el uso de radiaciones gamma ^{60}Co para generar variedades comerciales que deben ser reproducidas e identificadas y descritas morfológicamente para su registro antes de ponerlas a disposición de los floricultores. Por lo anterior en la presente investigación se plantean las hipótesis y objetivos siguientes:

IV HIPÓTESIS

La aplicación de rayos gamma ^{60}Co en semillas y protocormos de la orquídea *L. autumnalis* induce variabilidad con valor ornamental.

Existe una dosis óptima de radiación para generar variantes en *Laelia autumnalis* a partir de protocormos y semillas irradiadas.

La radiación gamma ^{60}Co en dosis bajas estimula la germinación y el desarrollo *in vitro* de semillas de la orquídea *Laelia autumnalis*.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar el efecto de la irradiación con rayos gamma ^{60}Co en la orquídea *Laelia autumnalis*.

Objetivos específicos

Evaluar el efecto de la irradiación gamma ^{60}Co sobre la germinación y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Laelia autumnalis*.

Determinar la dosis letal media y dosis reductiva media en semillas y protocormos de *Laelia autumnalis* irradiados con rayos gamma ^{60}Co .

Establecer la curva de radio sensibilidad en semillas irradiadas con rayos gamma ^{60}Co .

Organización de la Tesis

Además de esta parte introductoria la tesis consta de cuatro capítulos y la discusión general. En el primer capítulo “La mutagenesis en el mejoramiento de plantas ornamentales”, se presenta una revisión de la importancia y éxito de la mutagenesis en el mejoramiento de ornamentales, se realizó una revisión de los principales géneros de plantas ornamentales en los que se han registrado variedades mutantes en la base de datos conjunta de la Agencia Internacional de Energía Atómica y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (IAEA/FAO).

En el segundo capítulo “Estimulación de la germinación y desarrollo *in vitro* con rayos gamma de *Laelia autumnalis*” se evaluó el efecto de la radiación gamma ^{60}Co sobre la fenología de la germinación de semillas y el desarrollo de las plántulas. Se describe el efecto estimulante de la radiación gamma ^{60}Co cuando se aplica a dosis baja, lo que permitió reducir el tiempo necesario para la obtención de plántulas.

El capítulo III se tituló “Determinación de la DL_{50} y GR_{50} con rayos gamma (^{60}Co) en protocormos de *Laelia autumnalis in vitro*” aquí se describe el efecto de la radiación gamma ^{60}Co sobre protocormos irradiados, se determinó la dosis letal media y la dosis reductiva media, lo que permitió establecer las bases para iniciar un programa de mejoramiento por mutagénesis en la orquídea *Laelia autumnalis*.

En el capítulo IV “Mutagénesis *in vitro* en semillas de la orquídea *Laelia autumnalis*” se realizó una comparación entre la prueba de viabilidad con tetrazolio en semillas irradiadas con rayos gamma y su germinación. Esto permitió comprobar que la prueba de tetrazolio es un método confiable para determinar la viabilidad en las semillas irradiadas. También se estableció la curva de radiosensibilidad y la dosis letal media para semillas irradiadas con rayos gamma ^{60}Co .

VI. CAPÍTULO I

LA MUTAGÉNESIS EN EL MEJORAMIENTO DE PLANTAS ORNAMENTALES

RESUMEN

La floricultura es una de las actividades más rentables dentro de la agricultura. Países con economías desarrolladas han generado una industria florícola bien establecida, lo que ha incrementado la necesidad de desarrollar nuevos cultivares. La mutagénesis es una importante herramienta en la generación de variedades ornamentales, se han registrado más de 700 variedades en la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA). Entre los principales géneros destaca *Chrysanthemum* con 283, *Rosa* con 67 y *Dahlia* y *Alstroemeria* con 35 variedades registradas. El germoplasma nativo de México ha sido utilizado para generar diversas variedades de plantas mutantes en el extranjero. En géneros de importancia ornamental como *Dahlia* se han registrado 18 variedades y se ha generado una gran cantidad de formas mutantes en Asia y Europa. En *Polianthes* han desarrollado formas mutantes en países como Iran y la India. En *Helianthus* desarrollaron 569 formas mutantes en Bulgaria. A pesar de que la inducción de mutaciones ha demostrado ser un método eficiente en la generación de variedades ornamentales, nuestro país no ha logrado registrar variedades ornamentales y son escasos los trabajos reportados. Se encuentran reportes de inducción de mutaciones en especies como *Tigridia pavonia*, *P. tuberosa*, *Euphorbia pulcherrima*, *Dendranthema grandiflora*, *H. annuus* y *Laelia autumnalis*. Estos trabajos han permitido establecer las bases para implementar programas de mejoramiento genético por inducción de mutaciones. Se concluye que el uso de radiación gamma ^{60}Co es una opción eficaz para desarrollar variedades comerciales adaptadas a las distintas

condiciones de nuestro país, que además posean los atributos ornamentales para cumplir con los estándares de calidad que demanda el mercado internacional.

Palabras clave: rayos gamma; inducción de mutaciones; radiosensibilidad; variedades ornamentales.

MUTAGENESIS IN ORNAMENTAL PLANT BREEDING

ABSTRACT

Floriculture is one of the most profitable activities in agriculture. Countries with developed economies have created a well-established floriculture industry, which has increased the need to develop new cultivars. Mutagenesis is an important tool in the generation of ornamental varieties. More than 700 varieties have been registered in the International Atomic Energy Agency (IAEA). Among the main genera, *Chrysanthemum* stands out with 283, *Rosa* with 67 and *Dahlia* and *Alstroemeria* with 35 registered varieties. The germplasm native to Mexico has been used to generate various varieties of mutant plants abroad. In genera of ornamental importance such as *Dahlia*, 18 varieties have been registered and a large number of mutant forms have been generated in Asia and Europe. Mutant forms of *Polianthes* have been developed in countries like Iran and India, whereas 569 mutant forms of *Helianthus* have been developed in Bulgaria. Although mutation induction has proven to be an efficient method for generating ornamental varieties, our country has not managed to register ornamental varieties and there are few reported studies on the subject. There are reports of inducing mutations in species such as *Tigridia pavonia*, *P. tuberosa*, *Euphorbia pulcherrima*, *Dendranthema grandiflora*, *H. annuus* and *Laelia autumnalis*. These studies have established the basis for implementing breeding programs by inducing mutations. It is concluded that the use of ^{60}Co gamma radiation is an effective option to develop commercial varieties adapted to the different conditions of our country, which also have the ornamental attributes to meet the quality standards demanded by the international market.

Keywords: gamma rays; mutation induction; radiosensitivity; ornamental varieties.

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de los rayos X por Röntgen en 1895, la radiactividad por Becquerel en 1896 y los elementos radiactivos de Marie y Pierre Curie en 1898 (Mba, 2013), dieron inicio a la inducción deliberada de mutaciones en las plantas, las primeras investigaciones se hicieron con rayos X y causaron alteraciones en la estructura genética de los cultivos de maíz y cebada (Stadler, 1928 a y b). A partir de éstas investigaciones la mutagénesis ha sido un método importante en la generación exitosa de un gran número de variedades prometedoras en diferentes cultivos (Datta, 2009), como maíz, trigo, cebada, algodón y frijol (Chopra, 2005).

En plantas ornamentales se han producido con éxito un gran número de nuevas variedades y se considera una herramienta exitosa (Datta, 2009). En México con esta herramienta biotecnológica se han generado tres variedades de soya (*Glycine max*) y dos de trigo (*Triticum aestivum*) (International Atomic Energy Agency [IAEA], 2017). En ornamentales los esfuerzos se han enfocado en especies como nardo (Estrada-Basaldúa *et al.*, 2011), nochebuena silvestre (Canul-Ku *et al.*, 2012), crisantemo (Castillo-Martínez *et al.*, 2015) y girasol (Díaz *et al.*, 2017). Sin embargo, el país depende de variedades desarrolladas en el exterior, lo que implica el pago de regalías inclusive para el caso de variedades derivadas de especies nativas mexicanas. Por lo que el objetivo de este trabajo es hacer una revisión sobre el uso y la eficiencia de la inducción de mutaciones con rayos gamma ^{60}Co en plantas ornamentales nativas de México. La hipótesis fue que es posible inducir variabilidad con rayos gamma en plantas ornamentales nativas de México.

IMPORTANCIA DE LAS PLANTAS ORNAMENTALES Y SU MEJORAMIENTO

La floricultura se ha convertido en uno de los sectores más importantes dentro de la agricultura, su crecimiento se estima en 500 millones de dólares anuales aproximadamente. Países con economías desarrolladas como Estados Unidos, Australia y los países Europeos han generado una industria florícola bien establecida, donde las flores de corte constituyen el sector más destacado (Singh, 2017). Según la Asociación Internacional de Productores Hortícolas en el 2010, 702,383 hectáreas estaban en producción de flores en diferentes países del mundo. Las exportaciones mundiales ascienden a 9,784,525,000 de USD, donde Holanda es el líder mundial con el 47.7 % del total de las exportaciones, los otros exportadores principales son Colombia, Ecuador, Kenia, Etiopía y Bélgica (Malhotra, 2017). Los principales países consumidores de flores se concentran en Europa Occidental y América del Norte donde se consume alrededor del 80 % de la producción total.

Debido a las crecientes necesidades que el mercado demanda de la industria florícola (Azadi *et al.*, 2016) y al desarrollo de nuevas áreas de producción, donde las variedades tradicionales no están bien adaptadas (Gupta y Agnihotri, 2017) se ha incrementado la necesidad de desarrollar nuevos cultivares ornamentales con atributos mejorados (Noman *et al.*, 2017). Además, para permanecer en el mercado los productores europeos mantienen la novedad como estrategia de mercado. Por esto la demanda internacional de nuevas variedades es muy alta (Gupta y Agnihotri, 2017). Sin embargo, a nivel internacional, la participación de México en esta importante cadena económica no corresponde con las ventajas que nuestro país posee: gran riqueza florística, ubicación geográfica ideal para facilitar la comercialización e infraestructura

sólida en investigación biotecnológica de plantas. Entre otras causas porque el sector florícola depende de variedades extranjeras, lo que incrementa los costos de producción.

LAS MUTACIONES COMO FUENTE DE VARIACIÓN

La creciente demanda de variedades de plantas novedosas implica un reto para los fitomejoradores. Muchos de los objetivos de los programas de mejoramiento genético, consisten en inducir resistencia a enfermedades y plagas, a factores abióticos adversos, a obtener hábitos de crecimiento específicos, entre otras características agronómicas sobresalientes. Estos cambios se pueden lograr a través de la inducción de mutaciones (Urrea y Ceballos, 2005).

En la mutagénesis se inducen deleciones o inserciones de fragmentos de ADN, que eventualmente conducen a cambios en los aminoácidos y a modificaciones en la pigmentación de hojas y tallos, como sucede en *Arabidopsis thaliana* (Shikazono *et al.*, 2003). Una mutación en la vía biosintética de los genes estructurales o reguladores puede causar un cambio en el color de la flor (Nakatsuka *et al.*, 2005). Los cambios en hojas se pueden deber a alteraciones por fitocromos, aberraciones cromosómicas y la inhibición mitótica (Abraham y Ninan, 1968). Debido a la condición duplicada de muchos genes, los organismos poliploides son más tolerantes a la irradiación que los diploides (Chopra, 2005). Esto conduce a frecuencias de mutaciones más altas en los organismos diploides (Mac, 1954). Sin embargo, los cambios no siempre se presentan de manera inmediata (Canul-Ku *et al.*, 2012).

En las plantas superiores las mutaciones se pueden producir con el uso de ADN-T o transposones, o por la exposición de propágulos a agentes mutagénicos químicos y físicos. La

inserción de ADN-T destruye la estructura del gen, los agentes físicos y químicos rompen la cadena de ADN y durante el mecanismo de reparación ocurren mutaciones heredables al azar (Kayalvizhi *et al.*, 2017).

AGENTES MUTAGÉNICOS Y SU MODO DE ACCIÓN

Los mutágenos químicos generan cambios estables y heredables, debido a que se inducen alteraciones en nucleótidos simples y se puede formar una serie alélica nueva. Más del 80 % de los mutágenos aplicados en plantas son agentes alquilantes, como el etilmetanosulfonato (EMS), metilnitrosourea (MNU) y etilnitrosourea (ENU) (Pacher y Puchta, 2017). El EMS causa mutaciones puntuales debido a la adición de un grupo alquilo en la guanina que resulta en la transición de G:C a A:T. El EMS induce mutaciones al crear versiones alélicas de los genes que dan lugar a fenotipos con rasgos agronómicos relevantes (Dhaliwal *et al.*, 2015). Otros mutágenos como la hidroxilamina reaccionan con la citosina en el grupo NH y forman hidroxilcitosina que se une con la adenina en lugar de guanina. El mutágeno 5-amino-acridina es una molécula plana como la base de la purina, a concentraciones bajas se puede insertar o intercalar entre las bases de la hélice del ADN y alarga la distancia entre los pares de bases adyacentes lo que distorsiona la cadena de ADN (Bhat *et al.*, 2016).

En mutágenos físicos los átomos son la principal fuente de material. Los átomos inestables de algunos elementos con diferente peso proporcionan partículas de energía llamadas radioisótopos, las ondas electromagnéticas asociadas al decaimiento nuclear se conocen como radiación (Kayalvizhi *et al.*, 2017). Éstos agentes producen especies reactivas con el oxígeno que interactúan con el ADN y causan daño oxidativo como modificaciones en las bases (Roldán-

Arjona y Ariza, 2009) y se induce múltiples rupturas simples o dobles en la cadena del ADN (Pacher y Puchta, 2017).

Los mutágenos físicos se dividen en radiación ionizante y no ionizante. Los rayos alfa (α), beta (β), gamma (γ) X y los neutrones pertenecen al grupo de las radiaciones ionizantes, mientras que la radiación no ionizante incluye solo a los rayos UV (Kayalvizhi *et al.*, 2017).

La radiación ionizante es la más utilizada por sus niveles altos de energía, es capaz de desalojar electrones de las órbitas nucleares de los átomos, por lo tanto, los átomos afectados se convierten en iones, de ahí el término radiación ionizante (Mba *et al.*, 2012). Este tipo de radiación causa lesiones biológicas en las plantas superiores a través de interacciones con el material genético (Lagoda, 2012), se pueden generar desde aberraciones a nivel de ADN hasta rupturas cromosómicas y reordenamientos (Mba, 2013), provoca modificaciones en las bases y rupturas simples o dobles de la cadena de ADN (Morita *et al.*, 2009).

Los rayos gamma son uno de los agentes mutagénicos más importantes dentro de la radiación ionizante, han demostrado ser altamente penetrantes y potentes en la inducción de variabilidad en las plantas (Deshpande *et al.*, 2010), su éxito se ha demostrado en la generación de nuevas variedades, más del 55 % de las variedades mutantes liberadas se han generado con esta técnica (Kulkarn *et al.*, 2007). Los rayos gamma se emiten en el proceso de desintegración de los radioisótopos de carbono-14 (^{14}C) cobalto-60 (^{60}Co), cesio-137 (^{137}Cs) y en menor medida plutonio-239 (^{239}Pu). La irradiación puede ser aguda (períodos cortos) o crónica (períodos largos) (Mba, 2013). La alta eficiencia de esta radiación se debe a que tienen un nivel de energía de alrededor de 10 kilo electrón voltios (keV) a varios cientos de keV (Cuadro 1). Esto les confiere

mayor poder de penetración que los rayos alfa y beta (Kovacs y Keresztes, 2002), su efecto biológico se basa en la interacción con los átomos o moléculas en la célula, en particular con el agua para producir radicales libres. Estos radicales pueden dañar o modificar componentes celulares importantes, se ha reportado que afectan diferencialmente la morfología, anatomía, bioquímica y fisiología de las plantas, según el nivel de irradiación (Wi *et al.*, 2005).

CUADRO 1. Propiedades de los agentes mutágenos físicos comúnmente usados.

Agente mutagénico	Frecuencia típica (S ⁻¹)	Energía típica (kJ/mol)	Energía fotonica típica (eV)
Partículas			
Alfa		4.1 X10 ⁸	
Beta		1.5 X10 ⁷	
Radiación electromagnética			
Rayos-γ	3X10 ² s ⁻¹	1.2 X10 ⁸	1 MeV
Rayos-X	3X10 ¹⁷ s ⁻¹	1.2 X10 ⁵	100 KeV
Ultravioleta	3X10 ¹⁵ s ⁻¹	1200	4 eV

Tomado de Mba *et al.*, 2013

EFFECTO DE LA RADIACIÓN EN LAS CÉLULAS VEGETALES

La respuesta de las plantas a la radiación es más o menos lineal con la dosis empleada (Yamaguchi *et al.*, 2008), causa cambios en la estructura celular, como lesiones físico-químicas, pequeñas lesiones en los cromosomas o la combinación de ambos efectos (Ramesh *et al.*, 2013), en lesiones primarias se retrasa o se inhibe la división celular, afecta la actividad mitótica, la tasa o hábito de crecimiento, el metabolismo como la dilatación de las membranas de los tilacoides, altera la fotosíntesis, la modulación del sistema antioxidante y la acumulación de compuestos fenólicos (Wi *et al.*, 2005), causa modificaciones en lípidos, enzimas y otros constituyentes celulares (Kodym y Afza, 2003) e induce la muerte celular (Wi *et al.*, 2005).

La radiación modifica la cadena de ADN y el mecanismo de reparación se puede producir mediante dos vías, la recombinación homóloga y los extremos no homólogos (Kimura y Sakaguchi, 2006). La recombinación homóloga es una vía de reparación libre de errores, mientras que los extremos no homólogos es una vía de reparación propensa a errores y con frecuencia causa mutaciones como deleciones, inserciones e inversiones en los sitios de reparación (Kirik *et al.*, 2000). Sin embargo, el efecto de la radiación está en función del material vegetal empleado así como del genotipo, por lo que cada especie, incluso cada tejido presenta diferente sensibilidad a la radiación.

RADIOSENSIBILIDAD Y DOSIS LETAL MEDIA

La radiosensibilidad depende del tipo de radiación y de la dosis empleada, de las características del explante como tipo de tejido, tamaño, grado de desarrollo y contenido de humedad (Datta y Teixeira da Silva, 2006), ya que estas características alteran la respuesta de las células a la radiación, y materiales blandos como cortes *in vivo* e *in vitro* y los callos embriogénicos requieren dosis más bajas en comparación con las semillas. La sensibilidad también depende de la constitución genética del material vegetal como es el número y tamaño cromosómico, nucleótido, heterocromatina, número y posición del centrómero, grado de poliploidía, contenido de ADN nuclear y el tiempo de replicación en las etapas iniciales. Así como de factores citoplásmicos, biológicos, químicos y ambientales (Deshpande *et al.*, 2010). Por lo tanto, cada genotipo debe ser evaluado para un tratamiento óptimo dentro de un intervalo de condiciones (Urrea y Ceballos, 2005).

El propósito principal del estudio de la radiosensibilidad es determinar la dosis de radiación más eficaz para incrementar la frecuencia de mutaciones (Barakat y El-Sammak, 2011). La reducción media de la mortalidad, el nivel prolongado de daño, la tasa de exposición letal por la radiación (Abdullah *et al.*, 2009), las reducciones en la tasa de germinación, la altura de plántulas, la tasa de supervivencia y las mutaciones de clorofila son los principales parámetros a evaluar en las pruebas de sensibilidad, para determinar las dosis óptimas (Mba, 2013).

La dosis letal media o dosis reductiva media es la dosis con la que se reduce la supervivencia y el crecimiento al 50 % con relación al tratamiento control y es donde se obtiene la mayor cantidad de mutaciones. Algunos autores recomiendan un intervalo de 20 % superior e inferior (IAEA/FAO, 1977); Algunos otros autores mencionan que la dosis óptima debe llevar a la supervivencia del 40-60 % del material tratado con respecto al no tratado (Urrea y Ceballos, 2005).

La radioinhibición es el efecto negativo de la radiación y generalmente se presenta con dosis muy altas, donde la mayoría de las plantas mueren, porque los mutágenos tienen un efecto negativo directo sobre los tejidos, la multiplicación y regeneración de plantas, así como en la altura y el desarrollo de éstas. Las dosis de radiación altas ocasionan pérdida de la capacidad regenerativa y malformación de plantas (Chakravarty y Sen, 2001) y muchas mutaciones llegan a ser letales (Abdullah *et al.*, 2009). A nivel celular ocurren diversas reacciones que afectan a las macromoléculas vitales y resultan en desequilibrios fisiológicos. Se ha demostrado que altas dosis de radiación ionizante dañan componentes macromoleculares celulares tales como paredes celulares, membranas, el ADN (Wi *et al.*, 2005), y moléculas orgánicas que son esenciales para el

proceso de división celular y por lo tanto, causan detención de la división celular (Tangpong *et al.*, 2009).

La muerte de las plantas es atribuida a la interacción de la radiación con otras moléculas en las células, en particular con el agua para producir radicales libres (H y OH). Estos radicales libres pueden combinarse para formar sustancias tóxicas como peróxido de hidrógeno (H₂O₂), que contribuye a la destrucción celular. Este efecto indirecto influye en las células vegetativas, ya que alrededor del 80 % del contenido del citoplasma es agua (Kovacs y Keresztes, 2002).

La radioestimulación se presenta con el uso de dosis bajas de radiación, que estimulan cambios físicos y bioquímicos, que se ven reflejados en procesos fisiológicos como la aceleración en la regeneración de plantas (Chakravarty y Sen, 2001) e incremento en la formación de sustancias de reserva (Al-Safadi *et al.*, 2000).

EL CULTIVO *in vitro* EN LA MUTAGÉNESIS

La mutagénesis es más eficiente al usar la totipotencia celular, es decir, al utilizar las células individuales y otras formas de tejidos de las plantas cultivadas *in vitro* como material de partida para la inducción de mutaciones (Mba, 2013). La combinación de ambas técnicas ha abierto nuevas posibilidades para inducir un mayor número de mutantes (Datta y Teixeira da Silva, 2006), es posible incrementar la variabilidad en cultivos de importancia económica (Senapati *et al.*, 2008), al mejorar caracteres agronómicos importantes (Bermúdez-Caraballosa *et al.*, 2010). La mutagénesis *in vitro* puede incrementar las variantes genéticas y permite proveer a gran escala plántulas para su cultivo en campo (Barakat y El-Sammak, 2011). La combinación de

ambas técnicas ha sido ampliamente utilizada en el mejoramiento de variedades de propagación vegetativa (Maluszynski *et al.*, 2000). Cualquier explante o callo puede ser tratado de forma uniforme con un agente mutagénico y regenerarse a través de métodos *in vitro* en condiciones controladas, en grandes poblaciones con espacios limitados y en cualquier época del año. Además, se pueden observar las plantas en la generación M1V2 y generaciones posteriores, que es donde se presenta la posibilidad de obtener un mayor número de mutantes; ya que las células mutadas de las yemas axilares inferiores permanecen en fase latente y expresan su carácter mutante cuando se desarrollan durante la propagación vegetativa en la M1V2 (Datta y Teixeira da Silva, 2006).

Mutación somaclonal es la variación que surge en el cultivo de células y plantas regeneradas *in vitro*, así como en su progenie, entre los factores más importantes para la aparición de variación somaclonal son el sistema de regeneración, el tipo de tejido, la fuente explante, los componentes del medio y la duración del ciclo de cultivo (Sarmah *et al.*, 2017). Estos cambios ocurren cuando una célula sufre una mutación y continúa dividiéndose, la célula individual contiene tejido con el genotipo diferente al resto de las células de la planta (Brar y Jain, 1998). Estas mutaciones incluyen cambios cariotípicos, mutaciones puntuales, cruzamiento somático, disposición de genes somáticos, cambios en la amplificación del ADN y segregación de tejidos quiméricos preexistentes (Kearsey y Pooni, 1998).

IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES

En la mutagénesis el paso más importante y difícil es analizar a toda la población mutante, lo cual se puede realizar con tecnologías de genética inversa que busca determinar la función del

gen a través de la correlación de los genes y sus productos. Estos enfoques proporcionan excelentes herramientas para el desarrollo de estrategias eficaces para la identificación de alelos útiles en un programa de mejoramiento genético y genómica funcional (Maghuly *et al.*, 2017).

Las mutaciones se pueden detectar con diversos métodos directos e indirectos como la desnaturalización de la cromatografía líquida de alto rendimiento (DHPLC), la electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE), la electroforesis capilar de gradiente de temperatura (TGCE), el análisis heteroduplex (HD) el polimorfismo de conformación del ADN (SSCP), la división química o enzimática de los desajustes (CECM) y la orientación de las lesiones locales inducidas en el genoma (Till *et al.*, 2007).

El método de transposones endógenos u orientación de las lesiones locales inducidas en el genoma (TILLING) presentó un desarrollo importante a finales de 1990 y se ha empleado para la interrupción de genes con un enfoque de genética inversa (Hunter *et al.*, 2014). Esta técnica típicamente se utiliza en la mutagénesis cuando se induce una alta densidad de mutaciones aleatorias a través del genoma (Jankowicz-Cieslak *et al.*, 2011). En poblaciones mutantes de arroz inducidas con rayos gamma los TILLING se han utilizado con éxito para la identificación de pequeñas deleciones y sustituciones de bases (Morita *et al.*, 2009). En el TILLING tradicional, la biblioteca de ADN se muestra por PCR y la identificación de mutantes es por desajuste enzimático para la identificación de los genes diana (Jankowicz-Cieslak *et al.*, 2011).

El método de genotipado de las plantas se realiza con el objetivo de evaluar las diferencias en la secuencia de nucleótidos dentro o entre las especies. Ésta es una herramienta poderosa debido a que la variación de nucleótidos es el principal contribuyente a la variación

fenotípica hereditaria (Jankowicz-Cieslak *et al.*, 2017). Los métodos de identificación en la variación de nucleótidos también proporcionan información importante sobre la evolución de la planta y permiten realizar selecciones eficientes al no considerar las interacciones entre el genotipo y medio ambiente (Annicchiarico, 2002).

A pesar de los avances en la genética molecular, los métodos tradicionales siguen siendo eficientes en la elección de los individuos mutantes. La selección es el método más antiguo y es la base para el mejoramiento en todos los cultivos. Consiste en seleccionar los individuos con las mejores características, esto permite aislar plantas con genotipos superiores y establecer líneas puras y se ha utilizado en el desarrollo de cultivares de plantas ornamentales como lily, dalia y crisantemo (De, 2017).

VARIEDADES DE PLANTAS ORNAMENTALES GENERADAS POR MUTAGÉNESIS

La mutagénesis en plantas ornamentales representa una herramienta poderosa, no solamente para esclarecer mecanismos fisiológicos en el funcionamiento de las plantas (Honda *et al.*, 2006), sino también para obtener nuevas variedades de utilidad para la industria florícola (Canul-Ku *et al.*, 2012). Los cambios en las características fenotípicas como el color, la forma o el tamaño de la flor y la variegación de clorofila en las hojas se pueden detectar con facilidad. Además, debido a la naturaleza heterocigótica de muchos cultivares, se produce una frecuencia de mutación alta (Datta y Teixeira da Silva, 2006), lo que hace a las plantas ornamentales ideales para la inducción de mutaciones (Urrea y Ceballos, 2005).

Hasta el año 2000, más de 2,200 variedades de plantas mutantes se liberaron al mercado mundial. Para el año 2005, se incrementó a 2,335 variedades, de éstas, 552 eran cultivos ornamentales (Mba *et al.*, 2005) y para el año 2017 aumentó a 3,249 variedades, de las cuales 720 son cultivos ornamentales (IAEA/ FAO, 2017). La mutagénesis se ha utilizado en flores de corte y en plantas cultivadas en macetas (Taheri *et al.*, 2014). Entre los principales géneros en los que se ha generado el mayor número de variedades se encuentran *Chrysanthemum*, *Rosa*, *Dahlia*, *Alstroemeria*, *Streptocarpus*, *Dianthus* y *Begonia* (Cuadro 2) (IAEA/FAO, 2017).

CUADRO 2. Géneros con variedades ornamentales mutantes registradas en la base de datos de la Agencia internacional de Energía Atómica (IAEA/FAO, 2017).

Género	Variedades obtenidas	Variedades obtenidas con rayos gamma
<i>Chrysanthemum</i>	283	150
<i>Rosa</i>	67	52
<i>Dahlia</i>	35	18
<i>Alstroemeria</i>	35	11
<i>Streptocarpus</i>	30	0
<i>Dianthus</i>	28	8
<i>Begonia</i>	25	17
<i>Portulaca</i>	17	17
<i>Bougainvillea</i>	16	14
<i>Rhododendron</i>	15	9
<i>Hibiscus</i>	10	10
<i>Cytisus</i>	9	9
<i>Tulipa</i>	9	0
<i>Achimenes</i>	8	0
<i>Canna</i>	8	8
<i>Lilium</i>	6	4
<i>Limonium</i>	6	6
<i>Antirrhinum</i>	5	0
<i>Iris</i>	5	5
<i>Tibouchina</i>	5	0
<i>Albelmoschus</i>	4	4
<i>Gladiolus</i>	4	2
<i>Hoya</i>	4	4
<i>Juncus</i>	4	3
<i>Kalanchoe</i>	4	1

En el género *Chrysanthemum* (sinonimia *Dendranthema*) entre 1962 y 2015, se han registrado 283 variedades mutantes en la base de datos de la IAEA/FAO; el color de las flores destaca como la principal característica modificada (Cuadro 3).

CUADRO 3. Variedades de *Chrysanthemum* registradas en la base de datos de la Agencia Internacional de Energía Atómica, datos tomados de la AIEA (IAEA/FAO, 2017).

País	Variedades	Método empleado	Año	Material empleado	Característica mejorada
Alemania	34	Rayos X (22), gamma (12)	1962 (3), 1964 (1), 1966 (4), 1977 (1), 1979 (1), 1981 (1), 1983 (3), 1984 (2), 1985 (3), 1987 (3), 1988 (8), 1989 (4)	Brotos (4), esquejes (10), no reportado (20)	Color de las flores (34)
Bélgica	7	Rayos X (7)	1985 (7)	Esquejes (7)	Color de las flores (7)
Brasil	4	Gamma (4)	1995 (2), 1996 (2)	Esquejes (1), pedicelo (1), no reportado (2)	Color de las flores (4)
China	21	Gamma (18), no reportado (3)	1986 (1), 1987 (1), 1989 (10), 1990 (2), 1991 (1), 1996 (6),	Callos de hojas (4), no reportado (17)	Características agronómicas y botánicas (17), hábito de crecimiento (1), no reportado (3)
Estados Unidos	1	Rayos X (1)	1960 (1)	Esquejes enraizados (1)	Color de las flores (1)
Rusia	17	Gamma (17)	1976 (17)	Esquejes enraizados (17)	Color de las flores (17)
Hungría	1	Gamma (1)	1969 (1)	No reportado (1)	No reportado (1)
India	48	Gamma (44), rayos X (1), irradiación(1), colchicina(1), sin reporte(1)	1969 (1), 1974 (11), 1975 (9), 1978 (3), 1979 (4), 1982 (3), 1984 (1), 1985 (3), 1987 (3), 1990 (1), 1991 (1), 1992 (2), 1993 (1), 1994 (1), 1996 (1), 2003 (1), 2015 (1)	Esquejes (19), reproducción vegetativa (21), no reportado (8)	Color de las flores (30), forma y color de las flores (18)

Cuadro 3. Variedades de *Chrysanthemum* registradas en la base de datos de la Agencia Internacional de Energía Atómica, datos tomados de la AIEA (IAEA/FAO, 2017).

País	Variedades	Método empleado	Año	Material empleado	Característica mejorada
Japón	56	Gamma (36), gama y X (1), irradiación (1), rayos X (4), haces de iones (7), variación somaclonal (3), no reportado (2)	1985 (4), 1986 (1), 1990 (1), 1991 (6), 1994 (1), 1995 (6), 1997 (7), 1998 (6), 2000 (3), 2001 (3), 2002 (1)	Explantes de pétalos <i>in vitro</i> (7), explantes <i>in vitro</i> (13), hojas(3), no reportado(3)	Color de las flores (51), tamaño de la flor (2), tallos cortos (1), no reportado (2)
Malasia	2	Gamma (2)	1976 (2)	Callo(2)	Color y forma de las flores (2)
Países Bajos	80	Gamma (11), rayos X (67), no reportado (2)	1969 (1), 1970 (4), 1973 (1), 1975 (5), 1976 (10), 1977 (5), 1978 (10), 1979 (6), 1983 (2), 1984 (9), 1985 (20), 1986 (7)	Esquejes enraizados (52), no reportado (28)	Color de las flores (79), color y tamaño de las flores (1)
Polonia	6	Gamma (2), rayos X (4)	1993 (6)	No reportado (6)	Color de las flores (6)
República de Corea	2	Gamma (2)	2011 (2)	Explantes <i>in vitro</i> (2)	Color de las flores (2)
Tailandia	1	Gamma (1)	1987 (1)	Explantes <i>in vitro</i> (1)	Color de las flores (1)
Vietnam	3	No reportado (3)	2010 (1), 2011 (2)	No reportado (3)	No reportado (3)

El número entre paréntesis indica el número de variedades registradas

En el género Rosa los programas de mejoramiento están enfocados en los rasgos ligados al color y tamaño de la flor para aumentar su valor económico y ornamental (Qadeer *et al.*, 2015). Hasta el año 2017 se han liberado y registrado 67 variedades en la base de datos de la

IAEA/FAO. El mayor número de variedades se registró en el continente Asiático con el 86.56 %, Europa generó el 7.42 % y Norteamérica el 5.97 % (Cuadro 4).

CUADRO 4. Variedades de *Rosa* registradas en la base de datos de la Agencia Internacional de Energía Atómica, datos tomados de la IAEA (IAEA/FAO, 2017).

País	Variedades	Método empleado	Año	Material empleado	Características mejoradas
Alemania	4	X (2), no reportado (2)	1965 (1), 1976 (1), 1987 (1), 1988 (1)	Brotos (1), explantos <i>in vitro</i> (1), no reportado (2)	Color de las flores (4)
Canadá	2	Irradiación (1) X(1)	1964 (1), 1976 (1)	no reportado (2)	Color de las flores
China	35	Gamma (30), no reportado (5)	1984 (6), 1985 (2), 1986 (10), 1987 (1), 1989 (5), 1990 (11)	Yemas (14), yemas y semillas (2), semillas (2), injerto (2), estacas (4), no reportado (1)	Hojas y flores (4), características agronómicas y botánicas (24), resistencia a plagas y enfermedades (3), no reportado (4)
Eslovaquia	1	Gamma (1)	1964 (1)	Semillas (1)	Color de las flores (1)
Estados Unidos	2	Gamma (2)	1960 (2)	Brotos (2)	Color de las flores (2)
India	15	Gamma (14), EMS (1)	1975 (5), 1983 (6), 1986 (3), 1989 (1)	Brotos (14), no reportado (1)	Color de las flores (15)
Japón	8	Gamma (5), químico (3)	1985 (1), 1990 (3), 1995 (1), 2000 (2), 2001 (1)	no reportado (8)	Color de las flores (5), color y forma de las flores (2), tamaño de hojas (1)

El número entre paréntesis indica el número de variedades liberadas

En Dahlia el mejoramiento por mutagénesis se ha realizado en Europa y Asia. En el continente europeo se generó el 65.71 % de las variedades, entre los años de 1966 y 1971, mientras que el 34.28 % restante se generó en China e India de 1978 a 1989 (Cuadro 5).

CUADRO 5. Variedades de *Dahlia* registradas en la base de datos de la Agencia Internacional de Energía Atómica, datos tomados de la IAEA (IAEA/FAO, 2017).

País	Variedades	Método empleado	Año	Material empleado	Características mejoradas
China	2	Gamma (2)	1989 (2)	No reportado (2)	Características agronómicas y botánicas (2)
Francia	5	Gamma (5)	1970 (5)	Tubérculos (5)	Color de las flores (5)
India	10	Gamma (10)	1978 (10)	Tubérculos (5)	Arquitectura de la planta y color de las flores (5)
Países Bajos	18	Rayos (18)	X 1966 (4), 1967 (5), 1968 (3), 1969 (1), 1970 (1), 1971 (1), 1972 (3)	Tubérculos (13), no reportado (5)	Color de las flores (16), arquitectura de la planta y color de las flores (1), tamaño de las flores(1)

El número entre paréntesis indica el número de variedades liberadas

Para *Alstroemeria* la base de datos de la Agencia Internacional de Energía Atómica registró 35 variedades hasta el año 2017. El 100 % de las variedades se generaron en el continente Europeo, los Países Bajos liberaron el 68.57 % del total y Alemania el 31.43 % restante (Cuadro 6).

CUADRO 6. Variedades de *Alstroemeria* registradas en la base de datos de la Agencia Internacional de Energía Atómica, datos tomados de la IAEA (IAEA/FAO, 2017).

País	Variedades	Método empleado	Año	Material empleado	Característica Mejorada
Alemania	11	Gamma (11)	1979 (1), 1981 (5), 1989 (5)	No reportado (11)	Color de las flores, floración temprana y mayor vida postcosecha (11)
Países Bajos	24	Rayos gamma (1)	X 1970 (2), 1971 (1), 1972 (2), 1973 (1), 1975 (2), 1977 (6), 1978 (1), 1979 (4), 1980 (1), 1983 (2), 1984 (2)	Rizomas (7), estolones (1), no reportado (16)	Color de las flores (22), arquitectura de la planta y tamaño de las flores (1), floración temprana (1)

El número entre paréntesis indica el número de variedades liberadas

PLANTAS NATIVAS DE MÉXICO MEJORADAS EN EL EXTRANJERO

México es un país que cuenta con una amplia diversidad de plantas ornamentales, el germoplasma nativo de géneros como *Dahlia*, *Eustoma*, *Helianthus*, *Polianthes*, entre otros ha sido utilizado para generar en el extranjero diversas variedades de plantas mutantes. En girasol (*Helianthus annuus*) investigadores de Bulgaria desarrollaron 569 formas mutantes al tratar semillas con rayos gamma ^{60}Co y ^{137}Cs (Encheva *et al.*, 2014) y en la base de datos de la Agencia Internacional de Energía Atómica registraron la variedad Rada en el 2006 generada con 8 Gy de rayos gamma ^{137}Cs y la variedad Madan en el año 2008, generada con la dosis de 120 Gy de rayos gamma ^{60}Co (IAEA/FAO, 2017).

En nardo (*Polianthes tuberosa*) los trabajos de mejoramiento genético desarrollados en Iran generaron formas mutantes para la longitud y el peso de las flores a partir de irradiar bulbos maduros con 10 Gy de rayos gamma ^{60}Co (Navabi *et al.*, 2016). En la India generaron mutantes de flores con cuatro, cinco, siete, ocho y once tépalos por flor (Kayalvizhi *et al.*, 2017), así como dos variedades con variegado en las hojas (Datta, 2009).

En Dalia (*Dahlia*) el uso de la mutagénesis inició a partir de la década de los 60. En esta década y a principios de los 70 los Países Bajos registraron 18 variedades en la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA/FAO, 2017) y desarrollaron una gran cantidad de formas mutantes para el color y la forma de las flores (Broertjes y Ballego, 1967). En la India en 1980 seleccionaron 19 mutantes con cambios en el color de la flor (Dube *et al.*, 1980). La gran importancia estética y económica de este género ha estimulado a los fitomejoradores a continuar con el desarrollo de nuevos cultivares hasta la actualidad, en la India se reportan 12 variedades mutantes (De, 2017).

Para *Eustoma gradiflora* en Egipto encontraron que con dosis de 100 o 120 KR de rayos gamma ^{60}Co retrasa la senescencia de las flores seis días e incrementa el número de pétalos por flor, además se generó una amplia gama de colores en las flores (Abou *et al.*, 2017).

Estas investigaciones desarrolladas en otros países han demostrado que la inducción de mutaciones es un método eficiente en la generación de variedades ornamentales comerciales, a partir de germoplasma nativo de México. Sin embargo, en nuestro país son escasos los trabajos reportados sobre mejoramiento genético por mutagénesis.

USO DE LA MUTAGÉNESIS EN MÉXICO

La inducción de variabilidad por mutagénesis en plantas de ornato, en México inició a partir de la década de los setenta en orquídea, rosa y margarita, donde lograron aumentar el número de flores, el tiempo de vida de anaquel, y la producción de pétalos jaspeados, respectivamente. Además, en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares incrementaron la variabilidad genética de dos plantas mexicanas, *Mammillaria sanangelensis*, planta considerada en peligro de extinción y *Sprekelia formosissima*, donde incrementaron el vigor de su sistema radicular (González, 2004). A pesar de los trabajos que se han realizado en mutagénesis, son escasas las publicaciones y uno de los primeros reportes de plantas ornamentales en México es en *Tigridia pavonia* en la que con radiación gamma ^{60}Co a dosis entre 15 y 25 Gy indujeron tres mutantes en la tonalidad del color de las flores, característica de interés para la horticultura ornamental (Díaz *et al.*, 2003).

En tubérculos de nardo (*P. tuberosa*), cultivados *in vitro* e *in vivo*, encontraron que en los tubérculos cultivados *in vitro* con las dosis de 5 y 10 Gy las plántulas incrementaron la altura y la DL_{50} se determinó en 9 Gy. En los tubérculos establecidos *in vivo* se presentaron diferencias en el largo y ancho de las hojas y la DL_{50} se determinó en 25 Gy (Estrada-Basaldúa *et al.*, 2011).

En nochebuena silvestre al irradiar semillas con rayos gamma ^{60}Co se redujo el porte de la planta, característica importante para generar variedades en esta especie, además se incrementó el tamaño de la semilla (Canul-Ku *et al.*, 2012). En crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) al irradiar a 200 Gy de rayos gamma ^{60}Co se obtuvo un mutante enano (Castillo-Martínez *et al.*, 2015). Para girasol (*H. annuus*) solo se ha evaluado el efecto de la radiación gamma ^{60}Co sobre la

geminación de semillas; con 35 Gy se obtuvo el menor porcentaje de germinación (72 %). Como esta fue la dosis más alta no se determinó la DL_{50} y los investigadores concluyeron que es necesario incrementar la dosis de irradiación a 1 KGy (Díaz *et al.*, 2017).

En la orquídea *Laelia autumnalis* al evaluar el efecto de la radiación gamma ^{60}Co sobre la germinación asimbiótica de semillas se encontró que con la dosis de 3 Gy se estimuló la germinación y se formaron promeristemas, hojas y plántulas completas 20, 20 y 10 días, respectivamente, antes que en el tratamiento control (Hernández-Muñoz *et al.*, 2017a). En esta misma especie al irradiar protocormos se encontró que la radiación gamma ^{60}Co a dosis entre 20 y 30 Gy estimuló la formación de clorofila en los protocormos, además la longitud de plántulas se incrementó en 32 % con la dosis de 5 Gy y la DL_{50} para la supervivencia de protocormos y la dosis reductiva media para formación de hojas se determinaron en 53 y 28 Gy, respectivamente (Hernández-Muñoz *et al.*, 2017b).

CONCLUSIONES

El uso de radiación gamma ^{60}Co en la generación de nuevas variedades ornamentales continúa siendo una herramienta importante y ampliamente utilizada en diversos cultivos ornamentales de importancia económica. Esta técnica es una opción eficaz para satisfacer la creciente demanda de nuevas y prometedoras variedades para la industria florícola en México. En *Laelia autumnalis* por las atractivas características de sus flores se pueden inducir variantes adaptadas a las distintas condiciones del país, que cumplan con los estándares internacionales de calidad.

LITERATURA CITADA

- Abdullah, T. L., E. Johari and N. Mohd. 2009. **Changes in flower development, chlorophyll mutation and alteration in plant morphology of *Curcuma alismatifolia* by gamma irradiation.** *American Journal of Applied Sciences* 6(7): 1436-1439.
- Abou, A. M., A. M. Amaal, L. S. Heikal, M. M. Ahmed, A. M. Sami and A. R. AwatefI. 2017. ***In vitro* mutagenesis induction in *Eustoma grandiflorum* plant using gamma radiation.** *Journal of Environmental Science and Technology* 10(4): 175-185.
- Abraham, A. and C. A. Ninan. 1968. **Genetic improvement of the coconut palm: Some problems and possibilities.** *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding* 28: 142-153.
- The International Association of Horticultural Producers (AIPH). 2014. http://aiph.org/aiph_new/aiph-and-unionfleurs-launch-international-statistics-flowers-andplants-2014/ (consultado el 15 de junio de 2018).
- Al-Safadi, B., Z. Ayyoubi and D. Jawdat. 2000. **The effect of gamma irradiation on potato microtuber production *in vitro*.** *Plant cell, tissue and organ culture* 61(3): 183-187.
- Annicchiarico, P. 2002. **Genotype x Environment Interactions: Challenges and Opportunities for Plant Breeding and Cultivar Recommendations.** Food Agriculture Organization of the United Nations (FAO) Rome, Italy.
- Azadi, P., H. Bagheri, A. M. Naloussi, F. Nazari and S. F. Chandler. 2016. **Current status and biotechnological advances in genetic engineering of ornamental plants.** *Biotechnology advances* 34(6): 1073-1090.

- Barakat, M. N. and H. El-Sammak. 2011. ***In vitro* mutagenesis, plant regeneration and characterization of mutants via RAPD analysis in Baby's breath *Gypsophila paniculata* L.** *Australian Journal of Crop Science* 5(2): 214-222.
- Bermúdez-Carabaloso, I., L. R. Garcia, N. Veitía, D. Torres, Y. Padrón, C. Romero and P. Orellana. 2010. **Mutant plantains (*Musa spp.*) with height reduction obtained by *in vitro* mutagenesis.** *Euphytica* 176(1): 105-112.
- Bhat, I. A., U. J. Pandit, I. A. Sheikh and Z. U. Hassan. 2016. **Physical and chemical mutagenesis in *Linum usitatissimum* L. to induce variability in seed germination, survival and growth rate traits.** *Current Botany* 7: 28-32.
- Brar, D. S. and S. M. Jain. 1998. **Somaclonal variation: Mechanism and applications in crop improvement.** En Jain, S. M., Brar, D. S. and Ahloowalia B. S. (Eds.). **Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement.** Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 15-37.
- Broertjes, C. and J. M. Ballego. 1967. **Mutation breeding of *Dahlia variabilis*.** *Euphytica* 16(2): 171-176.
- Canul-Ku, J., F. García-Pérez, E. Campos-Bravo, E. J. Barrios-Gómez, E. De la Cruz-Torres, J. M. García-Andrade, F. J. Osuna-Canizalez y S. Ramírez-Rojas. 2012. **Efecto de la irradiación sobre nochebuena silvestre (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) en Morelos.** *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3(8): 1495-1507.
- Castillo-Martínez, C. R., E. De la Cruz-Torrez, G. Carrillo-Castañeda y C. H. Avendaño-Arrazate, C. H. (2015). **Inducción de mutaciones en crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) usando radiación gamma y etil metano sulfonato.** *Agroproductividad* 8(2): 60-64.

- Chakravarty, B. and S. Sen. 2001. **Enhancement of regeneration potential and variability by γ -irradiation in cultured cells of *Scilla indica*.** *Biologia plantarum* 44(2): 189-193.
- Chopra, V. L. 2005. **Mutagenesis: Investigating the process and processing the outcome for crop improvement.** *Current Science* 89(2): 353- 359.
- Datta, S. K. 2009. **A report on 36 years of practical work on crop improvement through induced mutagenesis.** *In: Shu Q. Y. (Ed.) Induced plant mutations in the genomics.* Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations. pp: 253-256.
- Datta, S. K. and J. A. Teixeira da Silva. 2006. **Role of induced mutagenesis for development of new flower colour and type in ornamentals.** *In: Teixeira da Silva J. A. (Ed.) Floriculture, ornamentals and plant biotechnology: Advances and topical issues. Mutations and mutagénesis.* UK: Global Science Books Ltd. Isleworth. pp. 640-645.
- De, L. C. 2017. **Improvement of ornamental plants - a review.** *International Journal of Horticulture* 7(22): 180-204.
- Deshpande, K. N., S. S. Mehetre and S. D. Pingle. 2010. **Effect of different mutagens for induction of mutations in mulberry.** *Asian Journal of Experimental Biological Sciences* 1(2)104-108.
- Díaz, L. E., A. Morales R., A. Olivar H., P. Hernández H., J. A. Juárez C., J. F. León R, N. Francisco F., H. Santiago S., C. H. Bravo D., J. M. Campos P., H. R. Bravo D., E. T. Díaz O. and J. M. Loeza C. 2017. **Gamma irradiation effect of ^{60}Co on the germination of two subtropical species in the Tehuacán-Cuicatlán Valley.** *International Journal of Advanced Engineering Research and Science* 4(8): 56-61.
- Díaz, L. E., J. Pichardo R., E. De la Cruz, T., T. Norman, M., F. Sandoval R. y L. Vázquez G. 2003. **Variabilidad inducida en *Tigridia pavonia* (L. f.) D.C. var. Sandra por**

- irradiación de bulbos con rayos gamma de ^{60}Co .** *Revista Chapingo Serie Horticultura* 9(2): 235-241.
- Dhaliwal A. K., A. Mohan, G. Sidhu, R. Maqbool and K. S. Gill. 2015. **An ethylmethane sulfonate mutant resource in pre-green revolution hexaploid wheat.** *PLoS One* 10(12): 1-15.
- Dube, S., K. Das P. K. Dey A. and N. Bid N. 1980. **Varietal improvement of *Dahlia* by gamma radiation.** *Indian Journal of Horticulture* 37(1): 82-87.
- Encheva, J., G. Georgiev, N. Nenova, D. Valkova, G. Georgiev, P. Peevska and V. Encheva. 2014. **Application of classical methods at sunflower breeding program in Dobroudja Agricultural Institute General-Toshevo.** *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri* 6(6): 673-681.
- Estrada-Basaldúa, J. A., M. E. Pedraza-Santos, E. De la Cruz-Torres, A. Martínez-Palacios, C. Sáenz-Romero y J. L. Morales-García. 2011. **Efecto de rayos gamma ^{60}Co en nardo (*Polianthes tuberosa* L.).** *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2(3), 445-458.
- González, J. J. 2004. **La tecnología nuclear en el mejoramiento de las plantas.** *Ciencia* 55(2), 43-52.
- Gupta, Y. C. and R. Agnihotri. 2017. **Vistas in breeding of roses.** In: Malhotra S. K. and Ram L. (Eds.) **Floriculture and Landscape Gardening.** India: Central Institute of Horticulture. pp. 152-156.
- Hernández-Muñoz, S., M. E. Pedraza-Santos, P. A. López, E. De la Cruz-Torres, A. Martínez-Palacios, S. P. Fernández-Pavía and A. T. Chávez-Bárcenas. 2017a. **Estimulación de la germinación y desarrollo *in vitro* de *Laelia autumnalis* con rayos gamma.** *Revista Fitotecnia Mexicana.* 40(3): 271 – 283.

- Hernández-Muñoz, S., M. E. Pedraza-Santos, P. A. López, E. De la Cruz-Torres, S. P. Fernández-Pavía, A. Martínez-Palacios y M. Martínez-Trujillo. 2017b. **Determinación de la DL₅₀ y GR₅₀ con rayos gamma (⁶⁰Co) en protocormos de *Laelia autumnalis* in vitro.** *Agrociencia*. 51(5), 507-524.
- Honda, I., K. Kikuchi, S. Matsuo, M. Fukuda, H. Saito, H. Ryuto, N. Fukunishi and T. Abe. 2006. **Heavy-ion-induced mutants in sweet pepper isolated by M1 plant selection.** *Euphytica* 152(1): 61-66.
- Hunter, C. T., M. Suzuki, J. Saunders, S. Wu, A. Tasi, D. R. McCarty and K. E. Koch. 2014. **Phenotype to genotype using forward-genetic Mu-seq for identification and functional classification of maize mutants.** *Frontiers in Plant Science* 4 (545): 1-12.
- International Atomic Energy Agency (IAEA) (2017). Consultado 19-06-2017 en <https://mvd.iaea.org/#!/Search>
- International Atomic Energy Agency (IAEA)/ Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (1977). **Manual on mutation breeding.** Technical report series No. 119, (2a Ed.) IAEA Vienna.
- Jankowicz-Cieslak, J., C. Mba and B. J. Till. 2017. **Mutagenesis for crop breeding and functional genomics.** In: Jankowicz-Cieslak, J.T., Tai H., Kumlehn J. and Till B. J. (Eds). *Biotechnologies for plant mutation breeding*. Springer International Publishing. pp. 3-18.
- Jankowicz-Cieslak, J., O. A. Huynh, S. Bado, M. Matijevic and B. J. Till. 2011. **Reverse-genetics by TILLING expands through the plant kingdom.** *Emirates Journal of Food and Agriculture* 23(4): 290-300.
- Kayalvizhi, K., M. Kannan and M. Ganga. 2017. **Effect of physical and chemical mutagens on morphological characters in M1V2 generation of tuberose (*Polianthes tuberosa***

- L.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6(4): 2492-2499.
- Kearsey, M. J. and H. S. Pooni. 1998. **The genetical analysis of quantitative traits**. UK: Stanley Thornes. Pp. 381.
- Kimura, S. and K. Sakaguchi. 2006. **DNA repair in plants**. *Chemical Reviews* 106(2): 753-766.
- Kirik, A., S. Salomon and H. Puchta. 2000. **Species-specific double-strand break repair and genome evolution in plants**. *The EMBO Journal* 19(20): 5562-5566.
- Kodym, A. and R. Afza. 2003. **Physical and chemical mutagenesis**. *Plant Functional Genomics* 236: 189-203.
- Kovacs, E. and A. Keresztes. 2002. **Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells**. *Micron* 33(2): 199-210.
- Kulkarni, V. M., T. R. Ganapathi, P. Suprasanna and V. A. Bapat. 2007. **In vitro mutagenesis in banana (*Musa spp.*) using gamma irradiation**. In: Jain, S. M., Haggma H. (Eds), **Protocols for micropropagation of woody trees and fruits**. Springer Netherlands. pp. 543-559.
- Lagoda, P. J. L. 2012. **Effects of radiation on living cells and plants**. In: Shu, Q. Y., Forster B. F., Nakagawa H. (Eds.) **Plant mutation breeding and biotechnology**. Italy CAB International and FAO. pp. 123–134.
- Mac, K. J. 1954. **Mutation breeding in polyploid cereals**. *Acta Agriculturae Scandinavica* 4(1): 549-557.
- Maghuly, F., S. Bado, J. Jankowicz-Cieslak and M. Laimer. 2017. **Chemical and physical mutagenesis in *Jatropha curcas***. In: Jankowicz-Cieslak, J., Tai T., Kumlehn J. and B. Till (Eds.) **Biotechnologies for Plant Mutation Breeding**. Springer International Publishing. pp. 21-38.

- Malhotra, S. K. 2017. **Emerging floriculture industry in India.** En: Malhotra, S. K. and Ram L. (Eds.) **Floriculture and Landscape Gardening.** India: Central Institute of Horticulture. pp. 32-40.
- Maluszynski, M., K. Nichterlein, L. Van-Zanten and B. S. Ahloowalia. 2000. **Official released mutant varieties-the FAO/IAEA database.** *Mutation Breeding* 12:1-88.
- Mba, C. 2013. **Induced mutations unleash the potentials of plant genetic resources for food and agriculture.** *Agronomy* 3(1), 200-231.
- Mba, C., R. Afza, P. J. L. Lagoda and J. Darwig. 2005. **Strategies of the joint FAO/IAEA programme for the use of induced mutations for achieving sustainable crop production in member states.** *In: Proceedings of the Second International Seminar on Production, Commercialisation and Industrialization of Plantain.* pp. 289-291.
- Mba, C, R. Afza and Q. Y. Shu. 2012. **Mutagenic radiations: X-rays, ionizing particles and ultraviolet.** *In: Shu, Q. Y., Forster, B. F., Nakagawa H. (Eds.) Plant mutation breeding and biotechnology.* Italy CAB International and FAO. pp. 83–106.
- Morita, R., M. Kusaba, S. Iida, H. Yamaguchi, T. Nishio and M. Nishimura. 2009. **Molecular characterization of mutations induced by gamma irradiation in rice.** *Genes and Genetic Systems* 84(5): 361-370.
- Nakatsuka, T., M. Nishihara, K. Mishiba and S. Yamamura. 2005. **Two different mutations are involved in the formation of white-flowered gentian plants.** *Plant Science* 169(5): 949-958.
- Navabi, Y., M. Norouzi, M. Arab and S. D. Daylami. 2016. **Mutagenesis via exposure to gamma-rays in tuberose (*Polianthes Tuberosa*).** *Electronic Journal of Biology* 12(2): 168-172.

- Noman, A., M. Aqeel, J. Deng, N. Khalid, T. Sanaullah and H. Shuilin. 2017. **Biotechnological advancements for improving floral attributes in ornamental plants.** *Frontiers in Plant Science* 8(530): 1-15.
- Pacher, M. and H. Puchta. 2017. **From classical mutagenesis to nuclease-based breeding—directing natural DNA repair for a natural end-product.** *The Plant Journal* 90(4): 819-833.
- Qadeer, M., I. A. Hafiz, N. A. Abbasi and T. Ahmad. 2015. **Evaluating and validating the protocol for gamma radiation induced mutations in floral distinct rosa spp.** *Pakistan Journal of Botany* 47(5): 1847-1854.
- Ramesh, H. L., V. N. Y. Murthy and Munirajappa. 2013. **Gamma ray induced radio sensitivity in three different mulberry (*Morus*) genotypes.** *American Journal of Plant Sciences* 4(7): 1351-1358.
- Roldán-Arjona, T. and R. Ariza R. 2009. **Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants.** *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 681(2): 169-179.
- Sarmah, D., S. Kolukunde, M. Sutradhar, B. K. Singh, T. Mandal and N. Mandal. 2017. **A review on: *In vitro* cloning of orchids.** *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6(9): 1909-1927.
- Senapati, S. K., A. Mahapatra and G. R. Rout. 2008. ***In vitro* mutation in *Rosa hybrida* cv. ‘Pusa Gaurav’ and Selection through RAPD and ISSR Markers.** *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 2(2): 55-59.
- Shikazono, N., Y. Yokota, S. Kitamura, C. Suzuki, H. Watanabe, S. Tano and A. Tanaka. 2003. **Mutation rate and novel tt mutants of *Arabidopsis thaliana* induced by carbon ions.** *Genetics* 163(4): 1449-1455.

- Singh, H. P. 2017. **Landscape gardening for ecological and aesthetic gains**. In: Malhotra, S. K. and L. Ram (Eds.) **Floriculture and landscape gardening** India: Central Institute of Horticulture. pp. 1-10.
- Stadler, L. J. 1928a. **Genetic effects of X-rays in maize**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 14(1): 69-75.
- Stadler, L. J. 1928b. **Mutations in barley induced by X-rays and radium**. *Science* 68(1756): 186-187.
- Taheri, S., T. L. Abdullah, Z. Ahmad and N. A. P. Abdullah. 2014. **Effect of acute gamma irradiation on *Curcuma alismatifolia* varieties and detection of DNA polymorphism through SSR Marker**. *BioMed Research International* 2(2): 55-59.
- Tangpong, P., T. Taychasinpitak, C. Jompuk and P. Jompuk. 2009. **Effects of acute and chronic gamma irradiations on *in vitro* culture of *Anubias congensis* NE Brown**. *Kasetsart Journal* 43(3): 449-457.
- Till, B. J., J. Cooper, T. H. Tai, P. Colowit, E. A. Greene, S. Henikoff and L. Comai. 2007. **Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING**. *BMC Plant Biology* 7(19): 1-12.
- Urrea, A. I. and S. M. Ceballos. 2005. **Empleo de las radiaciones gamma en la inducción de variabilidad genética en *Heliconia psittacorum***. *Actual Biology* 27 (82): 17-23.
- Wi, S. G., B. Y. Chung, J. H. Kim, M. H. Baek, D. H. Yang, J. W. Lee and J. S. Kim. 2005. **Ultrastructural changes of cell organelles in *Arabidopsis* stems after gamma irradiation**. *Journal of Plant Biology* 48(2): 195-200.
- Yamaguchi, H., A. K. Shimizu, K. Degi and T. Morishita. 2008. **Effects of dose and dose rate of gamma ray irradiation on mutation induction and nuclear DNA content in chrysanthemum**. *Breeding Science* 58(3): 331-335.

VII. CAPÍTULO II

ESTIMULACIÓN DE LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO *in vitro* DE *Laelia autumnalis* CON RAYOS GAMMA

RESUMEN

La germinación natural de las semillas de la orquídea *L. autumnalis* es baja, porque requiere condiciones específicas del árbol hospedero y factores ambientales favorables. La germinación asimbiótica *in vitro* es un método de propagación eficiente; sin embargo, el desarrollo de las plántulas requiere de uno a dos años. El objetivo fue evaluar el efecto de la radiación gamma ^{60}Co para estimular la germinación de semillas y el desarrollo *in vitro* de plántulas de *L. autumnalis*. Se irradiaron 22 frutos a diferentes dosis (3 a 30 Gy, con intervalos de 3 Gy), además de un tratamiento sin irradiar utilizado como testigo. Las semillas se cultivaron en medio Murashige y Skoog sin fitohormonas. El diseño experimental fue completamente al azar con 16 a 32 repeticiones; la unidad experimental fue un frasco con 20 mg de semillas. A los cinco días y posteriormente cada 10 días se cuantificó el número de semillas en las etapas de imbibición, formación de protocormos fotosintéticos, protocormos en diferenciación, desarrollo de promeristemas, hojas y plántulas. Se realizó un análisis de varianza y prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Las semillas irradiadas entre 3 y 15 Gy formaron 61 % más protocormos fotosintéticos que las semillas sin tratar. Las semillas irradiadas con 3, 15 y 18 Gy formaron 73 % más promeristemas. Todos los protocormos tratados con 3 Gy formaron hojas 60 días después de la siembra (dds); en contraste, sólo 12.5 % de las semillas no tratadas formaron hojas. El 66.5 % de las semillas tratadas con 15 Gy desarrollaron plántulas a los 80 dds. Se confirmó el efecto

radioestimulante de la radiación gamma a dosis bajas; con 3 Gy se formaron promeristemas, hojas y plántulas completas 20, 20 y 10 días, respectivamente, antes que en el tratamiento control. La radiación a dosis superiores fue negativa al retrasar la germinación y el desarrollo de plántulas.

Palabras clave: *Laelia autumnalis*, cultivo *in vitro*, germinación asimbiótica, radiación gamma, radioestimulación.

ABSTRACT

GAMMA RAY STIMULATION OF GERMINATION AND *in vitro* DEVELOPMENT OF *Laelia autumnalis*

Natural seed germination of *L. autumnalis* orchid is low because it requires specific conditions of the host tree and favorable environmental factors. *In vitro* asymbiotic germination is an efficient propagation method; however, seedling development requires one to two years. The aim of this research was to evaluate the effect of ^{60}Co gamma radiation to stimulate *in vitro* germination and seedling development of *L. autumnalis*. Twenty-two fruits were irradiated at different doses (3 to 30 Gy, with intervals of 3 Gy), in addition to a non-irradiated treatment used as control. Seeds were cultured in Murashige and Skoog medium without phytohormones. The experimental design was completely randomized with 16 to 32 replications; the experimental unit was a flask with 20 mg of seeds. At five days and then every 10 days the number of seeds in the stages of imbibition, photosynthetic protocorms formation, protocorms in differentiation, development of promeristems, leaves and seedlings was quantified. Analysis of variance and Tukey range test ($\alpha = 0.05$) were performed. Seeds irradiated between 3 and 15 Gy formed 61 % more photosynthetic protocorms than untreated seeds. Seeds irradiated with 3, 15 and 18 Gy formed 73 % more promeristems. All protocorms treated with 3 Gy formed leaves 60 days after sowing (das); in contrast, only 12.5 % of untreated seeds formed leaves. About 66.5 % of the seeds treated with 15 Gy developed seedlings at 80 das. The radiostimulating effect of gamma radiation was confirmed at low doses; with 3 Gy promeristems, leaves and complete seedlings were formed 20, 20 and 10 days, respectively, earlier than the control treatment. Radiation at higher doses was negative by delaying germination and seedling development.

Index words: *Laelia autumnalis*, *in vitro* culture, asymbiotic germination, gamma radiation, radio stimulation.

INTRODUCCIÓN

Las orquídeas (*Laelia autumnalis*) son plantas de difícil reproducción natural porque sus semillas diminutas tienen escasa o nula reserva de nutrientes y requieren de la simbiosis con hongos micorrizógenos para su germinación, los cuales no siempre están presentes debido a la perturbación de su hábitat. Además, no todas las semillas de una cápsula se forman por completo o son fértiles (Verma *et al.*, 2014). En muchos casos el embrión es pequeño con relación a la testa, por lo que hasta 96 % del volumen de la semilla puede estar ocupado por aire, lo que dificulta que la humedad llegue al embrión (Arditti, 2008). En la germinación de algunas especies de orquídeas influye la concentración de ácido abscísico (ABA) presente en la semilla, de tal forma que existe una correlación negativa entre la concentración de ABA y el porcentaje de germinación (Lee *et al.*, 2007); sumado a estas características, las semillas requieren de condiciones específicas del árbol hospedero y condiciones ambientales favorables (Pierik, 1990), debido a esto sólo germina el 1 % de las semillas producidas (Verma *et al.*, 2014), y de éstas, aproximadamente 0.4 plántulas por cada planta madre alcanzan la etapa reproductiva (Batty, 2001).

Las técnicas de cultivo *in vitro* han contribuido a mejorar la propagación de orquídeas a partir de semillas, tanto en especies nativas como en híbridos. En el género *Laelia* se ha logrado la germinación *in vitro* en *L. speciosa* (Aguilar-Morales y López-Escamilla, 2013), *L. anceps* ssp. *dawsonii* en la cual se logró la formación de embriones somáticos (Lee *et al.*, 2010) y en *L. eyermaniana* donde se observó el desarrollo morfológico desde la germinación hasta la aclimatación *ex vitro* (Francisco *et al.*, 2011).

En los casos anteriores el tiempo que transcurre entre la germinación y la obtención de plantas listas para aclimatar es hasta de dos años, lo que incrementa los costos en el manejo del material vegetal debido a los constantes ciclos de subcultivos necesarios para el adecuado desarrollo de las plántulas, por lo que es necesario desarrollar alternativas que permitan acortar este tiempo.

La combinación de las técnicas de cultivo *in vitro* con radiaciones ionizantes puede ser un método rápido y eficaz para incrementar y acelerar la germinación de las semillas. Cuando se emplean las radiaciones gamma en dosis bajas se estimula el proceso fisiológico de la germinación y el desarrollo de las plántulas (Araújo *et al.*, 2016), también se acelera la proliferación de células, la actividad enzimática y el crecimiento celular (Chakravarty y Sen, 2001). En lechuga (*Latuca sativa* var. *capitata*) los rayos gamma a dosis de 30 Gy (Gray) incrementaron 25 % el porcentaje final de germinación y 75 % el índice de germinación de las semillas (Marcu *et al.*, 2013); además, en plantas de caupí (*Vigna sinensis*) generadas a partir de semillas irradiadas con 5 krad (50 Gy) de rayos gamma se incrementó la longitud de brotes y raíces y la producción de biomasa en condiciones salinas (Mohammed *et al.*, 2012).

En semillas de sándalo rojo (*Pterocarpus santalinus*) irradiadas con 50 Gy la germinación fue más del doble (51 %) que en el tratamiento control (23 %) y una velocidad de germinación mayor se presentó en las semillas tratadas con 25 Gy (Akshatha y Chandrashekar, 2013). Al evaluar la radiosensibilidad de semillas de estevia (*Stevia rebaudiana*) cultivar KH-IAN VC-142 (Eireté) con dosis de 10 a 90 Gy, se observó que la dosis de 10 Gy estimuló la germinación de semillas en 52 %, es decir 33 % más que el control (González y Nacayama, 2015). En semillas de arjuna (*Terminalia arjuna*) con dosis de 25, 50 y 100 Gy se duplicó el porcentaje de germinación

(34 %) en comparación con el testigo (16 %), un número mayor de hojas (12) se observó con las dosis de 100 y 200 Gy y un mayor peso seco (1.04 y 0.93 g) se registró con las dosis de 25 y 50 Gy (Akshatha *et al.*, 2013).

En la orquídea *L. autumnalis* no existen reportes del efecto de la radiación gamma sobre su germinación. Esta especie es originaria de México, presenta flores atractivas color magenta; además, tiene potencial ornamental para usarse como planta para flor de corte o para cultivo en macetas. Las laelias, aunque se propagan con éxito a partir de semillas germinadas *in vitro*, el periodo para el desarrollo de plantas listas para aclimatarse en invernadero es largo, por lo menos de dos años (Aguilar-Morales y López-Escamilla, 2013). La implementación de estrategias que aceleren el desarrollo de esta especie es una condición importante para su conservación natural o explotación a nivel comercial. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto de la irradiación gamma ^{60}Co sobre la germinación y desarrollo *in vitro* de *L. autumnalis*. La hipótesis fue que la radiación gamma ^{60}Co en dosis bajas estimula la germinación y desarrollo *in vitro* de semillas de la orquídea *L. autumnalis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 22 frutos (cápsulas) de plantas de *Laelia autumnalis*, provenientes de la colección del Banco de Germoplasma del Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos.

Irradiación con rayos gamma ^{60}Co

Las cápsulas se irradiaron con rayos gamma ^{60}Co a 10 dosis (3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 y 30 Gy), con un irradiador Gammacell 220 (Hungria), en el Departamento del Irradiador

Gamma del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), además de un tratamiento testigo sin irradiar.

Medio de cultivo

Se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) (MS), sin fitohormonas y adicionado con sacarosa (30 g L^{-1}), mioinositol (100 mg L^{-1}), tiamina (0.4 mg L^{-1}) y agar (6 g L^{-1}), el pH se ajustó a 5.7 ± 0.1 con NaOH 1 N. Se vertieron 20 mL de medio en frascos de vidrio de 100 mL de capacidad y se esterilizaron en autoclave durante 15 min a 1.2 kg cm^{-2} de presión y $121 \text{ }^\circ\text{C}$.

Establecimiento del cultivo aséptico

Las 22 cápsulas irradiadas (dos frutos por cada dosis de irradiación más dos frutos del testigo) se lavaron con agua y detergente, y se desinfectaron con hipoclorito de sodio comercial 60 % v/v (6 % de ingrediente activo) durante 20 min. En una campana de flujo laminar se retiró la solución desinfectante y se hicieron tres enjuagues con agua estéril. Las cápsulas se abrieron con bisturí y se colocaron aproximadamente 20 mg de semilla por frasco con medio de cultivo. La incubación se efectuó a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ con fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad y radiación fotosintéticamente activa de $45 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ proporcionada por lámparas de luz fluorescente blanca de 75 W. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 11 tratamientos y 16 a 32 repeticiones. El número de repeticiones varió en función de la cantidad de semillas contenidas en cada cápsula. La unidad experimental fue cada uno de los frascos con 20 mg de semillas (entre 500 y 700 semillas).

Variables evaluadas

A los 5 días después de la siembra (dds) y posteriormente cada 10 d, se seleccionaron tres áreas de 1 cm² en cada frasco de cultivo y mediante observación en un microscopio estereoscópico marca Leica S6D (Alemania) se cuantificó el número total de semillas en las etapas de germinación (imbibición, formación de protocormos fotosintéticos, protocormos en diferenciación y desarrollo de promeristemos), formación de hojas y formación de plántulas. Con la suma de semillas en cada etapa fenológica se obtuvo el número total de semillas en 1 cm², que se usó como denominador para obtener el porcentaje de imbibición (IM) de la siguiente forma: $IM = (\text{Número de semillas imbibidas} / \text{Número total de semillas en 1 cm}^2) \times 100$. En las variables formación de protocormos fotosintéticos (FPF), protocormos en diferenciación (PD), desarrollo de promeristemos (DP), formación de hojas (FH) y plántulas (FP) se utilizó el mismo procedimiento.

La velocidad de imbibición (VIM), de formación de protocormos fotosintéticos (VFPP), protocormos en diferenciación (VPD), desarrollo de promeristemos (VDP), formación de hojas (VFH) y de formación de plántulas (VFP), se calcularon al dividir el porcentaje máximo de semillas en cada etapa fenológica entre el número de días que las semillas requirieron para obtener ese porcentaje, de acuerdo con la fórmula propuesta por González-Zertuche y Orozco-Segovia (1996).

$$\text{Velocidad de germinación} = \frac{\text{Porcentaje máximo de germinación obtenido en cada etapa}}{\text{Número de días para llegar al porcentaje máximo}}$$

Análisis estadístico

Los datos de las variables respuesta obtenidos en porcentajes se normalizaron mediante transformación a raíz cuadrada más uno y se procesaron mediante un análisis de varianza con el procedimiento GLM y se utilizó la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) para la comparación de medias entre tratamientos. El análisis estadístico se realizó con el programa SAS versión 9.0 (SAS Institute, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fenología de la germinación *in vitro* de semillas irradiadas de *L. autumnalis*

El proceso de imbibición se presentó entre 5 y 40 dds, en esta etapa las semillas tuvieron un incremento aproximado de 50 % en su tamaño, el embrión se observó de color amarillo claro, con forma globosa, y se separó de la testa para formar una estructura globular compacta y translúcida (Fig. 1A); este incremento de tamaño fue ocasionado por la absorción de agua, fenómeno que se ha documentado en semillas de orquídeas como *Chloraea crispa* (Verdugo *et al.*, 2007), *Oncidium longicornu*, *O. bifolium* (Billard *et al.*, 2014) y *L. speciosa* (Aguilar-Morales y López-Escamilla, 2013), en las cuales la germinación inició a los 6, 4, 6 y 10 días, respectivamente.

Este proceso de imbibición asincrónica presentado en *L. autumnalis* se ha reportado en otras especies de orquídeas como *L. speciosa*, donde la imbibición inició a los 10, 16, 114 y 178 dds en los medios MS al 50 %, MS 100 %, KC (Knudson C) al 50 % y KC al 100 %, respectivamente (Aguilar-Morales y López-Escamilla, 2013). La imbibición asincrónica puede ser atribuida a la permeabilidad inconsistente de las testas, por las grietas secas que a menudo se presentan en las semillas de las orquídeas epífitas (Van-Waes y Debergh, 1986); además, la testa

puede contener suberina la cual contribuye a la impermeabilidad (Kauth *et al.*, 2008). Durante la maduración de la semilla se forma una capa de cutina y lignina en el tegumento interno que puede servir para reforzar la testa; sin embargo, entre más ajustado esté el embrión por la testa, mayor es la inhibición del crecimiento de éste por restricción mecánica o química (Yamazaki y Miyoshi, 2006).

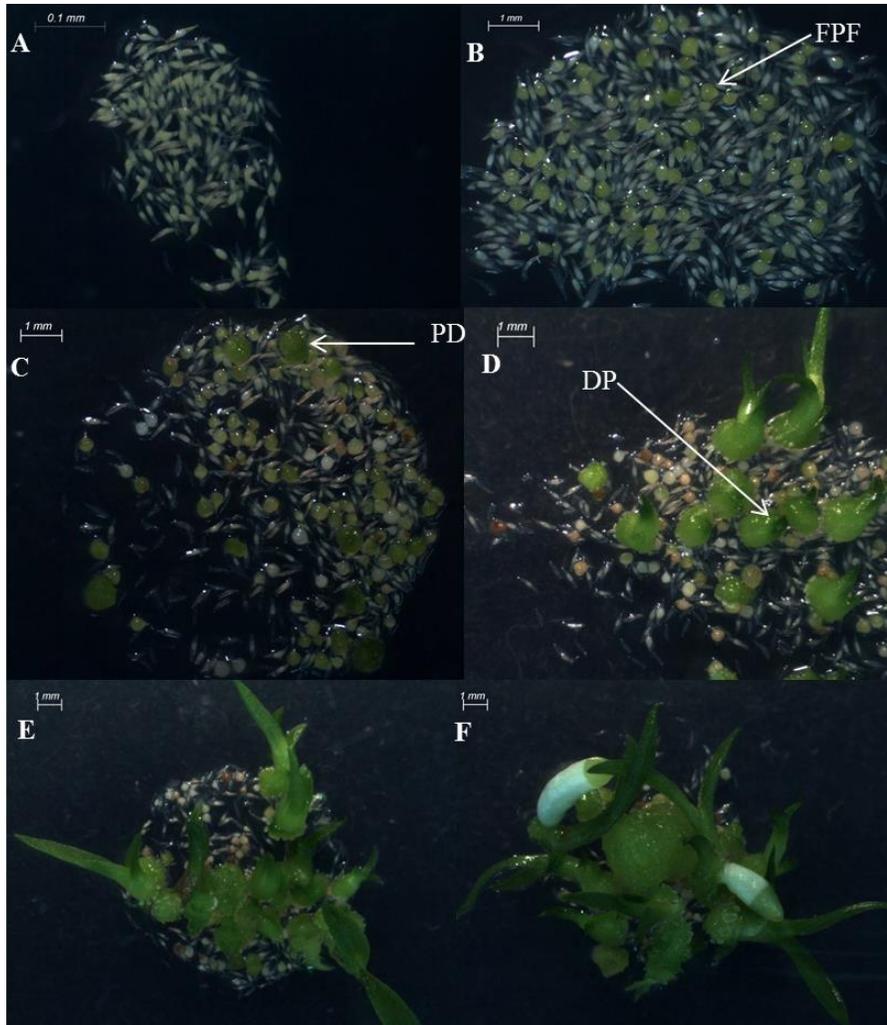


Figura 1. Etapas fenológicas en la germinación de semillas de *Laelia autumnalis* A) imbibición, B) formación de protocormos fotosintéticos (FPF), C) protocormos en diferenciación (PD), D) desarrollo de promeristemos (DP), E) formación de hojas y F) formación de plántulas.

La formación de protocormos fotosintéticos (FPF) inició a los 10 dds y concluyó hasta los 60 dds (Fig. 2). Esta fase se caracterizó por el cambio de color del embrión de blanco y amarillo claro, a verde (Fig. 1B). La formación de protocormos diferenciados (FPD) inició a los 20 y concluyó a los 70 dds (Fig. 2). En esta etapa los protocormos incrementaron su longitud y circunferencia, y se intensificó la coloración verde como se aprecia en la Figura 1C, la cual indica la presencia de clorofila y por lo tanto de cloroplastos (Francisco *et al.*, 2011).

La etapa fenológica de desarrollo de promeristemos (DP) se observó a partir de los 30 y hasta los 90 dds (Fig. 2). Esta fase inició cuando en los protocormos se formó un complejo de células meristemáticas de color verde, el cual dio origen al primordio foliar (Fig. 1C). En *L. speciosa* se reportan cambios similares en esta etapa a los 202 dds, a la cual denominan protocormo inicial (Aguilar-Morales y López-Escamilla, 2013).

La formación de hojas (FH) ocurrió a los 40 dds y concluyó a los 110 dds (Figura 2), estos órganos se originaron del protocormo (Fig. 1D). La formación de plántulas (FP) se presentó entre los 70 y 120 dds (Fig. 2). Esta fase inició con el desarrollo de raíces, el primordio de la raíz se desarrolló cerca de la base de las hojas y las raíces se observaron de color blanco con el ápice verde.

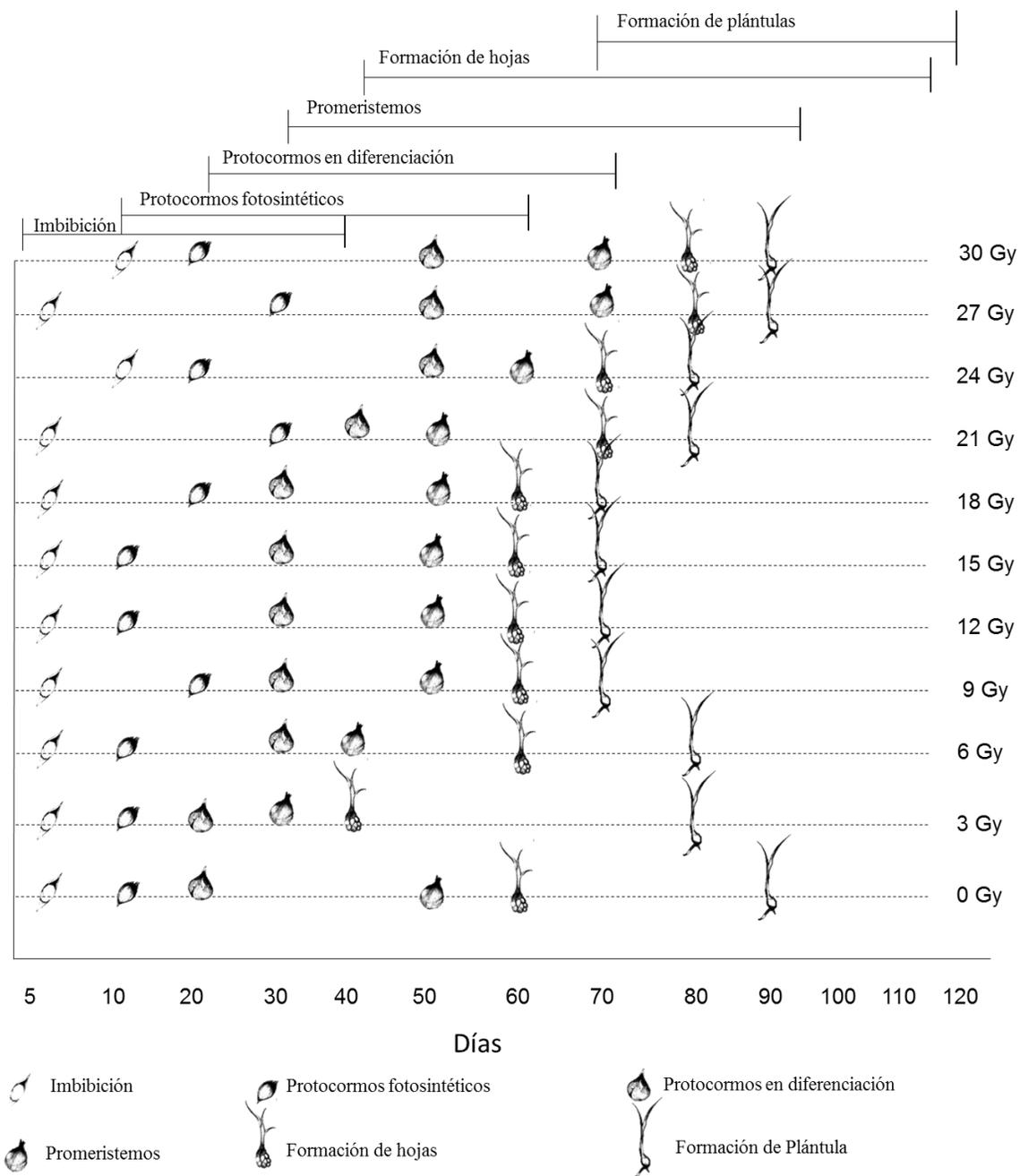


Figura 2. Fenología de la germinación de semillas, formación de hojas y plántulas de *Laelia autumnalis* irradiadas con rayos gamma de 3 a 30 Gy y un testigo sin irradiar. Las figuras marcan el inicio de cada etapa y las líneas de la parte superior indican el inicio y final de cada etapa.

Efecto de la irradiación gamma ^{60}Co sobre la germinación de semillas *in vitro*

La radiación mostró un efecto significativo en la germinación y el desarrollo de las plántulas. En la etapa inicial (5 dds), las semillas sin irradiar fueron las primeras en llegar a 100 % de imbibición (IM), estadísticamente similares a las semillas tratadas con 3, 6 y 12 Gy que presentaron 73, 85 y 57 % de semillas hidratadas. Conforme se incrementó la dosis de radiación se redujo el IM (Fig. 3A), en las dosis de 24 y 30 Gy las semillas iniciaron este proceso a los 10 dds (Figura 3B). Entre los 20 y 30 dds la totalidad de las semillas presentaron 100 % de IM, excepto aquellas tratadas con 24 y 30 Gy que registraron 72.5 y 82 % (Fig. 3C). La dosis de irradiación aplicada influyó en la duración de la etapa de absorción de agua, las semillas tratadas con 30 Gy tardaron 35 d más que las semillas no irradiadas. La mayor velocidad de absorción por día se presentó con el tratamiento sin irradiar (20 %), estadísticamente similar a la dosis de 6 Gy (17.5 %), pero superior a las semillas irradiadas con dosis de 9 a 30 Gy, que presentaron menos del 10 % de IM por día (Fig. 3D).

La imbibición es un fenómeno físico y puede presentarse aún en semillas con embriones muertos. La absorción inicial implica la retención de agua por coloides, lo que suaviza las cubiertas de la semilla e hidrata al protoplasma, provoca el hinchamiento y el posible rompimiento de las cubiertas (Hartmann *et al.*, 2010); sin embargo, el efecto de la radiación sobre la imbibición de las semillas puede ser atribuido al contenido de humedad en las semillas, ya que la radiación interactúa con las moléculas del agua para producir radicales libres en las células y el efecto varía en función de la dosis de radiación (El-Fiki *et al.*, 2015).

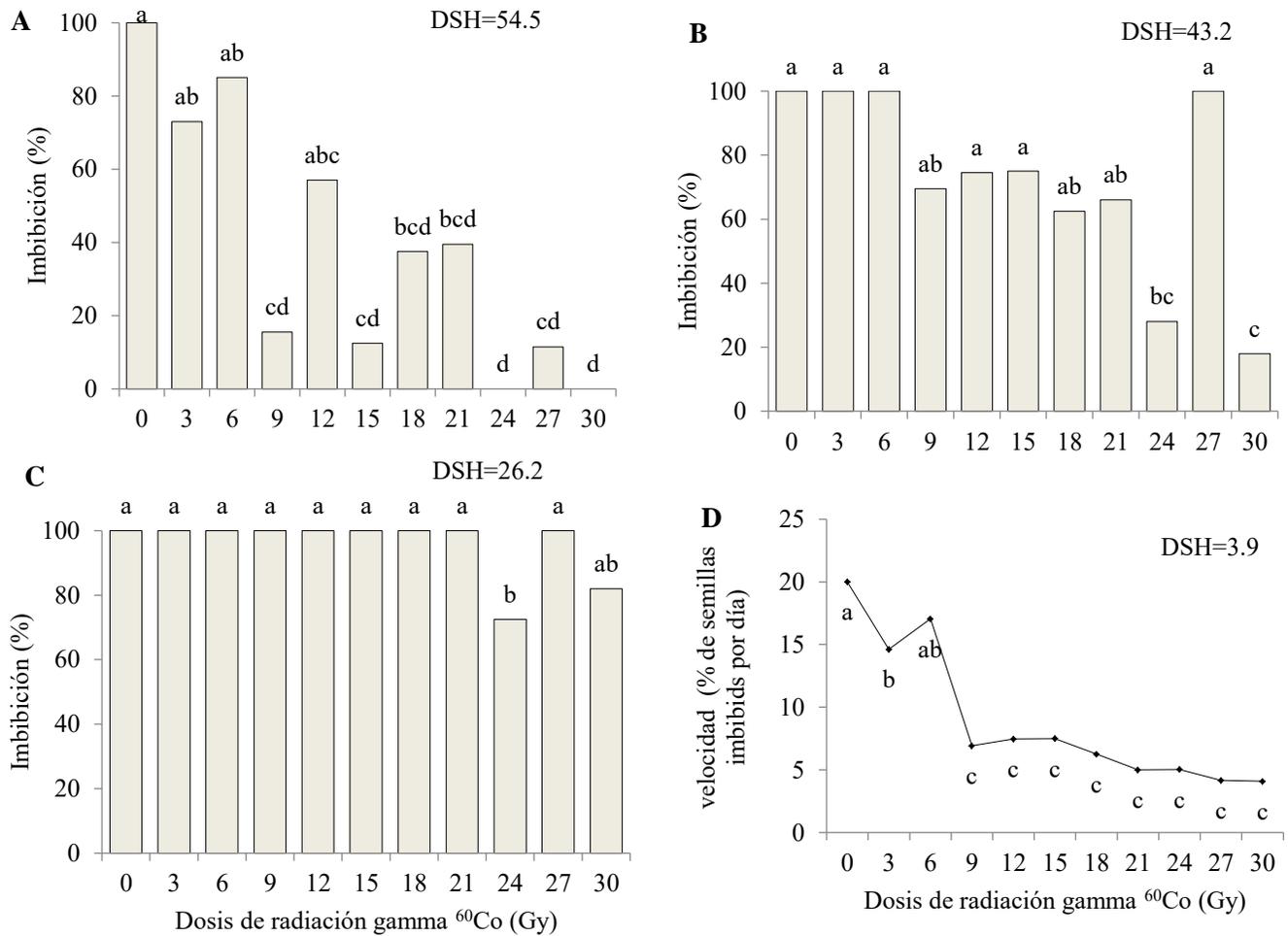


Figura 3. Efecto de la irradiación gamma ^{60}Co sobre la imbibición *in vitro* de semillas de *L. autumnalis*. A) 5 días después de la siembra (dds), B) 10 dds, C) 20 dds y 30 dds y D) velocidad de imbibición de semillas. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

La formación de protocormos fotosintéticos (FPF) se presentó a partir de los 10 dds en las dosis menores a 15 Gy, excepto en la dosis de 9 Gy. El máximo porcentaje (49 %) se registró en la dosis de 3 Gy, estadísticamente similar al obtenido en semillas tratadas con 6 Gy (28.5 %) (Fig. 4A). Las semillas irradiadas con 3 a 15 Gy presentaron mayor FPF, superiores en 61 % a lo obtenido en las semillas sin irradiar (Fig. 4B) a los 20 dds, por lo que estas dosis tienen un efecto radioestimulante. A los 30 dds se tuvo un efecto inhibitorio en las semillas tratadas con la dosis de 24 a 30 Gy en las que se presentó cinco veces menos FPF en comparación con las semillas no irradiadas (Fig. 4C); este efecto negativo continuó hasta los 40 dds ya que las semillas irradiadas con 27 y 30 Gy presentaron 43 y 45.5 % FPF (Fig. 4D).

La mayor velocidad de formación de protocormos fotosintéticos (VFPP) por día se tuvo en las dosis de 3 a 15 Gy (2.3 % más que el control) (Fig. 4E), lo que indica un efecto estimulante de la radiación sobre esta variable. La radioestimulación de las semillas a dosis bajas de radiaciones es atribuida al incremento en la absorción de oxígeno, lo que genera producción de radicales orgánicos e inorgánicos de peróxido, que ocasionan la ruptura de la latencia de las semillas (Minisi *et al.*, 2013); además, la radiación ionizante actúa como disparador o impulsor del desarrollo, intensifica la actividad de las enzimas hidrolíticas y provoca un incremento en la velocidad de conversión de los sustratos respiratorios en pequeñas moléculas, a partir de las cuales se forman los nuevos constituyentes celulares que dan origen a la plántula (Álvarez *et al.*, 2012).

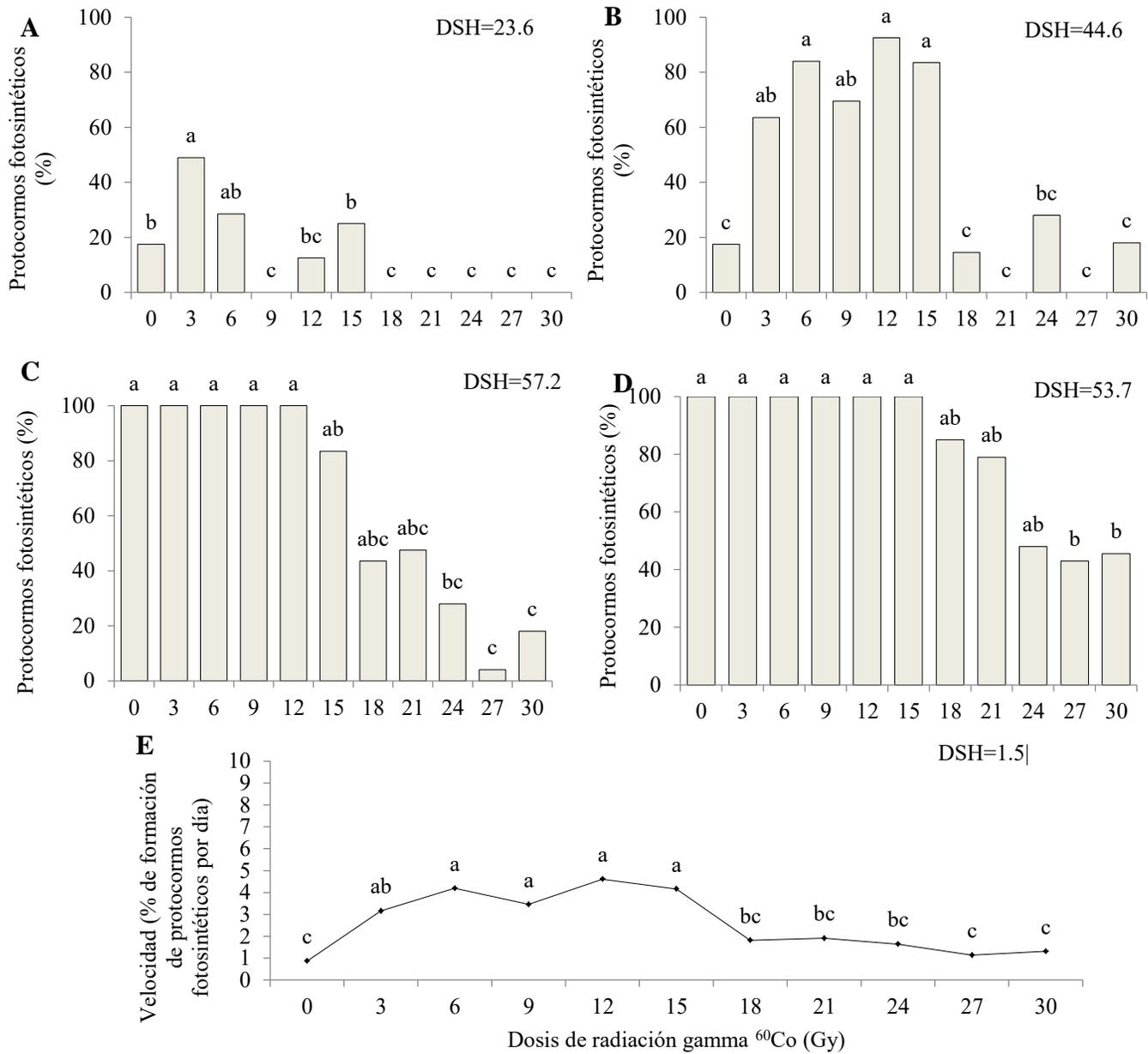


Figura 4. Efecto de la irradiación gamma ^{60}Co sobre la formación de protocormos fotosintéticos *in vitro* a partir de semillas de *L. autumnalis*. A) 10 días después de la siembra (dds), B) 20 dds, C) 30 dds y D) 40 dds, E) velocidad de formación de protocormos fotosintéticos. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

A los 30 dds la totalidad de las semillas sin irradiar alcanzaron la etapa de formación de protocormos diferenciados (FPD), de forma estadísticamente similar a las semillas irradiadas entre 3 y 9 Gy (73 % en promedio), y superior a las semillas tratadas con dosis entre 15 y 30 Gy (5 % en promedio) (Fig. 5A). Este efecto negativo de la radiación en las dosis altas continuó a los 40 dds en los subcultivos tratados con 18 a 30 Gy (6 %) (Fig. 5B) así como a los 50 dds en las semillas irradiadas con dosis de 21 a 30 Gy (44 % en promedio) (Fig. 5C). En las semillas tratadas con 24 a 30 Gy el proceso de FPD fue más sincronizado y tomó 20 d (Fig. 5C y 5D).

La velocidad de protocormos diferenciados (VPD) por día fue mayor en semillas sin irradiar (3.33 %), estadísticamente similar a las semillas irradiadas con 3, 9 y 12 Gy. Se observó una tendencia a disminuir VPD conforme se aumentó la dosis de radiación. El menor porcentaje (0.73 %) se presentó en semillas irradiadas con 18 Gy, valor estadísticamente similar a los obtenidos con las dosis de 21 a 30 Gy (Fig. 5E). Estos resultados se pueden explicar porque dosis altas de radiación causan daños severos en el ADN; sin embargo, algunas células tienden a recuperarse de cuatro a ocho semanas después de la radiación (Lee *et al.*, 2016).

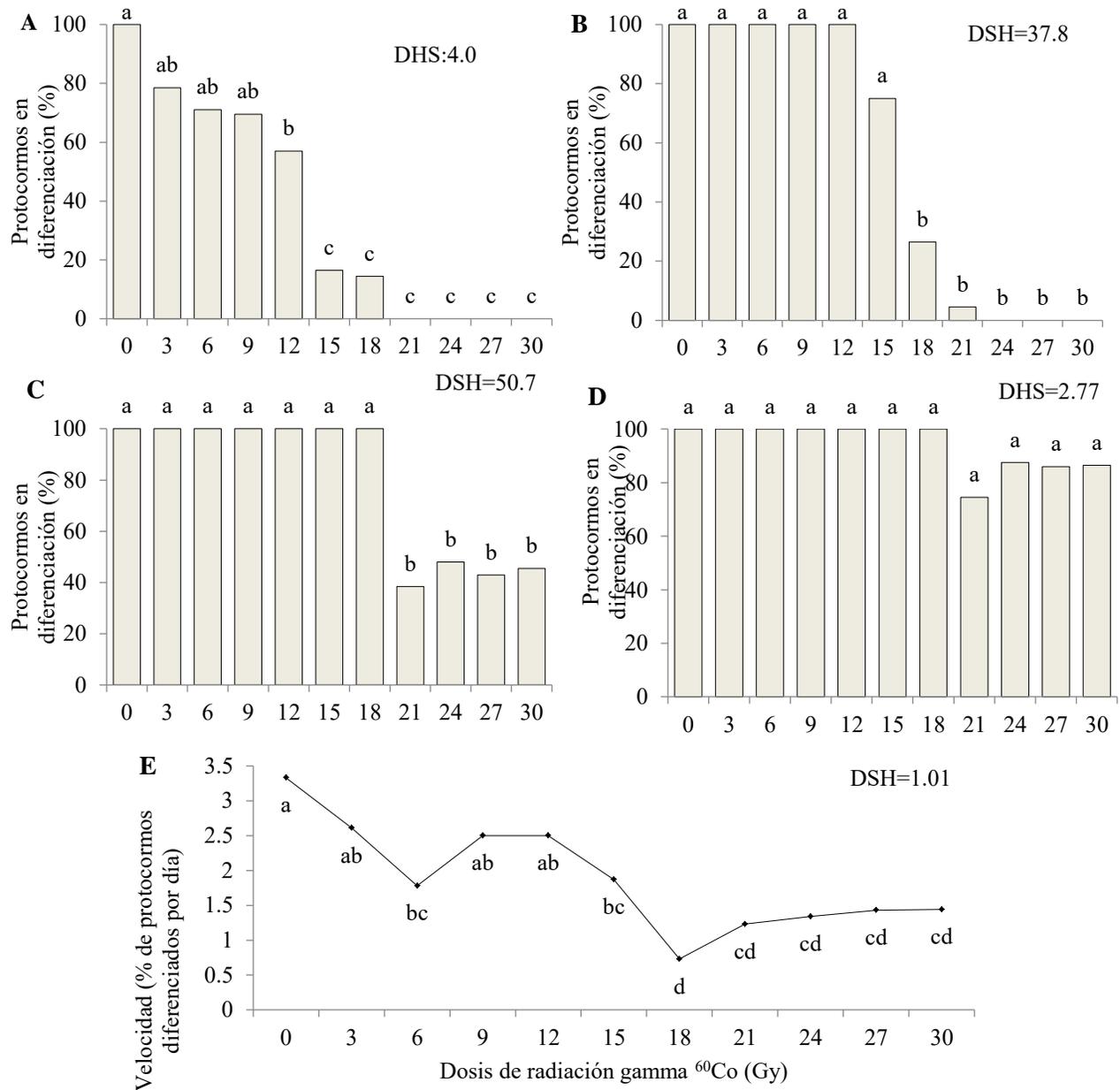


Figura 5. Efecto de la irradiación gamma ^{60}Co sobre la diferenciación de protocormos *in vitro* a partir de semillas de *L. autumnalis*. A) 30 días después de la siembra (dds), B) 40 dds, C) 50 dds y D) 60 dds, E) velocidad de formación de protocormos en diferenciación. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

En el desarrollo de promeristemos (DP) se presentó un efecto estimulante en las semillas irradiadas con 3, 15 y 18 Gy que en promedio presentaron 73 % más formación de promeristemos que las semillas sin irradiar (Fig. 6A); en los cultivos tratados con las dosis más altas (27 y 30 Gy) se inhibió el DP hasta los 60 dds (Fig. 6B); sin embargo, a los 70 dds incrementó significativamente (71 y 77.5 %) en ambas dosis de radiación (Figura 6C); el menor porcentaje (66 %) a los 80 dds se obtuvo en las semillas tratadas con 24 Gy, estadísticamente similares a las semillas irradiadas con 27 Gy (80 %) (Fig. 6D).

La velocidad de desarrollo de promeristemos (VDP) se aceleró con la dosis de 3 Gy (1.83 %), estadísticamente superior a las semillas tratadas con dosis de 9 y 12 Gy que presentaron 0.88 % de formación de promeristemos por día, pero estadísticamente igual al resto de los tratamientos (Fig. 6D). El efecto estimulante observado con la dosis de 3 Gy se puede deber a la excitación que producen las radiaciones ionizantes a dosis bajas en las semillas, las cuales estimulan su metabolismo y favorece el crecimiento y desarrollo de las plántulas (Álvarez *et al.*, 2013). Otra de las causas de estimulación de los rayos gamma sobre la germinación se ha atribuido a la activación de ARN o síntesis de proteínas, que se produce durante la primera etapa de germinación en las semillas después de la irradiación (Kumar *et al.*, 2013).

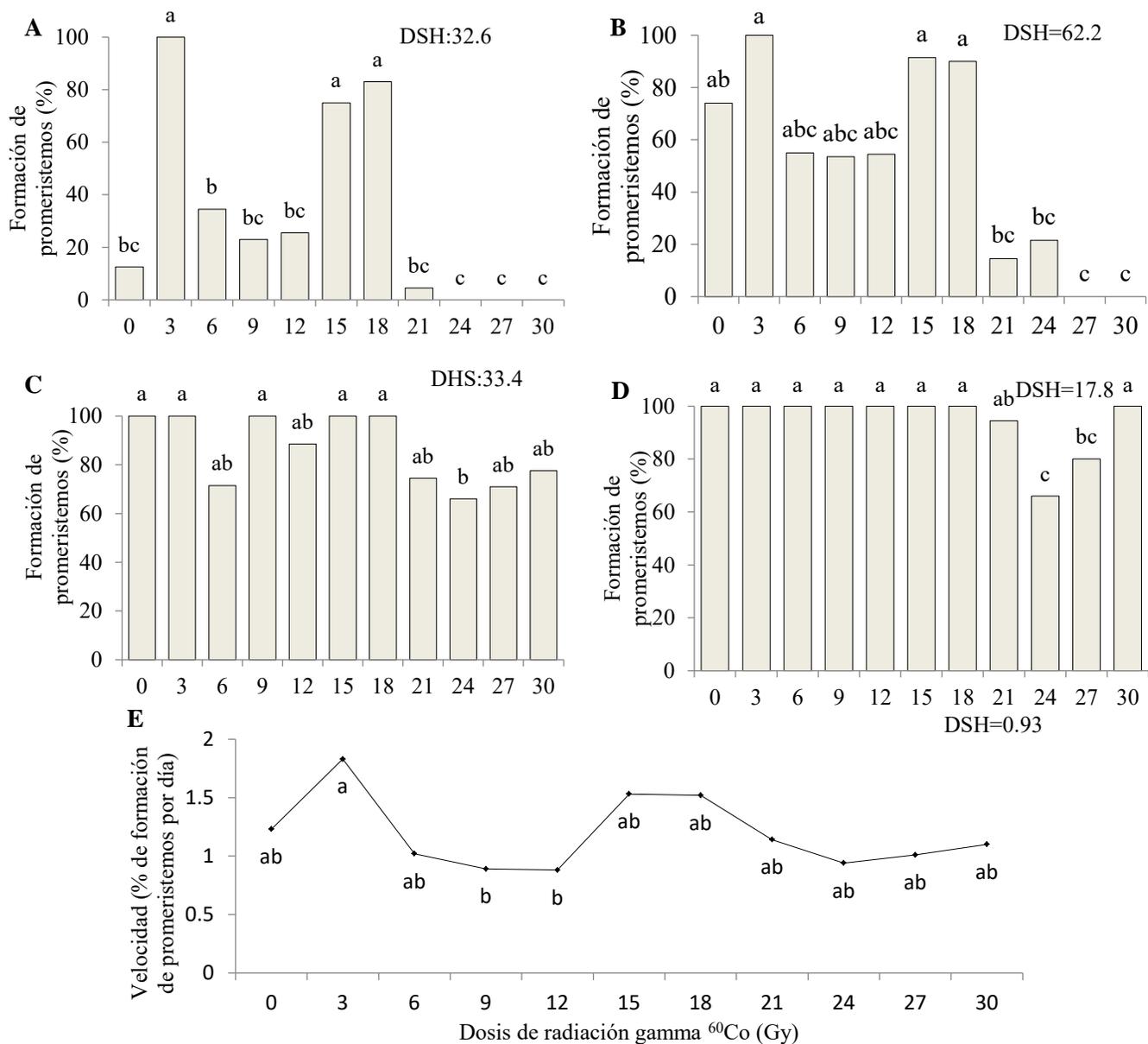


Figura 6. Efecto de la irradiación gamma ^{60}Co sobre la formación de proembriostos *in vitro* a partir de semillas de *L. autumnalis*. A) 50 días después de la siembra (dds), B) 60 dds, C) 70 dds y D) 80 dds, E) velocidad en la formación de proembriostos. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

La formación de hojas (FH) en la totalidad del tratamiento irradiado con dosis de 3 Gy se observó a los 60 dds, en comparación con las semillas no tratadas en las cuales solo 12.5 % de los protocormos formaron hojas (Fig. 7A). A los 70 dds, las dosis de 6, 12 y 21 a 30 Gy presentaron 67 % menos de protocormos con hojas que el tratamiento control (Fig. 7B); mientras que a los 80 dds fue visible la tendencia de retardo en la FH conforme se incrementó la dosis de radiación, las semillas irradiadas con 21 y 27 Gy presentaron el menor porcentaje (16.5 %) (Figura 7C); en las dosis de 27 y 30 Gy continuó el efecto negativo de la radiación a los 90 dds, en ambas dosis se redujo 60 % la FH con respecto al control (Fig. 7D).

La mayor velocidad de formación de hojas (VFH) por día se presentó en las semillas irradiadas con 3 Gy (1.43 %), valor estadísticamente similar al de las semillas sin irradiar (1.25 %) y a las tratadas con 18 Gy (0.97 %), pero superior al de las semillas tratadas con 6 a 15 y 21 a 30 Gy (Fig. 7E). Algunos autores relacionan el efecto estimulante de las bajas dosis de radiación con la activación de enzimas como las polifenoloxidasas, catalasas, peroxidasas y estererasas las cuales conllevan a la formación de sustancias fisiológicamente activas que a bajas concentraciones aceleran la división celular, conjuntamente con la morfogénesis en las células, mitocondrias y los cloroplastos (Cwintal y Olszewski, 2007).

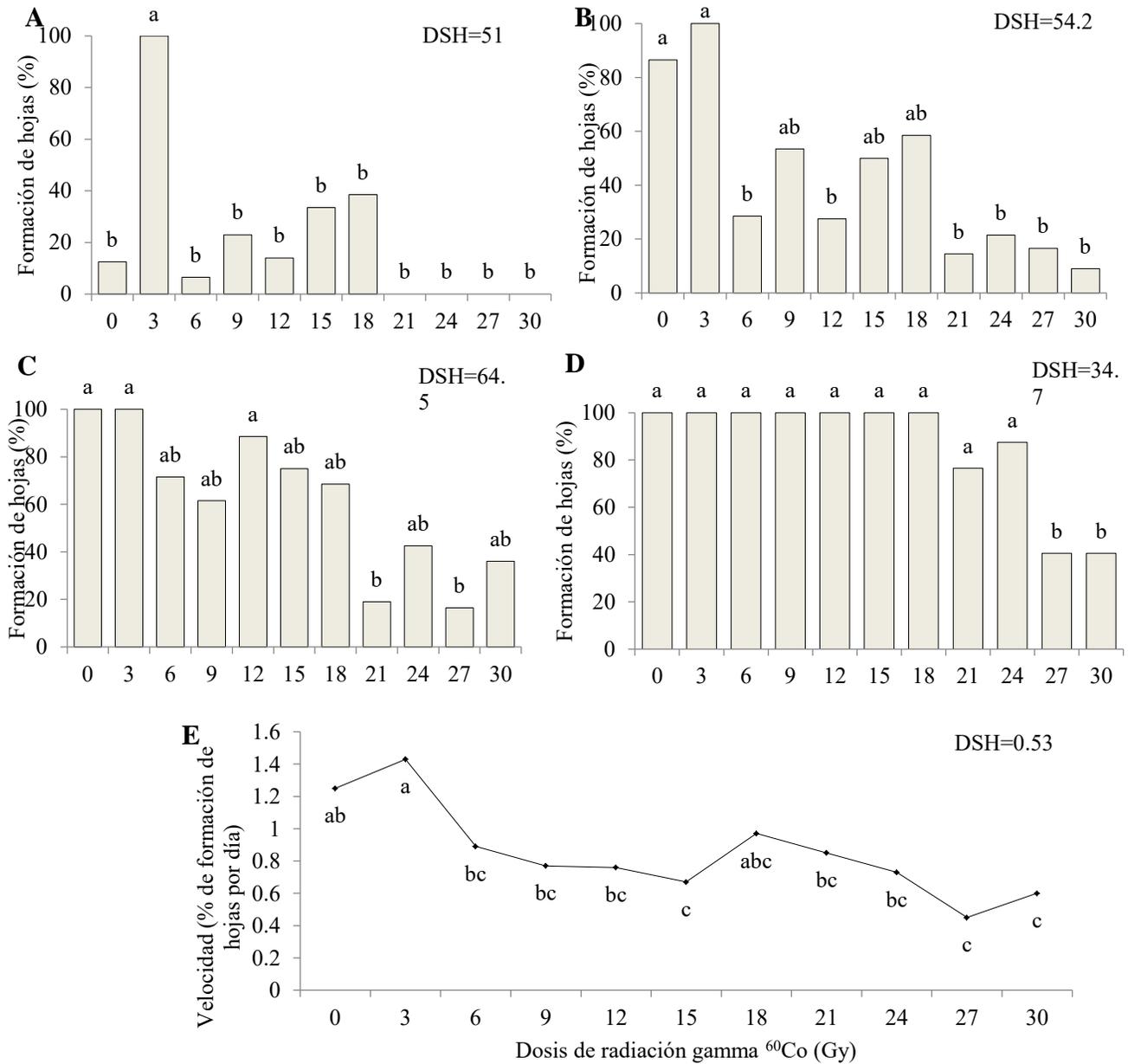


Figura 7. Efecto de la irradiación gamma ^{60}Co sobre la formación de hojas en protocormos *in vitro* a partir de semillas de *L. autumnalis*. A) 60 días después de la siembra (dds), B) 70 dds, C) 80dds y D) 90 dds, E) velocidad de formación de hojas en protocormos. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

La radiación estimuló la emergencia de raíces y por lo tanto la formación de plántulas (FP), las semillas tratadas con 15 Gy presentaron el mayor porcentaje (66.5 %) a los 80 dds, valor estadísticamente similar al resto de las semillas irradiadas, pero superior al de las semillas sin irradiar (Fig. 8A). En las semillas tratadas con 12 Gy se observó que la FP fue mayor a los 90 dds (88 %), estadísticamente similares a lo obtenido en semillas tratadas con 3, 6, 9, 15, 18, 27 y 30 Gy que en promedio presentaron 42 % más plántulas que el control (Fig. 8B); este efecto estimulante en la rizogénesis continuó a los 100 dds en las semillas irradiadas con 9 a 18 Gy que registraron en promedio 57 % más FP que las semillas sin irradiar, las semillas tratadas con 21 y 30 Gy fueron estadísticamente similares al tratamiento control (Fig. 8C); en las semillas del tratamiento control y las tratadas con 21 Gy la FP menor (73.5 y 69 %) a los 110 dds (Fig. 8D).

La VFP por día se incrementó en las semillas tratadas con 9, 15 y 18 Gy (0.34 % más plántulas por día), que en las semillas sin irradiar, estas últimas presentaron valores estadísticamente similares a las tratadas con 21 Gy, que fue la dosis con menor VFP por día (0.62 %) (Fig. 8E).

Estos resultados indican que la radiación gamma ^{60}Co en semillas de *L. autumnalis* en dosis de 3 a 18 Gy estimulan la rizogénesis, y se puede explicar en función de que las bajas concentraciones de radiación estimulan el desarrollo de las plantas; sin embargo, es necesario determinar en cada especie el intervalo de estimulación, ya que la radiosensibilidad en las plantas varía de acuerdo con el genotipo y la dosis de irradiación absorbida. Por ejemplo en PLBs (cuerpos parecidos a protocormos por sus siglas en inglés) de la orquídea *Cymbidium* con dosis de 8 Gy se estimula la actividad de reguladores de crecimiento endógenos en los tejidos

meristemáticos, lo que incrementa el desarrollo de los PLBs (Kozłowska-Kalisz, 1979). En la germinación de semillas de *Triticum durum* irradiadas con 20 Gy se encontró un incremento entre 18 y 32 % en el número y longitud de raíces respectivamente, este efecto estimulante puede contribuir a mejorar la absorción de agua en condiciones de déficit hídrico (Melki y Marouani, 2010). En semillas de vinca rosa (*Catharanthus roseus*) irradiadas con 30 Gy se estimuló el número de brotes por plántula (4.4) y la longitud de los brotes (3.9 cm) (El-Sharnouby *et al.*, 2016).

El uso de radiación gamma ^{60}Co a dosis de 3 Gy indica un efecto radioestimulante de la radiación sobre el proceso de germinación y desarrollo de *L. autumnalis*, con esta dosis se redujo el tiempo de formación de promeristemos, hojas y plántulas completas 20, 20 y 10 d antes que con el tratamiento sin irradiar.

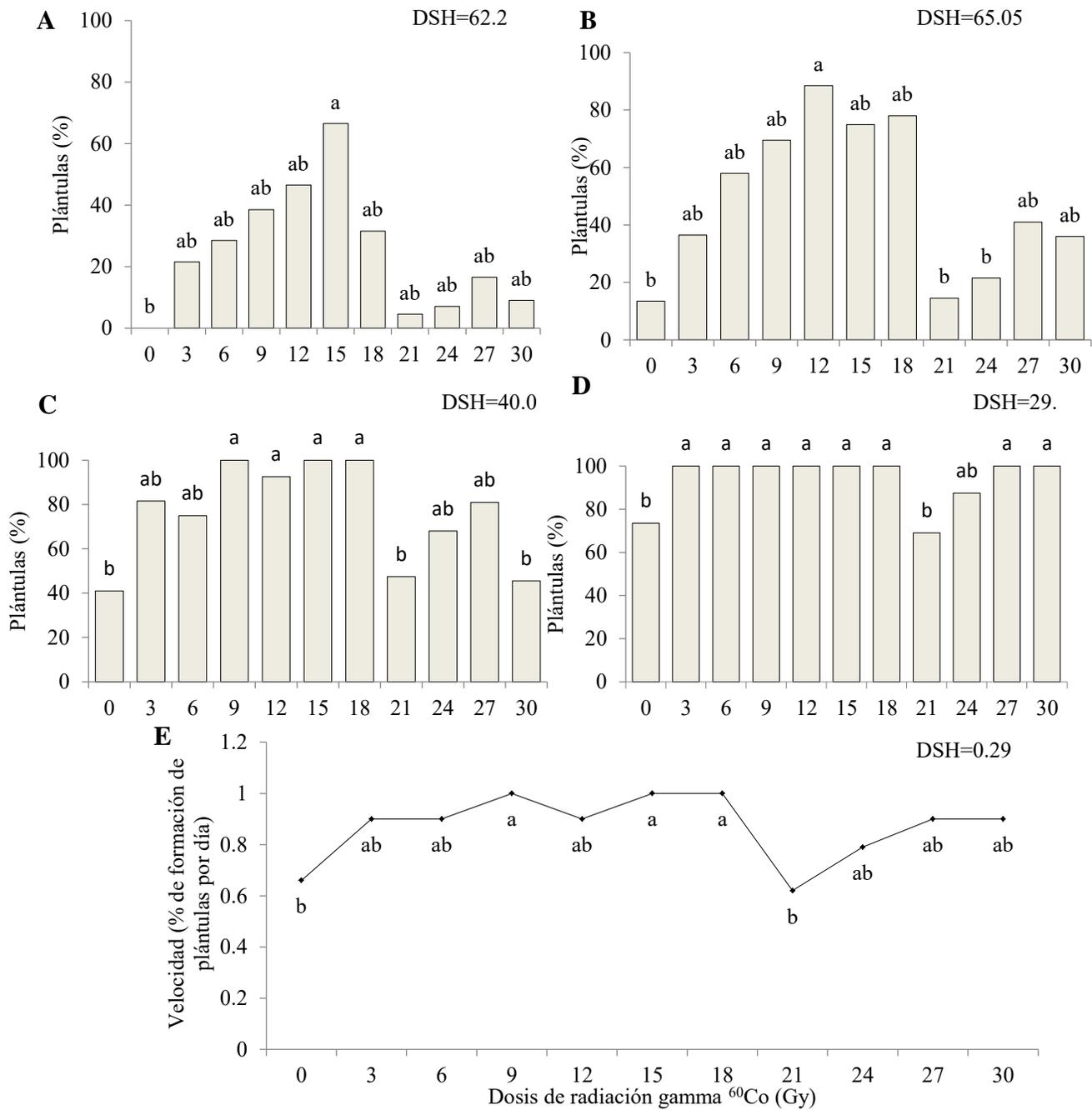


Figura 8. Efecto de la irradiación gamma sobre la formación de plántulas *in vitro* a partir de semillas de *L. autumnalis*. A) 80 días después de la siembra (dds), B) 90 dds, C) dds 100 y D) 110 dds, E) velocidad de formación de plántulas. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

CONCLUSIONES

La radiación gamma ^{60}Co a dosis bajas estimuló la germinación y aceleró la formación de promeristemos, formación de hojas y formación de plántulas de *L. autumnalis* durante el cultivo *in vitro*. La radiación a dosis superiores a 24 Gy inhibe la germinación y el desarrollo de plántulas, debido a que retrasa la diferenciación de protocormos y la formación de hojas. La radiación de las semillas con dosis de 9 a 18 Gy aceleró el desarrollo *in vitro* de plántulas de *L. autumnalis*.

LITERATURA CITADA

- Aguilar-Morales, M. A. y A. L. López-Escamilla. 2013. **Germinación *in vitro* de *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr., una herramienta para su conservación *ex situ*. In: Estudios Científicos en el Estado de Hidalgo y Zonas Aledañas.** Vol. II. G. Pulido F. y S. Monks (eds.). Zea Books, University of Nebraska. Lincoln, Nebraska, USA. pp.18-24.
- Akshatha and K. R. Chandrashekar. 2013. **Effect of gamma irradiation on germination, growth and biochemical parameters of *Pterocarpus santalinus*, an endangered species of Eastern Ghats.** *European Journal of Experimental Biology* 3:266-270.
- Akshatha, K. R. Chandrashekar, H. M. Somashekarappa and J. Souframani. 2013. **Effect of gamma irradiation on germination, growth, and biochemical parameters of *Terminalia arjuna* Roxb.** *Radiation Protection and Environment* 36:38-44.
- Álvarez, F. A., L. Chávez S., R. Ramírez F., R. Pompa B. y W. Estrada P. 2012. **Indicadores fisiológicos en plántulas de *Solanum lycopersicum* L., procedentes de semillas irradiadas con rayos X.** *Bioteología Vegetal* 12:173-177.

- Álvarez, F. A., L. Chávez S., R. Ramírez F., W. Estrada P., Y. Estrada L. y A. Maldonado R. 2013. **Efecto del tratamiento de semillas con bajas dosis de rayos X en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.).** *Nucleus* 53:14-19.
- Araújo, S. S., S. Paparella, D. Dondi, A. Bentivoglio, D. Carbonera and A. Balestrazzi. 2016. **Physical methods for seed invigoration: advantages and challenges in seed technology.** *Frontiers in Plant Science* 7:646.
- Arditti J. 2008. **Micropropagation of Orchids.** Volume II. 2nd ed. Blackwell Publishing. Oxford, UK. 1537 p.
- El-Fiki, A., G. El Metabteb, A. H. Sayed and M. Adly. 2015. **Androgenesis induced in *Nicotiana glauca* and the effect of gamma irradiation.** *Notulae Scientia Biologicae* 7:66-71.
- Batty, A. L., K. W. Dixon, M. Brundrett and K. Sivasithamparam. 2001. **Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed in a Mediterranean bushland.** *New Phytologist* 152:511-520.
- Billard, C. E., C. A. Dalzotto y V. H. Lallana. 2014. **Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *Oncidium*.** *Polibotánica* 38:145-157.
- Chakravarty, B. and S. Sen. 2001. **Enhancement of regeneration potential and variability by γ -irradiation in cultured cells of *Scilla indica*.** *Biologia Plantarum* 44:189-193.
- Cwintal, M. and J. Olszewski. 2007. **Influence of pre-sowing laser stimulation of seeds on photosynthesis and transpiration intensity and on yielding of alfalfa.** *Acta Agrophysica*, 9:345-352.

- El-Sharnouby, M. E., E. Azab and H. E. Abd E. 2016. **Performance of *Catharanthus roseus* plants in response to gamma irradiation.** *Journal of Biological and Chemical Research* 33:130-140.
- Francisco, N. J. J., A. R. Jiménez-Aparicio, A. De Jesús-Sánchez, M. L. Arenas-Ocampo, E. Ventura-Zapata y S. Evangelista-Lozano. 2011. **Estudio de la morfología y aclimatación de plantas de *Laelia eyermaniana* Rchb. f. generadas *in vitro*.** *Polibotánica* 32:107-117.
- González, M. C. y H. D. Nakayama. 2015. **Radioestimulación de la germinación en *Stevia rebaudiana* cultivar KH-IAN VC-142 (Eireté) mediante el empleo de rayos gamma ^{60}Co .** *Cultivos Tropicales* 36:117-119.
- González-Zertuche, L. y A. Orozco-Segovia. 1996. **Métodos de análisis de datos en la germinación de semillas, un ejemplo: *Manfreda brachystachya*.** *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 58:15-30.
- Hartmann, H. T., D. E. Kester, F. T. Davies Jr. and R. L. Geneve. 2010. **Plant Propagation: Principles and Practices.** 8th ed. Prentice Hall. New York, NY. 915 p.
- Kauth, P. J., D. Dutra, T. R. Johnson, S. L. Stewart, M. E. Kane and W. Vendrame. 2008. **Techniques and applications of *in vitro* orchid seed germination.** *In: Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues.* Volume V. J. A. Teixeira da Silva (ed.). Global Science Books. Iselworth, UK. pp. 375-391.
- Kozłowska-Kalisz, J. 1979. **The influence of ionizing radiation on biological activity of endogenous growth regulators in orchids/*Cymbidium*/ in tissue culture.** *Acta Horticulturae* 91:261-268.
- Kumar, D. P., A. Chaturvedi, M. Sreedhar, M. Aparna, P. Venu-Babu and R. K. Singhal. 2013. **Gamma radiosensitivity study on rice (*Oryza sativa* L.).** *Asian Journal of Plant Science and Research* 3:54-68.

- Lee, E. H. E., A. Laguna C., J. Murguía G., L. Iglesias-Andreu, B. García R., D. Escobedo L., Y. M. Martínez O., F. A. Barredo P. y N. Santana B. 2010. **Un protocolo de embriogénesis somática para la regeneración y caracterización *in vitro* de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*.** *Revista Fitotecnia Mexicana* 33:323-332.
- Lee, Y. I., C. F. Lu, M. C. Chung, E. C. Yeung and N. Lee. 2007. **Developmental changes in endogenous abscisic acid concentrations and asymbiotic seed germination of a terrestrial orchid, *Calanthe tricarinata* Lindl.** *Journal of the American Society for Horticultural Science* 132:246-252.
- Lee, Y. M., H. J. Lee, Y. S. Kim, S. Y. Kang, D. S. Kim, J. B. Kim, J. W. Ahn, B. K. Ha and S. H. Kim. 2016. **Evaluation of the sensitivity to ionizing γ -radiation of a *Cymbidium* hybrid.** *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 91:109-116.
- Marcu, D., V. Cristea and L. Daraban. 2013. **Dose-dependent effects of gamma radiation on lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata*) seedlings.** *International Journal of Radiation Biology* 89:219-223.
- Melki, M. and A. Marouani. 2010. **Effects of gamma rays irradiation on seed germination and growth of hard wheat.** *Environmental Chemistry Letters* 8:307-310.
- Minisi, F. A., M. E. El-mahrouk, M. E. F. Rida and M. N. Nasr. 2013. **Effects of gamma radiation on germination, growth characteristics and morphological variations of *Moluccella laevis* L.** *American-Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Sciences* 13:696-704.
- Mohammed, H. M. A., H. I. Mohamed, L. M. Zaki and A. M. Mogazy. 2012. **Pre-exposure to gamma rays alleviates the harmful effect of salinity on cowpea plants.** *Journal of Stress Physiology and Biochemistry* 8:199-217.

- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. **A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures.** *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Pierik, R. L. M. 1990. **Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores.** Mundi-Prensa. Madrid, España. 326 p.
- SAS Institute. 2002. **SAS/STAT. User's Guide, versión 9.0.** Statistical Analysis System Institute. Cary, N. C. USA. 4424 p.
- Van-Waes, J. M. and P. C. Debergh. 1986. **Adaptation of the tetrazolium method for testing the seed viability, and scanning electron microscopy study of some Western European orchids.** *Physiologia Plantarum* 66:435-442.
- Verdugo, G., J. Marchant, M. Cisternas, X. Calderón y P. Peñaloza. 2007. **Caracterización morfométrica de la germinación de *Chloraea crispa* Lindl. (Orchidaceae) usando análisis de imagen.** *Gayana Botánica* 64:232-238.
- Verma, J., K. Sharma, K. Thakur, J. K. Sembi and S. P. Vij. 2014. **Study on seed morphometry of some threatened Western Himalayan orchids.** *Turkish Journal of Botany* 38:234-251.
- Yamazaki, J. and K. Miyoshi. 2006. ***In vitro* asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae).** *Annals of Botany* 98:1197-1206.

VIII. CAPÍTULO III

DETERMINACIÓN DE LA DL₅₀ Y GR₅₀ CON RAYOS GAMMA (⁶⁰Co) EN PROTOCOLOS DE *Laelia autumnalis in vitro*

RESUMEN

Laelia autumnalis es una orquídea con valor ornamental alto en México, pero su comercialización se restringe porque las variedades con calidad comercial no existen. La mutagénesis con radiación es un método efectivo para generar variedades y depende de la radiosensibilidad de los tejidos. El objetivo del estudio fue determinar las dosis letal y reductiva media a los rayos gamma en protocormos de *L. autumnalis* tratados con 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 Gy. El diseño experimental fue completamente al azar, con tres repeticiones y 500 a 700 protocormos como unidad experimental. A los 45 días después de la irradiación (ddi) se cuantificaron los porcentajes de supervivencia, protocormos fotosintéticos, protocormos con promeristemas, con hojas y materia fresca de protocormos. A los 214 ddi, en 15 plántulas por tratamiento, se evaluó el número de hojas y raíces, longitud de plántulas, pseudobulbos y raíces, anchura de hojas y pseudobulbos, materia fresca y biomasa de plántula. Se aplicaron ANDEVA, correlación de Pearson, prueba de Tukey y regresión lineal. La radiación con 5 a 20 Gy no afectó la supervivencia de los protocormos, dosis entre 20 y 30 Gy estimularon la presencia de clorofila. La longitud de plántulas se incrementó 32% con 5 Gy. A partir de 40 Gy se redujo la materia fresca (44%) y anchura de hojas (25%). La correlación entre los niveles de radiación y la supervivencia de protocormos (-0.91), la formación de hojas (-0.90), el peso de materia fresca de protocormos (-0.69) y plántula (-0.56) y la longitud de plántula (-0.57) fue altamente

significativa. La DL_{50} para la supervivencia de protocormos y la dosis reductiva media para formación de hojas fueron 53 y 28 Gy, respectivamente. La dosis de radiación para inducir variabilidad en protocormos de *Laelia autumnalis* se ubica entre 28 y 53 Gy.

Palabras clave: *Laelia autumnalis*, mejoramiento genético, mutagénesis, radiación ionizante, orquídeas.

**LD₅₀ AND GR₅₀ DETERMINATION USING GAMMA RAYS (⁶⁰CO) IN
PROTOCOLS OF *Laelia autumnalis* *in vitro***

ABSTRACT

Laelia autumnalis is an orchid with high ornamental value in Mexico. Yet, their marketing is restricted because no commercial quality varieties exist. Mutagenesis radiation is an effective method for generating varieties. These depend on the radiosensitivity of the radiated tissues. The aim of the study was to determine the lethal and mean reductive dose to gamma rays in *L. autumnalis* protocorms treated with 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 and 50 Gy. The experimental design was completely random, with three repetitions and 500 to 700 protocorms as the experimental unit. Forty five days after irradiation (DAR) survival rates photosynthetic protocorms, protocorms with pro-meristems and leaves, and protocorm fresh matter were quantified. At 214 DAR we evaluated the number of leaves and roots, root length, leaf and pseudo-bulbs, width and length, and, fresh biomass and seedling biomass in 15 seedlings per treatment. Data were analyzed with ANOVA, Pearson correlation, Tukey test ($p \leq 0.05$) and linear regression. Radiation with 5 to 20 Gy did not affect protocorms survival, doses between 20 and 30 Gy stimulated the chlorophyll presence. The length of the seedlings from the 5 Gy treatment increased 32 %. From 40 Gy fresh biomass (44 %) and leaf width (25 %) decreased. The correlation between radiation levels and protocorms survival (-0.91), leaf formation (-0.90), weight of fresh matter of protocorms (-0.69) seedling (-0.56) and seedling length (-0.57) were highly significant. The LD₅₀ for protocorm survival and the mean reductive dose for leaf formation were 53 and 28 Gy, each. The radiation dose to induce variability in *Laelia autumnalis* protocorm is between 28 and 53 Gy.

Key words: *Laelia autumnalis*, breeding, mutagenesis, ionizing radiation, orchids.

INTRODUCCIÓN

La orquídea *Laelia autumnalis* es nativa de México, presenta inflorescencias con flores púrpura vistosas, de diversas tonalidades, formas, tamaños y aromas. Esta especie se usa como ornamental desde la época prehispánica por distintos pueblos indígenas, aunque nunca ha sido objeto de un programa de mejoramiento genético. Los ejemplares silvestres se comercializan ilegalmente en mercados locales y regionales de diversas comunidades de México a precios muy bajos (Beltrán-Rodríguez *et al.*, 2012).

La generación de variedades nuevas y mejoradas puede aumentar el valor y la aceptación de esta especie en el mercado nacional y constituir una ventaja económica a la hora de aprovechar un mercado de exportación.

El mejoramiento por mutagénesis es uno de los métodos más eficientes para obtener nuevos cultivares de plantas (Aros *et al.*, 2012; Kazi, 2015), en particular ornamentales como las orquídeas (Kikuchi, 2000; Luan *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2015;), anturio (Puchooa, 2005), y crisantemo (Yamaguchi *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2012). Si se combina el uso de radiaciones ionizantes con la técnica de cultivo *in vitro* se reduce el tiempo y los costos en el desarrollo de un nuevo cultivar (Yunus *et al.*, 2013); se puede obtener una producción continua de plantas a gran escala, así como mantener y multiplicar a los individuos mutantes (Barakat y El-Sammack, 2011; Ángeles-Espino *et al.*, 2013). Además, la variación somaclonal que se puede presentar durante la micropropagación ofrece la posibilidad de incrementar la frecuencia de mutaciones génicas y puntuales, que son las más importantes en el mejoramiento genético (Estrada-Basaldua *et al.*, 2011). Por otro lado, el cultivo *in vitro* es indispensable para la germinación asimbiótica de

semillas de orquídeas, proceso que en su hábitat requiere de la simbiosis con hongos micorrícicos (Verma *et al.*, 2014).

El mejoramiento con el uso de radiaciones ionizantes en las plantas ha permitido mejorar una gama amplia de caracteres como la arquitectura, el rendimiento, la floración, la tolerancia a estrés biótico y abiótico entre otros (Kon *et al.*, 2007). La principal ventaja es su capacidad para cambiar uno o pocos caracteres en un cultivar excelente sin modificar el resto del genotipo (Patil *et al.*, 2015). La eficiencia de estas radiaciones se constata porque cerca de 89 % de las variedades vegetales obtenidas por mutagénesis se han desarrollado con el uso de mutágenos físicos como los rayos X, rayos gamma y neutrones rápidos; dentro de estos agentes mutagénicos los más empleados en especies cultivadas (granos, frutales, y ornamentales) son los rayos gamma, pues con esta técnica se ha desarrollado el 60 % de las variedades vegetales mutantes (Kon *et al.*, 2007).

Los agentes mutagénicos alteran el ADN y causan mutaciones puntuales, deleciones y aberraciones cromosómicas (Tanaka *et al.*, 2010), por lo que los individuos nuevos presentan cambios importantes en su estructura genómica (Emmanuel y Levy, 2002). La técnica de mutagénesis tiene eficiencia especial en plantas con periodos juveniles largos antes de la floración y la producción de semillas (Predieri, 2001), así como en plantas ornamentales nativas con variabilidad genética limitada (Lee *et al.*, 2008).

Los mutágenos físicos, en particular las radiaciones gamma, son partículas pequeñas de radiación ionizante que tienen capacidad alta de energía penetrable en los tejidos biológicos (Sadhukhan *et al.*, 2015), su longitud de onda es de 10 nm (Kitano *et al.*, 2015). Su efecto

biológico se basa en la interacción con átomos o moléculas en la célula, en particular con el agua, para producir radicales libres y efectuar cambios en bases y rupturas en las uniones de hidrógeno entre cadenas complementarias de ADN (Kovács y Keresztes, 2002). Estos radicales pueden dañar o modificar componentes importantes de las células vegetales y modifican la morfología, anatomía, bioquímica y fisiología de las plantas, en función de la dosis de radiación (Wi *et al.*, 2007). Estos efectos incluyen cambios en la estructura celular y el metabolismo de la planta (Kovács y Keresztes, 2002), como dilatación de las membranas de los tilacoides, alteración en la fotosíntesis, modulación del sistema antioxidante y acumulación de compuestos fenólicos (Wi *et al.*, 2005), el núcleo celular es el principal organelo afectado por la radiación ionizante (Pavan *et al.*, 2013).

El efecto de la radiación en los tejidos celulares se divide en tres fases, la física o inicial que dura sólo una fracción de segundo, la etapa química que dura unos pocos segundos y la etapa biológica en la cual la escala de tiempo varía de decenas de minutos a decenas de años (Pavan *et al.*, 2013).

El intervalo en el cual se favorece la aparición de mutaciones útiles en los programas de mejoramiento genético, es la dosis letal media (DL₅₀) o dosis reductiva media (GR₅₀), que corresponde a la cantidad de radiación absorbida con la cual sobrevive 50 % de la población expuesta o se reduce el crecimiento en 50 %, por lo cual es importante conocer el intervalo de este valor (Ángeles-Espino *et al.*, 2013) antes de iniciar un programa de mejoramiento genético asistido por mutagénesis. La DL₅₀ es única para cada especie, genotipo e incluso en diferentes tejidos de la misma planta; en callos generados a partir de flores liguladas de *Chrysanthemum morifolium* cv. Delistar White con la DL₅₀ de 0.5 Gy, se obtuvieron modificaciones en la forma

de la flor y el número de flores por inflorescencia (Barakat *et al.*, 2010). En callos embriogénicos de *Tricyrtis hirta* la DL₅₀ se determinó en 20 Gy y se encontraron variantes con enanismo, con hojas más verdes y delgadas y mayor número y tamaño de flores (Nakano *et al.*, 2010). En semillas de *Moluccella laevis* la DL₅₀ de 25 Gy incrementó el número de flores por vara (Minisi *et al.*, 2013). Para explantes de hoja en *Torenia fournieri* la DL₅₀ se estableció en 63 Gy para plantas diploides y 72 Gy para las poliploides, en ambos casos se obtuvieron mutantes con hojas rojas (Chanchula *et al.*, 2015).

Para orquídeas nativas de México no se conoce la radiosensibilidad de los tejidos a la radiación gamma, ni se ha determinado la dosis óptima para obtener variantes de importancia ornamental. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue determinar la DL₅₀ y GR₅₀ con rayos gamma (⁶⁰Co) en protocormos de *Laelia autumnalis* cultivados *in vitro*. La hipótesis fue que existe una dosis óptima para generar variantes en *Laelia autumnalis* a partir de protocormos irradiados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se efectuó en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agrobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, ubicado en Uruapan, Michoacán, México (19° 23' 41'' N y 102° 03' 31''), desde mayo de 2014 a Marzo de 2015. La irradiación de protocormos se hizo en el Departamento del Irradiador Gamma del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), ubicado en Ocoyoacac, Estado de México.

Material vegetal

En este estudio se utilizó la semilla polvo de seis frutos obtenidos mediante autofecundación manual de plantas de *L. autumnalis* de la colección del Banco de Germoplasma del Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos.

Medio de cultivo

Se utilizó un medio con las sales minerales de Murashige y Skoog (1962) (MS), sin fitohormonas y adicionado con sacarosa (30 g L⁻¹), mio-inositol (100 mg L⁻¹), tiamina (0.4 mg L⁻¹) y agar (6 g L⁻¹), el pH se ajustó a 5.7 ± 0.1 con NaOH 1 N. Se sirvieron 20 mL de medio en frascos de vidrio de 100 mL de capacidad y se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 1.2 kg cm⁻² de presión y 121 °C.

Establecimiento del cultivo aséptico

Para la siembra se tomaron 33 muestras de semillas (de 20 mg cada una) y se colocaron en jeringas con capacidad de 10 mL, donde se efectuó la desinfección con hipoclorito de sodio comercial 15 % v/v (6 % de ingrediente activo) durante 15 minutos. En la campana de flujo laminar se retiró la solución desinfectante y se hicieron tres enjuagues con agua estéril. La semilla polvo de cada muestra se suspendió en 0.5 mL de agua estéril y se colocó en un frasco con medio de cultivo. La incubación se efectuó con fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad y radiación fotosintéticamente activa de 45 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ proporcionada por lámparas de luz fluorescente blanca de 75 W.

Irradiación con rayos gamma ^{60}Co

A los 45 d después de la siembra (dds), los protocormos obtenidos se trataron con diez dosis de irradiación (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 Gy), más un tratamiento testigo sin irradiar. El diseño experimental fue completamente al azar con 11 tratamientos y tres repeticiones y la unidad experimental fue un frasco con los protocormos obtenidos de la germinación de 20 mg de semilla, cantidad que fluctuó entre 500 y 700 protocormos. Un día después de la irradiación (46 dds), los protocormos de cada frasco se transfirieron a medio de cultivo fresco. A los 90 dds se transfirieron a cajas Petri para facilitar la evaluación; en todo este tiempo, el desarrollo de los protocormos se dividió en tres etapas fenológicas: protocormos fotosintéticos, protocormos con promeristemos y protocormos con hojas. Estas fases se observaron de manera simultánea en todas las unidades experimentales, debido a que el desarrollo de plántulas en *L. autumnalis* es un proceso asincrónico.

A los 135 dds, los protocormos se subcultivaron en contenedores de plástico de 250 mL de capacidad con 50 mL de medio basal fresco y se incubaron en las condiciones ambientales ya descritas.

Variables evaluadas en protocormos

Porcentajes de supervivencia de protocormos, de protocormos fotosintéticos, de protocormos con promeristemos y con hojas. Cada unidad experimental (frasco) se dividió en cuadrantes para facilitar los conteos. En cada cuadrante se contó el número de protocormos vivos, muertos, fotosintéticos, con promeristemos y con hojas. Con la suma de protocormos en cada etapa fenológica se obtuvo el número total de protocormos por unidad experimental, que se usó como denominador para obtener los porcentajes de supervivencia, de protocormos fotosintéticos,

de protocormos con promeristemos y con hojas de la siguiente forma: En cada variable se utilizó el mismo procedimiento.

$$\% \text{ de supervivencia por unidad experimental} = \frac{\text{Número de protocormos vivos por frasco}}{\text{Número total de protocormos}}$$

En cada variable se utilizó el mismo procedimiento.

Materia fresca de protocormos. Se pesó la totalidad de los protocormos por unidad experimental en una balanza analítica marca OHAUS® con legibilidad de 0.01 mg.

Estas variables se determinaron a los 45 d después de la irradiación (90 dds).

Variables evaluadas en plántulas

Longitud de plántula, pseudobulbo y raíz. Se midió la distancia entre la base y el ápice de la plántula, pseudobulbo y raíz, en su caso, con vernier digital.

Anchura de hoja y pseudobulbo. Se midió en la parte media de cada órgano, con vernier digital.

Número de hojas y raíces. Se cuantificó directamente en cada plántula.

Materia fresca de plántulas (mg). Cada plántula se pesó en balanza analítica digital marca OHAUS® con legibilidad de 0.01 mg.

Biomasa de plántulas. Cada plántula se secó 72 h en una estufa marca FELISA, a 70 °C. Las plántulas secas se pesaron en balanza analítica digital marca OHAUS® con legibilidad de 0.01 mg.

El registro de estas variables se realizó en cinco plántulas por repetición, 15 en total por tratamiento, a los 214 d después de la irradiación (259 dds).

Análisis estadístico

Con los datos obtenidos a los 45 y 214 ddi se realizó ANDEVA, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson y la prueba de Tukey para la comparación de medias entre tratamientos, con SAS versión 9.0 (Statistical Analysis System, 2002).

Para conocer la magnitud de la respuesta de cada variable a las dosis de radiación, se evaluó un modelo de regresión lineal. Sin embargo, sólo las variables supervivencia y emergencia de hojas se ajustaron a este modelo, por lo cual, la determinación de la DL_{50} y GR_{50} se realizó sólo para estas variables.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la radiación sobre el desarrollo de protocormos

El análisis de varianza reveló que la radiación influyó en la supervivencia de protocormos, la presencia de protocormos fotosintéticos, de protocormos con promeristemas, con hojas y la materia fresca de protocormos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Análisis de varianza para el efecto de la radiación gamma ^{60}Co en la supervivencia y desarrollo de protocormos de *Laelia autumnalis*.

Variable	Media	CM		CV	R ²
		Tratamientos	Error		
Supervivencia (%)	71.19	683.01**	31.78	7.91	0.92
Protocormos fotosintéticos (%)	18.99	53.01**	10.31	16.90	0.75
Protocormos con promeristemos (%)	20.61	42.23**	14.94	18.75	0.62
Protocormos con hojas (%)	29.80	602.55**	24.10	16.46	0.93
Materia fresca de protocormos (g)	7.03	13.35**	3.87	27.95	0.67

**p ≤ 0.01; ns=no significativo, R²: coeficiente de determinación.

La radiación con dosis bajas (5 a 20 Gy) no afectó la supervivencia de protocormos con relación al tratamiento testigo, aunque hubo reducción de protocormos vivos entre 17.6 y 46.4 % en los tejidos que fueron tratados con radiación entre 25 y 50 Gy (Fig. 1A). Dosis entre 20 y 30 Gy estimularon en los protocormos la presencia de clorofila, que se notó como un cambio de color amarillo claro a verde (Fig. 1B), niveles estadísticamente iguales a 45 Gy. La acumulación de materia fresca fue similar entre los protocormos del tratamiento testigo y los tratados con los diferentes niveles de radiación, aunque distinta entre los irradiados a 5 y 10 Gy con los tratados a 35 Gy, los primeros con 69 y 66 % más de acumulación de materia fresca (Fig. 1C). Una respuesta similar se observó para la formación de promeristemos, estadísticamente similar en los tratamientos irradiados y el testigo, pero casi el doble en los protocormos irradiados a 20, 30 y 35 Gy, en comparación con 50 Gy, (Fig. 1D).

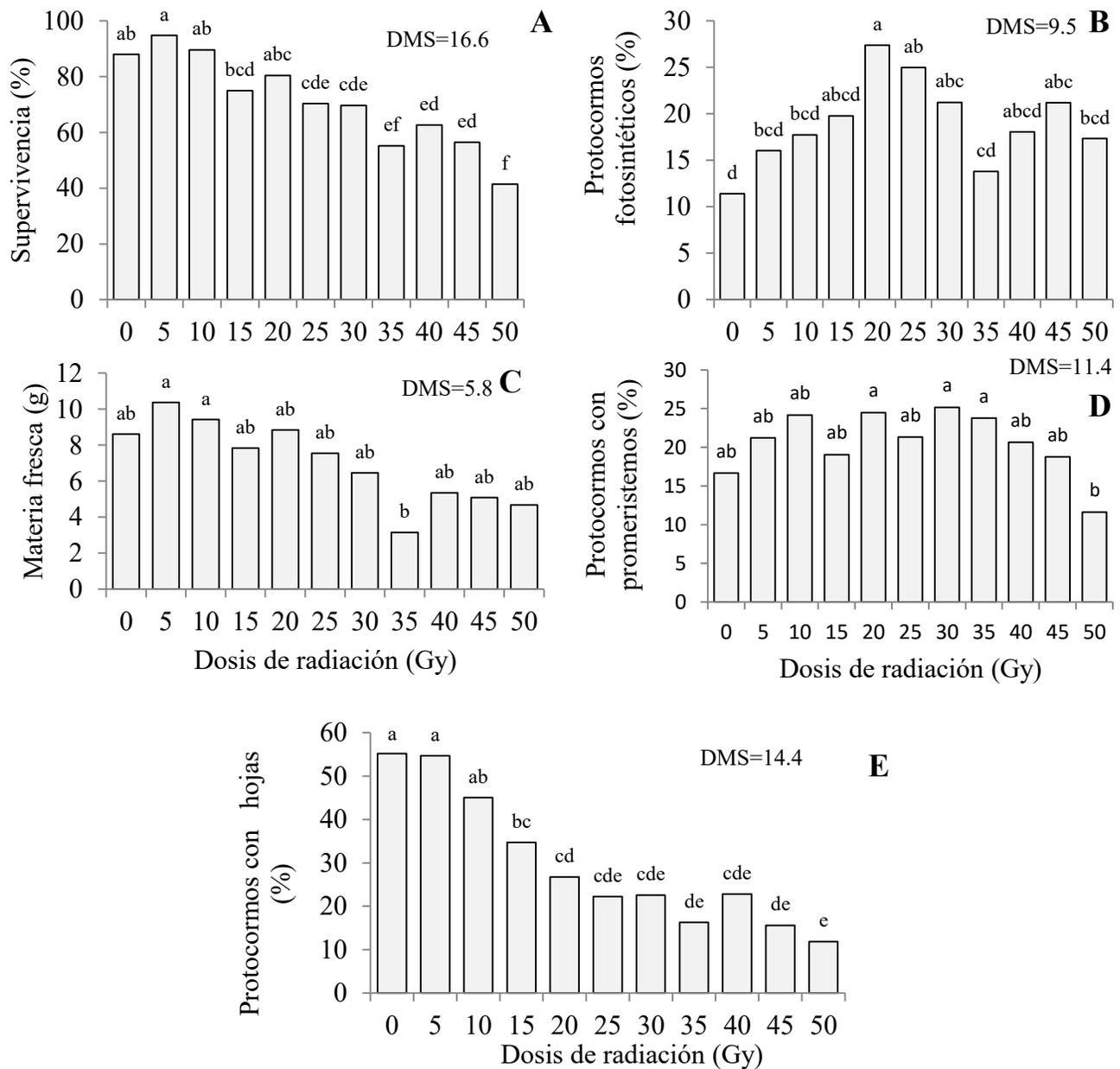


Figura 1. Efecto de la radiación gamma ^{60}Co sobre la supervivencia y el desarrollo de protocormos de *Laelia autumnalis*, A) supervivencia de protocormos, B) protocormos fotosintéticos, C) materia fresca de protocormos, D) protocormos con promeristemas y E) protocormos con hojas. DMS=Diferencia Mínima Significativa. En cada figura, letras distintas indican diferencias significativas (Tukey; $p \leq 0.05$).

La formación de protocormos con hojas no difirió significativamente entre las plántulas no irradiadas y las tratadas con 5 y 10 Gy, a partir de los 15 Gy se redujo significativamente la formación de protocormos con hojas, conforme se incrementó la dosis de irradiación (Fig. 1E). El desarrollo de los explantes se aceleró a dosis de radiación baja (radioestimulación), pero se redujo al incrementar la dosis de radiación gamma, como sucede en callos *in vitro* de *Chrysanthemum morifolium* (Soliman *et al.*, 2014).

Aunque en nuestra investigación no se hicieron estudios a nivel molecular, se conoce que los daños en los tejidos al incrementar la dosis de radiación gamma suceden, a pesar de que las células presentan un mecanismo de reparación del ADN cuando están expuestas a cualquier fuente de radiación; aunque si la intensidad de la fuente de radiación es demasiado alta, este mecanismo ya no puede reparar todas las células dañadas y las células expuestas mueren como ocurre en plantas de jengibre (*Zingiber officinale*) (Yoon *et al.*, 2014). En las células que sobreviven se producen radicales libres que ocasionan desórdenes metabólicos (Pavan *et al.*, 2013), se altera el patrón de expresión génica (Corthals *et al.*, 2000) que regula ciertas rutas metabólicas y sistemas de defensa (Zolla *et al.*, 2003), lo que provoca cambios cualitativos y cuantitativos en el contenido total de proteínas solubles (Corthals *et al.*, 2000). Estas proteínas tienen una función importante en la transducción de señales, en la defensa antioxidante, anticongelante, choque térmico, antipatogénesis o síntesis de osmolitos, que son esenciales para las funciones y el crecimiento de las plantas (El-Fiki *et al.*, 2015). Estas alteraciones a nivel celular, causadas ya sea a nivel fisiológico o físico, incluidos daños en los cromosomas y la reducción de la supervivencia conforme se incrementa la dosis de radiación, se han reportado en *Jatropha curcas* L. (Dhakshanamoorthy *et al.*, 2011), cuatro variedades comerciales de

Lycopersicon esculentum (Ramírez *et al.*, 2006), *Withania somnifera* (Bhosale y More, 2014), *Orthosiphon stamineus* (Kiong *et al.*, 2008) y *Chrysanthemum* (Yamaguchi *et al.*, 2009).

Los coeficientes de correlación fueron negativos y altamente significativos entre los diferentes niveles de radiación aplicados y la supervivencia de protocormos (-0.91), protocormos con hojas (-0.90) y materia fresca de protocormos (-0.69). Además, se presentó correlación positiva entre la supervivencia y los protocormos con hojas (0.89) y materia fresca de protocormos (0.71). Así como entre la formación de protocormos con hojas y la materia fresca de protocormos (0.65) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Correlación del efecto de la radiación gamma ^{60}Co sobre la supervivencia y desarrollo de protocormos de *Laelia autumnalis*.

Variables	1	2	3	4	5	6
1 Radiación	1 1.00	-0.910**	0.180 ^{ns}	-0.212 ^{ns}	-0.903**	-0.697**
2 Supervivencia	2	1.00	-0.052 ^{ns}	0.443**	0.891**	0.718**
3 Protocormos fotosintéticos	3		1.00	0.206 ^{ns}	-0.415*	0.082 ^{ns}
4 Protocormos con promeristemas	4			1.00	0.089 ^{ns}	0.443**
5 Protocormos con hojas	4				1.00	0.654**
6 Materia fresca	6					1.00

**p ≤ 0.01; * ≤ 0.05; ns=no significativo

Efecto de la radiación sobre el desarrollo de plántulas

El análisis de varianza reveló que la radiación influyó en la materia fresca, biomasa y longitud de las plántulas, la anchura de hojas y número de raíces, pero no afectó el número de hojas, la longitud y ancho de pseudobulbos y la longitud de raíces (Cuadro 3).

Cuadro 3. Análisis de varianza para el efecto de la radiación gamma ^{60}Co sobre el desarrollo de plántulas de *Laelia autumnalis*.

Variable	Media	CM		CV	R ²
		Tratamientos	Error		
Materia fresca de plántula (mg)	118.00	13945**	2704	43.70	0.46
Biomasa de plántula (mg)	7.00	35.75**	21.87	58.94	0.21
Longitud de plántula (mm)	30.50	421.22**	76.58	28.69	0.48
Número de hojas	4.09	1.13ns	0.80	21.95	0.19
Anchura de hojas (mm)	1.51	0.51**	0.11	22.36	0.43
Longitud de pseudobulbos (mm)	8.53	3.50ns	3.48	21.84	0.52
Ancho de pseudobulbos (mm)	2.52	0.16ns	0.23	19.25	0.43
Número de raíces	3.20	3.93**	0.94	30.30	0.41
Longitud de la raíz (mm)	15.79	52.94ns	42.31	41.19	0.17

** $p \leq 0.01$; ns=no significativo, R²: coeficiente de determinación.

La longitud de plántulas aumentó en 32 % al usar radiación a 5 Gy, con relación al tratamiento sin irradiar, esto sugiere un efecto radioestimulante del crecimiento a dosis de radiación bajas; con 35, 40 y 50 Gy las plántulas fueron 31, 50 y 42 % menos largas que las plántulas sin irradiar (Fig. 2A y 3). La mayor acumulación de materia fresca (189 y 176 mg) se registró en las plántulas tratadas con 5 y 10 Gy, estadísticamente similares al testigo y a 15 Gy,

pero superiores al resto de los tratamientos (Fig. 2B). La anchura de las hojas se redujo en 25 y 29 % con dosis de radiación de 40 y 50 Gy, respectivamente, con respecto al testigo, el número de raíces disminuyó en 37 % con dosis de 45 Gy (Fig. 2C y D). La acumulación de biomasa fue similar en las plántulas de todos los tratamientos, excepto en las tratadas con 5 y 15 Gy, las cuales acumularon casi el doble de biomasa que las irradiadas con 45 Gy (Fig. 2E). La disminución de la biomasa al incrementar la dosis de radiación se ha observado en plántulas de *Arabidopsis* que inhiben su transporte de carbohidratos cuando se tratan con dosis de radiación mayores de 50 Gy (Bondada y Oosterhuis, 2003), porque se ocasionan daños y desorientación de los tilacoides del grana y aumenta la acumulación de gránulos de almidón dentro de los cloroplastos. Estos cambios en la ultraestructura no se observaron en los cloroplastos de células irradiadas con dosis bajas (Wi *et al.*, 2007).

En contraste al fenómeno de radioinhibición, el fenómeno de hormesis observado con la dosis de 5 Gy sobre el crecimiento de las plántulas de *L. autumnalis*, se describe como el efecto estimulante de cualquier factor sobre el crecimiento de organismos (Szarek, 2005) y se atribuye al cambio en la red de señalización hormonal en las células vegetales o al aumentar la capacidad antioxidante de las células para superar los factores de estrés como las fluctuaciones de intensidad de la luz y la temperatura en las condiciones de crecimiento (Kim *et al.*, 2004). Además, la radiación acelera la tasa de división celular y activa las auxinas, este fenómeno se ha reportado en *Gypsophilla paniculata* en la cual al irradiar callos a 1 Gy se obtuvo mayor longitud de brotes (3.4 cm) (Barakat y El-Sammak, 2011). En *Lycopersicon esculentum* hay un intervalo radioestimulante de 5 a 25 Gy para la altura de las plantas (Ramírez *et al.*, 2006); en *Triticum durum* el impacto de la radiación gamma sobre las semillas incrementó 32 y 75 % en el número y longitud de raíces, al ser irradiadas con 20 Gy (Melki y Marouani, 2010). En la regeneración de

callos embriogénicos de *Heliconia psittacorum*, irradiados con rayos gamma ^{60}Co , con la dosis de 30 Gy se presentó el mayor porcentaje de callos regenerados (80.8 %), 20.8 % más que en el tratamiento sin irradiar y 74.8 % más que en los callos tratados con 75 Gy (6 %) (Urrea y Ceballos, 2005).

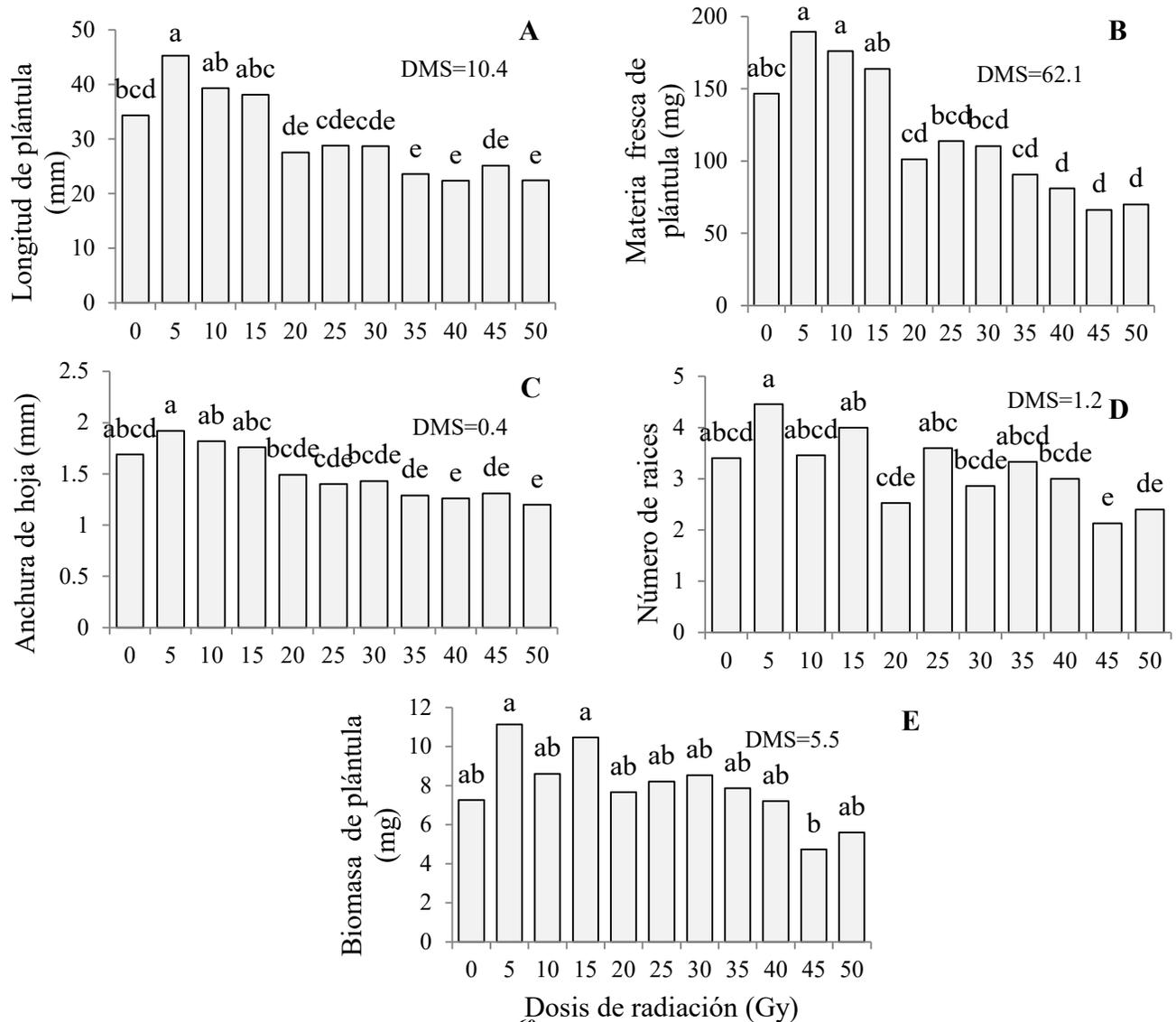


Figura 2. Efecto de la radiación gamma ^{60}Co sobre plántulas de *L. autumnalis* procedentes de protocormos irradiados con ^{60}Co , A) longitud, B) materia fresca, C) anchura de hojas, D) número de raíces y E) biomasa de plántulas. DMS=Diferencia Mínima Significativa. En cada figura, letras distintas indican diferencias significativas (Tukey; $p \leq 0.05$).

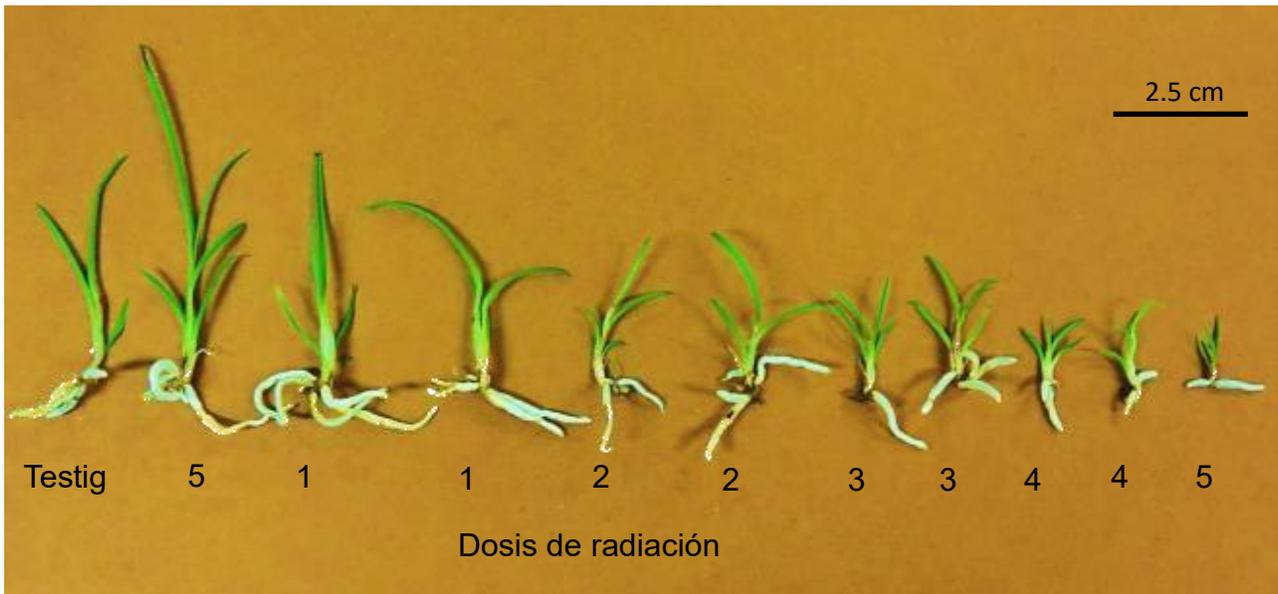


Figura 3. Plántulas de *L. autumnalis* procedentes de protocormos irradiados con rayos gama ^{60}Co a diferentes dosis de radiación.

Los coeficientes de correlación fueron negativos y altamente significativos entre los diferentes niveles de radiación aplicados y la materia fresca de plántula (-0.56), longitud de plántulas (0.57), anchura de hojas (-0.52), número de raíces (-0.41) y longitud de pseudobulbos (Cuadro 4). Esto confirma que existe una correlación negativa entre la energía absorbida por unidad de masa en la dosis aplicada y los parámetros de crecimiento y desarrollo de las plantas (Giovannini *et al.*, 2015). En *Arabidopsis*, esta inhibición es atribuida a la detención del ciclo celular en la fase G2/M durante la división de las células somáticas y/o por daños en el genoma (Preuss y Britt, 2003); en crisantemo esto se atribuye a la generación de aberraciones cromosómicas y pérdida de la capacidad de proliferación de las células (Patil *et al.*, 2015) y a daños en los genes implicados en la morfogénesis de hojas verdaderas, como sucede en hojas de *Rumex obtusifolius* irradiadas con dosis de 500 Gy (Kitano *et al.*, 2015). En *Agave tequilana* se

ha reportado que la radiación absorbida produce mutaciones en el ADN de las células y altera su desarrollo normal conforme se incrementa la dosis de radiación (Ángeles-Espino *et al.*, 2013).

Se presentaron coeficientes de correlación positivos entre la materia fresca de plántula y la longitud de plántula (0.70), longitud de raíz (0.66), anchura de hojas (0.64) y número de raíces (0.55). También se presentaron coeficientes de correlación significativos entre la longitud de plántula y la anchura de hojas (0.65) y longitud de pseudobulbo (0.54).

Determinación de la DL₅₀ y GR₅₀

El modelo de regresión lineal mostró el ajuste mejor para explicar el efecto de la radiación sobre la supervivencia de los protocormos (Cuadro 5). Las variables materia fresca de protocormos y de plántulas mostraron una tendencia a disminuir conforme se incrementó la dosis de radiación, sin embargo presentaron una R² baja de 0.48 y 0.35 por lo que estas variables no se consideraron para el cálculo de la GR₅₀. La dosis letal media para la supervivencia de protocormos se determinó en 53 Gy (Fig. 4), ésta se considera la dosis que favorece la aparición de mutaciones útiles. La dosis de reducción media del crecimiento (GR₅₀) para la formación de hojas en protocormos se determinó en 28 Gy (Cuadro 5 y Fig. 4).

La DL₅₀ determinada para *Laelia autumnalis* difiere a la reportada para rizomas de *Alstroemeria aurea* G. irradiados con rayos gamma a dosis de 0 a 40 Gy, donde la DL₅₀ se determinó en 40 Gy, dosis con la que se redujo la supervivencia de explantes en 50 %, y se puede usar con fines de mejoramiento genético (Aros *et al.*, 2012). La GR₅₀ para el porcentaje de germinación en semillas de dos variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) irradiadas con rayos gamma ⁶⁰Co en un intervalo de 20 a 200 Gy, fue de 89 y 188 Gy en las variedades JGL y Vijetha (Pavan

et al., 2013). En brotes de fresa irradiados de 30 a 325 Gy la DL₅₀ para supervivencia de brotes se determinó en 177 Gy (Murti *et al.*, 2013); en semillas de frijol largo (*Vigna sesquipedalis*) irradiadas de 300 a 800 Gy la DL₅₀ para supervivencia se determinó entre 600 y 800 Gy y la GR₅₀ para altura de planta se ubicó entre 400 y 500 Gy (Kon *et al.*, 2007).

Con base en estos datos se confirma que la DL₅₀ y la GR₅₀ son específicas para cada especie, genotipo e incluso tamaño y tipo de tejido irradiado, y que la sensibilidad a la radiación depende de la naturaleza y extensión del daño cromosómico (Kiong *et al.*, 2008; Pavan *et al.*, 2013) y varía en función del contenido de ADN, tamaño y número de cromosomas (Sparrow *et al.*, 1961) y el contenido de agua en el material vegetal irradiado, ya que la radiación interactúa con moléculas, especialmente de agua, para producir radicales libres en las células, estos radicales modifican diferentes compuestos importantes de las células en las plantas, por lo cual las semillas toleran dosis más altas de radiación para llegar a la DL₅₀, en comparación con los tejidos suculentos (Yunus *et al.*, 2013).

La DL₅₀ determinada para las plántulas de *Laelia autumnalis* confirma que esta especie es muy sensible a la radiación gamma. Esta sensibilidad también se observa con respecto a la radiación solar, lo que se atribuye a que *L. autumnalis* es una especie epífita que habita bajo el dosel de los árboles. En las orquídeas epifitas se ha demostrado que altas intensidades de radiación solar reducen la capacidad fotosintética y afectan el intercambio gaseoso (Stancato *et al.*, 2002).

Cuadro 4. Correlación del efecto de la radiación gamma ^{60}Co sobre el desarrollo de plántulas de *Laelia autumnalis*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1 Radiación	1	1.00	-0.570**	-0.253**	-0.562**	-0.002 ^{ns}	-0.526**	-0.401**	-0.037**	-0.413**	-0.249
2 Materia fresca de plántula	2		1.00	0.552**	0.701**	0.213 ^{ns}	0.642**	0.326*	0.397**	0.555**	0.662
3 Biomasa	3			1.00	0.336**	0.168*	0.357**	-0.056 ^{ns}	0.428**	0.370**	0.477**
4 Longitud de plántula	4				1.00	0.039 ^{ns}	0.653**	0.541**	0.017 ^{ns}	0.403**	0.353**
5 Numero de hojas	5					1.00	-0.125 ^{ns}	0.041 ^{ns}	0.244 ^{ns}	-0.090 ^{ns}	-0.033 ^{ns}
6 Ancho de hojas	6						1.00	0.315*	0.034 ^{ns}	0.383**	0.416**
7 Longitud de pseudobulbos	7							1.00	0.239 ^{ns}	0.335*	-0.199 ^{ns}
8 Ancho de pseudobulbos	8								1.00	0.341*	0.212 ^{ns}
9 Número de raíces	9									1.00	0.340**
10 Longitud de raíces	10										1.00

**p ≤ 0.01; * ≤ 0.05; ns=no significativo

Cuadro 5. Análisis de regresión para la supervivencia de protocormos y emergencia de hojas en protocormos de *Laelia autumnalis* irradiados con rayos gamma ^{60}Co .

	Supervivencia	Formación de hojas
R^2	0.87	0.83
Pr>F	0.0001	0.0001
Ecuación Lineal	Dosis= $(Y_{\text{testigo}}/2-95.20)/-0.97$	Dosis= $(Y_{\text{testigo}}/2-52.29)/-0.88$
DL ₅₀ o GR ₅₀	53	28

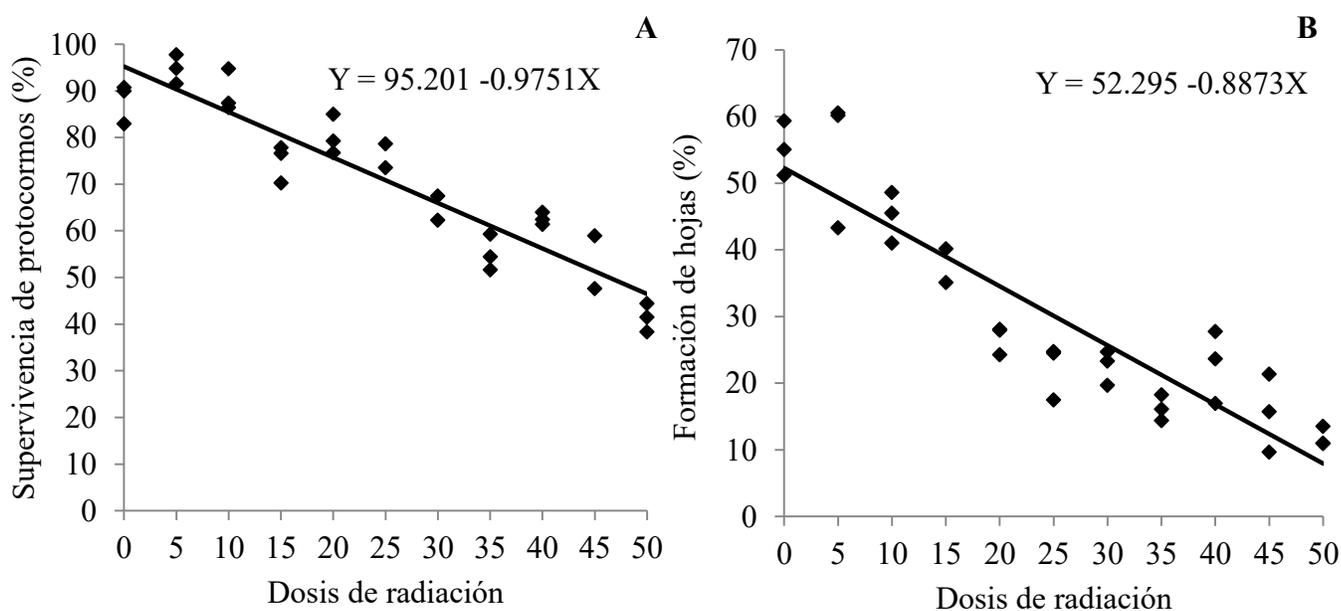


Figura 4. Efecto de la radiación gamma ^{60}Co sobre protocormos de la orquídea *Laelia autumnalis*, A) porcentaje de supervivencia en protocormos y B) formación de hojas en protocormos.

La dosis reductiva media de 28 Gy para la formación de hojas a partir de protocormos de *L. autumnalis* es similar a la de *Agave fourcroides* donde se determinó una GR₅₀ de 20 Gy para el

peso de materia fresca, además encontraron que el peso de materia fresca de callo es un excelente indicador de la radiosensibilidad (González *et al.*, 2007). En explantes de *Agave tequilana* irradiados con rayos gamma a dosis de 0 a 50 Gy, se encontró que la dosis reductiva media se ubica entre 20 y 25 Gy para la formación de plántulas y de 15 a 25 Gy para la formación de callos, con estas dosis se incrementa la probabilidad de inducir mutaciones favorables para fines de selección y mejoramiento genético (Ángeles-Espino *et al.*, 2013). Sin embargo, la GR₅₀ determinada para la formación de hojas a partir de protocormos de *L. autumnalis* es alta si se compara con los resultados encontrados en explantes de *Etilingera elatior* irradiados con rayos gamma ⁶⁰Co de 0 a 140 Gy, donde la DL₅₀ para supervivencia de explantes se determinó en 10 Gy (Yunus *et al.*, 2013), y en tubérculos de nardo (*Polianthes tuberosa* L.), irradiados con rayos gamma a dosis de 0 a 30 Gy, donde se determinó una DL₅₀ de 9.09 Gy para la supervivencia de plántulas aclimatadas procedentes de brotes cultivados *in vitro*, no así para los tubérculos establecidos *in vivo* en los que se determinó una DL₅₀ de 25.91 Gy para la supervivencia de plantas (Estrada-Basaldúa *et al.*, 2011).

CONCLUSIONES

La radiación gamma ⁶⁰Co ejerció un efecto inversamente proporcional sobre el crecimiento y desarrollo de plántulas de *Laelia autumnalis*. Dosis bajas radioestimulan el crecimiento de las plántulas, con dosis altas inhiben la supervivencia de protocormos, la formación de hojas y la materia fresca de plántulas.

La irradiación con dosis entre 28 y 53 Gy se puede emplear en programas de mejoramiento para *L. autumnalis*, con el fin de promover mutaciones que favorezcan la obtención de variantes de importancia ornamental.

LITERATURA CITADA

- Ángeles-Espino, A., J. A. Valencia-Botín, G. Virgen-Calleros, C. Ramírez-Serrano, L. Paredes-Gutiérrez y S. Hurtado-De la Peña. 2013. **Determinación de la dosis letal (DL₅₀) con ⁶⁰Co en vitroplantas de *Agave tequilana* var. Azul.** *Revista Fitotecnia Mexicana* 36: 381-386.
- Aros, D., S. Valdés, E. Olate and R. Infante. 2012. **Gamma irradiation on *Alstroemeria aurea* G. in vitro rhizomes: an approach to the appropriate dosage for breeding purposes.** *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNcuyo* 44: 191-197.
- Barakat, M. N. and H. El-Sammak. 2011. **In vitro mutagenesis, plant regeneration and characterization of mutants via RAPD analysis in baby's breath *Gypsophila paniculata* L.** *Australian Journal of Crop Science* 5: 214-222.
- Barakat, M. N., R. S. Abdel-Fattah, M. Badr and M. G. El-Turky. 2010. **In vitro mutagenesis and identification of new variants via RAPD markers for improving *chrysanthemum morifolium*.** *African Journals of Agricultural Research* 5: 748-757.
- Beltrán-Rodríguez, L. A., B. Martínez-Rivera y A. P. Maya. 2012. **Etnoecología de la flor de catarina – *Laelia autumnalis* (La Llave & Lex. Lindl.) (orchidaceae) en una comunidad campesina al sur del estado de Morelos, México: conservando un recurso y preservando saberes populares.** *Etnobiología* 10: 1-17.
- Bondada, B. R. and D. Oosterhuis M. 2003. **Morphometric analysis of chloroplast of cotton leaf and fruiting organs.** *Biologia Plantarum* 47: 281–284.
- Bhosale, R. S. and A. More D. 2014. **Effect of gamma radiation on seed germination, seedling height and seedling injury in *Withania somnifera*, (L.) Dunal.** *International Journal of Life Sciences* 2: 226-228.

- Chanchula, N., T. Taychasinpitak, A. Jala, T. Thanananta and S. Kikuchi 2015. **Radiosensitivity of *in vitro* cultured *Torenia fournieri* Lind. from Thailand by γ -ray irradiation.** *International Transaction Journal Engineering, Management, and Applied Sciences and Technology* 6: 157-164.
- Corthals, G. L., S. P. Gygi, R. Aebersold and S. D. Patterson. 2000. **Identification of proteins by mass spectrometry.** *In: Rabilloud, T. (Ed). Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods.* Springer Verlag Berlin Heidelberg. pp: 197-231.
- Dhakshanamoorthy, D., R. Selvaraj and A. L. A. Chidambaram. 2011. **Induced mutagenesis in *Jatropha curcas* L. using gamma rays and detection of DNA polymorphism through RAPD marker.** *Competes Rendus Biologies* 334: 24-30.
- El-Fiki, A., G. El-Metabteb, S. Abdel-Hadi and M. Adly. 2015. **Androgenesis induced in *Nicotiana glauca* and the effect of gamma irradiation.** *Notulae Scientia Biologicae* 7: 66-71.
- Emmanuel, E. and A. A. Levy. 2002. **Tomato mutants as tools for functional genomics.** *Current Opinion in Plant Biology* 5: 112-117.
- Estrada-Basaldúa, J. A., M. E. Pedraza-Santos, E. De la Cruz-Torres, A. Martínez-Palacios, C. Sáenz-Romero y J. L. Morales-García. 2011. **Efecto de rayos gamma ^{60}Co en nardo (*Polianthes tuberosa* L.).** *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3: 445-458.
- Giovannini, A., V. Scariot, M. Caser, A. Buttafava, A. Mansuino, G. G. Ghione, M. Savona, M. E. Sabatini, D. Carboner and A. Balestrazzi. 2015. **Mutation breeding using gamma rays to increase seed germination in *Rosa hybrida*.** *Acta Horticulturae* 1087: 373-378.
- González O., G., S. Alemán G., M. Garriga, R. Ortiz and C. De la Fe. 2007. **Radio sensitivity to gamma rays (^{60}Co) in shoot tips of henequen.** *Biotechnología Vegetal* 7: 115–117.

- Kazi, N. A. 2015. **Mutation breeding in flower crops.** *Asian Journal of Multidisciplinary Studies* 3: 228-230.
- Kikuchi K., O. 2000. **Orchid flowers tolerance to gamma-radiation.** *Radiation Physics and Chemistry* 57: 555-557.
- Kim, J. H., M. H. Baek, B. Y. Chung, S. G. Wi and J. S. Kim. 2004. **Alterations in the photosynthetic pigments and antioxidant machineries of red pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings from gamma-irradiated seeds.** *Journal of Plant Biology* 47: 314-321.
- Kiong L., A. P., A. G. Lai, S. Hussein and A. Rahim H. 2008. **Physiological responses of *Orthosiphon stamineus* plantlets to gamma irradiation.** *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture* 2: 135-149.
- Kitano, S., A. Miyagi, Y. Oono, Y. Hase, I. Narumi, M. Yamaguchi, H. Uchimiya and M. Kawai-Yamada. 2015. **Metabolic alterations in leaves of oxalate-rich plant *Rumex obtusifolius* L. irradiated by gamma rays.** *Metabolomics* 11: 134-142.
- Kon, E., O. Haruna A., S. Shaharudin and N. M. Ab M. 2007. **Gamma radiosensitivity study on long bean (*Vigna sesquipedalis*).** *American Journal of Applied Sciences* 4: 1090-1093.
- Kovács, E. and A. Keresztes. 2002. **Efect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells.** *Micron* 33: 199-210.
- Kumar, B., S. Kumar and M. Thakur. 2012. ***In vitro* mutation induction and selection of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzelev) lines with improved resistance to *Septoria obesa* Syd.** *International Journal of Plant Research* 2: 103-107.
- Lee, G. J., S. C. J. Chung, I. S. Park, J. S. Lee, J. B. Kim, D. S. Kim and S. Y. Kang. 2008. **Variation in the phenotypic features and transcripts of color mutants of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) derived from gamma ray mutagénesis.** *Journal of Plant Biology* 51: 418-423.

- Lee, Y. M., Y. D. Jo, H. J. Lee, Y. S. Kim, D. S. Kim, J. B. Kim, S. Y. Kang and S. H. Kim. 2015. **DNA Damage and oxidative stress induced by proton beam in *Cymbidium* hybrid.** *Hort. Environ. Horticulture, Environment, and Biotechnology* 56: 240-246.
- Luan, L. Q., N. H. Phuang U. and V. T. Thu H. 2012. ***In vitro* mutation breeding of *Paphiopedilum* by ionization radiation.** *Scientia Horticulturae* 144: 1-9.
- Melki, M. and A. Marouani. 2010. **Effects of gamma rays irradiation on seed germination and growth of hard wheat.** *Environmental Chemistry Letters* 8: 307–310.
- Minisi, F. A., M. E. El-mahrouk, M. E. F. Rida and M. N. Nasr 2013. **Effects of gamma radiation on germination, growth characteristics and morphological variations of *Moluccella laevis* L.** *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences* 13: 696-704.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. **A revised medium for rapid growth and biossays whit tobacco tissue cultures.** *Physiologia plantarum* 15: 473-497.
- Murti H., R., H. Y. Kim H. and Y. Yeoung R. 2013. **Effectiveness of gamma ray irradiation and ethyl methane sulphonate on *in vitro* mutagenesis of strawberry.** *African Journal of Biotechnology* 12: 4803-4812.
- Nakano, M., J. Amano, Y. Watanabe, T. Nomizu, M. Suzuki, K. Mizunashi, S. Mori, S. Kuwayama, D. C. Han, H. Saito, H. Ryuto, N. Fukunishi and T. Abe. 2010. **Morphological variation in *Tricyrtis hirta* plants regenerated from heavy ion beam-irradiated embryogenic calluses.** *Plant Biotechnology* 27: 155-160.
- Patil, U. H., G. N. Deshmukh and N. A. Kazi. 2015. **Mutation breeding in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* T.).** *Asian Journal of Multidisciplinary Studies* 3: 25-27.

- Pavan K., D., A. Chaturvedi, M. Sreedhar, M. Aparna, P. Venu-Babu and R. K. Singhal. 2013. **Gamma radiosensitivity study on rice (*Oryza sativa* L.).** *Asian Journal of Plant Science and Research* 3: 54-68.
- Predieri, S. 2001. **Mutation induction and tissue culture in improving fruits.** *Plant cell, tissue and organ culture* 64: 185-210.
- Preuss, S. B. and A. B. Britt. 2003. **A DNA-damage-induced cell cycle checkpoining in *Arabidopsis*.** *Genetics* 164: 323–334.
- Puchooa, D. 2005. ***In vitro* mutation breeding of *Anthurium* by gamma radiation.** *International Journal of Agriculture and Biology* 7: 11-20.
- Ramírez R., L. M. González, Y. Camejo, N. Zaldívar y Y. Fernández. 2006. **Estudio de radiosensibilidad y selección del rango de dosis estimulantes de rayos X en cuatro variedades de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill).** *Cultivos Tropicales* 27: 63-67.
- Sadhukhan, R., K. Swathi, D. Sarmah and T. Mandal. 2015. **Effect of different doses of gamma rays on survivability and rooting ability in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.).** *Journal Crop and Weed* 11: 62-65.
- Soliman T., M. A., S. Lv, H. Yang, B. Hong, N. Ma and L. Zhao. 2014. **Isolation of flower color and shape mutations by gamma radiation of *Chrysanthemum morifolium* Ramat cv. Youka.** *Euphytica* 199: 317-324.
- Sparrow A. H., R. L. Cuany, J. P. Miksche and L. A. Schairer. 1961. **Some factors affecting the responses of plants to acute and chronic radiation exposures.** *Radiation Botany*. 1: 10–34.
- Stancato C., G., P. Mazzafera and M. S. Buckeridge. 2002. **Effects of light stress on the growth of the epiphytic orchid *Cattleya forbesii* Lindl. X *Laelia tenebrosa* Rolfe.** *Brazilian Journal of Botany* 25: 229-235.

- Statistical Analysis System. 2002. **Institute Inc., SAS/STAT. User's Guide**, versión 9.0. Carey, N. C.
- Szarek, S. 2005. **Use of concept of hormesis phenomenon to explain the law of diminishing returns**. Part II. *EJPAU Serie Econ.* 8: 1-61.
- Tanaka, A., N. Shikazono and Y. Hase. 2010. **Studies on biological effects of ion beams on lethality, molecular nature of mutation, mutation rate, and spectrum of mutation phenotype for mutation breeding in higher plants**. *Journal of Radiation Research* 51: 223-233.
- Urrea, A. I. y S. M. Ceballos. 2005. **Empleo de las radiaciones gamma en la inducción de variabilidad genética en *Heliconia psittacorum***. *Actualidades Biologicas* 27: 17-23.
- Verma, J., K. Sharma, K. Thakur, J. K. Sembi and S. P. Vij 2014. **Study on seed morphometry of some threatened Western Himalayan orchids**. *Turkish Journal of Botany* 38: 234-251.
- Wi, S. G., B. Y. Chung, J. H. Kim, M. H. Baek, D. H. Yang, J. W. Lee and J. S. Kim. 2005. **Ultrastructural changes of cell organelles in *Arabidopsis* stem after gamma irradiation**. *Journal of Plant Biology* 48: 195-200.
- Wi, S. G., B. Y. Chung, J. S. Kim, J. H. Kim, M. H. Baek, J. W. Lee and Y. S. Kim. 2007. **Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants**. *Micron* 38: 553-564.
- Yamaguchi, H., A. Shimizu A., K. Degi and T. Morishita. 2008. **Effects of dose and dose rate of gamma ray irradiation on mutation induction and nuclear DNA content in chrysanthemum**. *Breeding Science* 58: 331-335.
- Yamaguchi, H., A. Shimizu A., Y. Hase, K. Degi, A. Tanaka and T. Morishita. 2009. **Mutation induction with ion beam irradiation of lateral buds of chrysanthemum and analysis of chimeric structure of induced mutants**. *Euphytica* 165: 97-103.

- Yoon A., R., R. Kamaludin, A. Tajudin, K. Hazmi Z., A. Bakar D., A. Nezhadahmadi and F. Golam 2014. **The Contribution of muslim scientists in botanical science: Studies on the using of gamma rays for ginger plants (*Zingiber Officinale*).** *Stem Cell* 5: 88-94
- Yunus F., M., M. Azizi A., M. Kadir A., S. Daud K. and A. Rashid A. 2013. ***In vitro* mutagenesis of *Etilingera elatior* (Jack) and early detection of mutation using RAPD markers.** *Turkish Journal of Biology* 37: 716-725.
- Zolla, L., A. M. Timperio, W. Walcher and C. G. Huber. 2003. **Proteomics of light harvesting proteins in different plant species. Analysis comparison by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry.** Photosystem II. *Plant Physiology* 13: 198-214.

IX. CAPÍTULO IV

MUTAGÉNESIS *in vitro* EN SEMILLAS DE LA ORQUÍDEA *Laelia autumnalis*

RESUMEN

La mutagénesis *in vitro* con rayos gamma es un método efectivo en la inducción de variabilidad genética, para usar esta técnica en programas de mejoramiento genético es primordial determinar la radiosensibilidad y la dosis óptima de la radiación ionizante, por lo que el objetivo de este trabajo fue establecer la curva de radiosensibilidad y determinar la dosis letal media (DL₅₀) en semillas de la orquídea *L. autumnalis* irradiadas con rayos gamma (⁶⁰Co). Semillas de plantas del Banco de Germoplasma del Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos se sometieron a 11 tratamientos conformados por diferentes dosis de irradiación (10 a 100 Gy con intervalos de 10) y un testigo; después de la irradiación se realizó una prueba de viabilidad de las semillas con tetrazolio, las semillas se germinaron *in vitro* en medio Murashige y Skoog sin fitohormonas. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con cinco repeticiones, la unidad experimental consistió en una caja petri con 5 mg de semilla. Quince y 30 días después de la siembra se cuantificó en microscopio estereoscópico la supervivencia, imbibición de semillas y formación de protocormos. Los datos de estas variables se sometieron a análisis de varianza, correlación de Pearson, prueba de Tukey y regresión lineal. La supervivencia e imbibición se redujo conforme se incrementó la dosis de radiación, 30 días después de la siembra, la supervivencia se redujo a 41 % y la imbibición de semillas a 16 % al ser expuestas a 100 Gy. Se obtuvo un coeficiente de correlación altamente significativo entre las diferentes dosis de radiación aplicadas con la supervivencia de semillas (-0.96) y la viabilidad (-0.63), así como entre la supervivencia y viabilidad (0.61). El modelo de regresión lineal entre las dosis de radiación y

supervivencia e imbibición mostraron ajustes superiores de $R^2=0.92$, la DL_{50} para supervivencia se determinó en 81 Gy y 65 Gy para imbibición de semillas. Se concluye que la irradiación con rayos gamma a dosis cercanas de 81 Gy puede ser una herramienta útil en la producción de plantas mutantes para la obtención de nuevos cultivares de *L. autumnalis*.

Palabras clave: Dosis letal media, fitomejoramiento, irradiación gamma, orquídeas, radiosensibilidad.

In vitro* MUTAGENESIS IN SEEDS OF THE ORCHID *Laelia autumnalis

ABSTRACT

In vitro mutagenesis with gamma rays is an effective method for inducing genetic variability. In order to use this technique in breeding programs, it is essential to determine the radiosensitivity and optimal dose of ionizing radiation, so the objective of this research was to establish the radiosensitivity curve and determine the median lethal dose (LD₅₀) in seeds of the orchid *L. autumnalis* irradiated with gamma rays (⁶⁰Co). Plant seeds from the Germplasm Bank of the National System of Plant Genetic Resources were subjected to 11 treatments consisting of different irradiation doses (10 to 100 Gy with intervals of 10) and a control. After irradiation, a seed viability test was carried out with tetrazolium; the seeds were germinated *in vitro* in Murashige and Skoog medium without phytohormones. A completely randomized experimental design was used, with five replicates; the experimental unit consisted of a petri dish with 5 mg of seed. Fifteen and 30 days after sowing, survival, seed imbibition and protocorm formation were quantified using a stereoscopic microscope. The data of these variables were subjected to analysis of variance, Pearson correlation, Tukey's test and linear regression. Survival and imbibition were reduced as the radiation dose was increased; 30 days after sowing, survival was reduced to 41 % and seed imbibition to 16 % when exposed to 100 Gy. A highly significant correlation coefficient was obtained between the different radiation doses applied and seed survival (-0.96) and viability (-0.63), as well as between survival and viability (0.61). The linear regression model between radiation doses and survival and imbibition showed superior fits of R²=0.92; the LD₅₀ for survival was determined at 81 Gy, and for seed imbibition at 65 Gy. It is concluded that irradiation with

gamma rays at doses close to 81 Gy can be a useful tool in the production of mutant plants to obtain new *L. autumnalis* cultivars.

Keywords: Median lethal dose, plant breeding, gamma irradiation, orchids, radiosensitivity.

INTRODUCCIÓN

El mejoramiento por mutagénesis *in vitro* inducido con rayos gamma es un método simple, eficiente, rápido y barato para la inducción de variabilidad genética y la multiplicación de los mutantes seleccionados (Suprasanna *et al.*, 2012). Las radiaciones gama causan cambios en la estructura genética que pueden generar fenotipos deseados los cuales son difíciles de obtener a través de variación natural; sin embargo, cada especie, incluso cada órgano de la misma especie en diferente etapa fisiológica, difiere en la sensibilidad a la radiación (Xi *et al.*, 2012), por esta razón la determinación de la radiosensibilidad y de la dosis óptima de la radiación ionizante es un paso imprescindible en el mejoramiento por mutagénesis (Ashok *et al.*, 2015).

Las plantas ornamentales son idoneas para inducir mutación ya que después del tratamiento mutagénico los rasgos importantes como las características de la flor y los hábitos de crecimiento pueden ser fácilmente monitoreados (Urrea y Ceballos, 2005), por esto el mejoramiento por mutagénesis se ha convertido en una poderosa herramienta en el desarrollo de nuevas variedades en cultivos ornamentales (Kazi, 2015). Los rayos gamma son el agente mutagénico más utilizado en la inducción de mutaciones deseables en plantas ornamentales, a nivel mundial el 70 % de las variedades ornamentales se han desarrollado a través de esta técnica (Nagatomi y Degi, 2009), ya que los rayos gamma han demostrado ser más económicos y eficientes en comparación con otras fuentes de radiación ionizante debido a su fácil disponibilidad y poder de penetración (Moussa, 2006).

Entre las plantas en las que se ha utilizado este agente mutagénico se encuentra la violeta africana (*Saintpaulia* sp.), en la que mediante la combinación de mutagénesis y el cultivo *in vitro* se obtuvo una variedad sin la pubescencia en hojas que caracteriza a este género (González *et al.*, 2005); en torenia (*Torenia fournieri*) los mutantes mostraron una amplia gama de colores y patrones de coloración (Sasaki *et al.*, 2008); en *Tricyrtis hirta* se obtuvieron variaciones de valor en la horticultura como enanismo, hojas pequeñas y delgadas, además de que incrementaron el tamaño de las flores (Nakano *et al.*, 2010). En violeta persa (*Cyclamen persicum*) se obtuvieron modificaciones en el color y forma de los pétalos, así como plantas con esterilidad masculina (Sugiyama *et al.*, 2008). En *Lilium longiflorum* Thunb. cv. White fox, se obtuvieron hojas más gruesas y bifurcadas, además se logró la reducción del número de granos de polen, característica de valor en la especie, ya que los granos de polen contienen una gran cantidad de pigmento que mancha los pétalos (Xi *et al.*, 2012).

Laelia autumnalis es una de las orquídeas nativas de México más apreciadas por sus hermosas y aromáticas flores color magenta. Sin embargo, su uso como planta ornamental se encuentra restringido porque no existen variedades comerciales y su venta se limita a ejemplares silvestres, por lo que esta especie es ideal para generar variabilidad que cumpla con los estándares de calidad que demanda el mercado florícola, con base en lo anterior se planteó como objetivo establecer la curva de radiosensibilidad y determinar la dosis letal media (DL₅₀) en semillas de la orquídea *L. autumnalis* irradiadas con rayos gamma (⁶⁰Co).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizó un lote de semillas de la orquídea *L. autumnalis*, procedentes de seis frutos (cápsulas) obtenidos de plantas de la colección del Banco de Germoplasma del Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos, ubicado en la Facultad de Agrobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en Uruapan, Michoacán. Las cápsulas con semillas se obtuvieron mediante autofecundación manual de las plantas, después de cuatro meses de desarrollo se colectaron las cápsulas.

Medio de cultivo

Se utilizó un medio con las sales minerales de Murashige y Skoog (1962) (MS), sin fitohormonas y adicionado con sacarosa (30 g L^{-1}), mio-inositol (100 mg L^{-1}), tiamina (0.4 mg L^{-1}) y agar (6 g L^{-1}), el pH se ajustó a 5.7 ± 0.1 con NaOH 1 N y se esterilizó en autoclave durante 15 min a 1.2 kg cm^{-2} de presión y $121 \text{ }^\circ\text{C}$.

Prueba de germinación de semillas sin irradiar de *L. autumnalis*

Se tomaron cinco muestras de la semillas (20 mg) del lote de seis capsulas de *L. autumnalis* y se colocaron en jeringas con capacidad de 10 mL, donde se efectuó la desinfección con cloro comercial 15 % v/v (6 % de hipoclorito de sodio, ingrediente activo) durante 15 min. En la campana de flujo laminar se decantó la solución desinfectante y se hicieron tres enjuagues con agua estéril. La semilla polvo de cada muestra se suspendió en 0.5 mL de agua estéril y se colocó en frascos de vidrio (100 mL de capacidad) con 20 mL de medio MS. La incubación se

efectuó con fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad y radiación fotosintéticamente activa de $45 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ proporcionada por lámparas de luz fluorescente blanca de 75 W.

Irradiación con rayos gamma ^{60}Co

Semillas de seis cápsulas se sometieron a diferentes dosis de irradiación (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 Gy). Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 11 tratamientos y cinco repeticiones, la unidad experimental consistió en una caja petri con 5 mg de semillas. La irradiación se realizó con el irradiador Gammacel 220, en el Departamento del Irradiador Gamma del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ).

Prueba de tetrazolio

Después del proceso de irradiación, para determinar la viabilidad de las semillas se tomó una muestra de 5 mg de semillas y se realizó la prueba de tetrazolio al 1 % para cada tratamiento.

Establecimiento del cultivo aséptico

Posterior a la irradiación se colocaron 25 mg de semillas por tratamiento en jeringas con capacidad de 10 mL, la semilla se desinfectó en una solución al 15 % v/v de cloro comercial (6 % de hipoclorito de sodio, ingrediente activo) durante 15 min. En la campana de flujo laminar se decantó la solución de hipoclorito de sodio y se realizaron tres enjuagues con agua estéril. La semilla polvo de cada jeringa se suspendió en 0.5 mL de agua estéril y se colocaron cinco gotas de esta solución en cajas petri con 15 mL de medio MS. La incubación se efectuó a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad y radiación fotosintéticamente activa de $45 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ proporcionada por lámparas de luz fluorescente blanca de 75 W.

Variables evaluadas

Prueba de germinación de semillas sin irradiar. Veinticinco días después de sembradas las semillas se determinó el porcentaje de germinación mediante observación en microscopio estereoscópico, en la campana de flujo laminar se tomaron tres muestras en cinco frascos, de aproximadamente 1 cm² de medio de cultivo con semillas, en cada muestra se cuantificó el número de semillas germinadas y el número de semillas sin germinar.

Viabilidad. Se cuantificó mediante observación en el microscopio estereoscópico el número de semillas en las cuales se tiñó el embrión y el número de semillas en las que no se tiñó, para obtener el porcentaje de semillas viables y no viables. Con la suma de las semillas teñidas y sin teñir se obtuvo el número total de semillas, que se usó como denominador para obtener el porcentaje de semillas viables, de la siguiente forma: % de semillas viables = (Número de semillas teñidas/Número total de semillas) × 100.

Germinación de semillas irradiadas. Quince y 30 días después se cuantificó en microscopio estereoscópico el número de semillas sin germinar, germinadas y las etapas de germinación (porcentaje de imbibición y formación de protocormos). Con la suma de semillas sin germinar y las germinadas en cada etapa fenológica se obtuvo el número total de semillas, que se usó como denominador para obtener los porcentajes de supervivencia, imbibición y formación de protocormos, de la siguiente forma:

$$\% \text{ de supervivencia} = \frac{\text{Número de semillas vivas}}{\text{Número total de semillas}} \times 100$$

En cada variable se utilizó el mismo procedimiento.

Análisis estadístico

Los datos de las variables respuesta se procesaron mediante análisis de varianza ($\alpha = 0.05$), se calculó el coeficiente de correlación de Pearson y se realizó la prueba de Tukey para la comparación de medias entre tratamientos con el uso del programa SAS (Statistical Analysis System) versión 9.0 (Statistical Analysis System, 2002). Para conocer la magnitud de la respuesta de cada variable a las dosis de radiación, se evaluó un modelo de regresión lineal ($y=a+bx$). Sin embargo, sólo las variables supervivencia e imbibición de semillas se ajustaron a este modelo, por lo que la determinación de la DL_{50} sólo se realizó para estas variables. La curva de radiosensibilidad se realizó con base en la proyección de la ecuación obtenida en el análisis de regresión lineal para la supervivencia de semillas a los 15 días después de la siembra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Prueba de germinación de semillas sin irradiar de *L. autumnalis*

El proceso de germinación se inició siete días después de la siembra (dds) y 18 días después se obtuvo 93.7 % de germinación (Fig. 1A), estos porcentajes son similares a los reportados en *Brassia verrucosa* con 56.70 %, en la cual la germinación inició seis dds (Flores-Escobar *et al.*, 2011); en contraste para *Oncidium stramineum* reportan un 47.69 % (Flores-Escobar *et al.*, 2008); en *Chloraea crispa* obtuvieron entre 33 y 40 % de germinación, la cual inició cuatro dds (Verdugo *et al.*, 2007). En las semillas germinadas de *L. autumnalis* se registraron las etapas fisiológicas de imbibición, formación de protocormos fotosintéticos y protocormos en diferenciación. La formación de protocormos fotosintéticos presentó el mayor porcentaje (54 %) de protocormos (Fig. 1B).

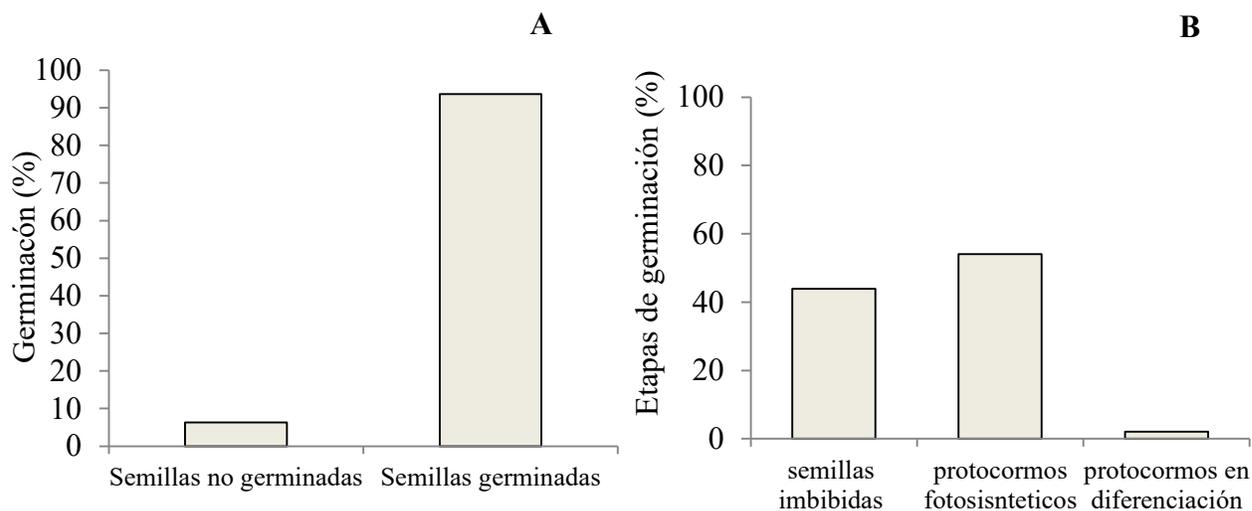


Figura 1. Germinación *in vitro* de semillas de la orquídea *Laelia autumnalis* A) porcentaje de germinación y B) Porcentaje de germinación por etapas fisiológicas.

Efecto de la irradiación gamma sobre la viabilidad y germinación de semillas

El uso de irradiación gamma influyó significativamente sobre las variables evaluadas, excepto en la formación de protocormos a los 5 dds (Cuadro 1). La prueba de tetrazolio mostró que la viabilidad de las semillas se redujo significativamente en las semillas tratadas con 70 y 100 Gy, que presentaron 8.6 % menos semillas viables que las semillas sin irradiar. En el resto de tratamientos no se presentó diferencia estadística significativa con las semillas no irradiadas (Fig. 2A).

Cuadro 1. Análisis de varianza sobre el efecto de la radiación gamma ^{60}Co en la supervivencia y germinación de semillas de *Laelia autumnalis*.

Días después de la siembra	Variable	Media	CM		CV	R ²
			Radiación	Error		
	Viabilidad	77.9	49.6**	14.2	4.8	0.5
15	Supervivencia	58.2	1244.0**	12.2	5.9	0.9
30	Supervivencia	64.7	880.5**	10.3	4.9	0.9
15	Semillas imbibidas	34.5	10088.0**	14.4	11.0	0.9
30	Semillas imbibidas	30.6	487.6**	7.4	8.8	0.9
15	Formación de protocormos	23.7	21.3 ^{ns}	16.3	17.0	0.7
30	Formación de protocormos	34.0	77.1**	14.1	11.2	0.6

** $p \leq 0.01$; ns=no significativo; CM: cuadrado medio, CV: coeficiente de variación, R²: coeficiente de determinación.

En la supervivencia e imbibición de semillas 15 y 30 días después de la siembra, no se presentó efecto de la radiación al ser expuestas a dosis entre 10 y 20 Gy, estadísticamente fueron iguales que las semillas no tratadas. Sin embargo, a partir de 30 Gy y conforme se incrementó la dosis de irradiación se redujo la supervivencia, a los 30 dds con la dosis de 100 Gy la supervivencia se redujo hasta 41 % y la imbibición de semillas hasta 16 %. No siendo así para la formación de protocormos, donde 15 dds la radiación no influyó. A los 30 días la formación de protocormos disminuyó en 9 % al someter las semillas a 70 Gy, en comparación con las no tratadas (Fig. 2B a 2D y 3).

La disminución en el porcentaje de imbibición y formación de protocormos conforme se incrementa la dosis de radiación se puede deber a que en las células que sobreviven se producen

radicales libres que ocasionan desórdenes metabólicos en el ápice de las semillas y se retarda la germinación, como sucede en arroz (Pavan *et al.*, 2013), ya que la exposición de semillas a altas dosis de rayos gamma interfiere con la síntesis de proteínas, el equilibrio hormonal, la actividad enzimática y el posterior intercambio de gases en las hojas (Hameed *et al.*, 2008). Se reduce la actividad de α -amilasa y se ha reportado que una alta actividad de α -amilasa incrementa el metabolismo y el vigor de las semillas (Stoeva *et al.*, 2001; Pavan *et al.*, 2013), de igual forma se reduce la actividad de la lipasa, lo cual incrementa la permeabilidad de la membrana de la semilla, en algunos estudios se ha reportado que la permeabilidad está relacionada con la pérdida de vigor de las semillas por lo tanto el incremento de la dosis de radiación incrementa la permeabilidad de la membrana de las semilla y reduce la germinación (Wang y You, 2000; Thanki *et al.*, 2000). Los cambios morfológicos, estructurales y funcionales dependen de la intensidad y duración de la dosis gamma a la que son expuestos los explantes (Marcu *et al.*, 2013).

La reducción de la germinación conforme se incrementa la dosis de irradiación es un fenómeno común en los experimentos de inducción de mutaciones y se ha reportado en diversos cultivos como *Zea maíz* (Marcu *et al.*, 2013), *Nigella sativa* (Maamoun *et al.*, 2014), *Avena sativa* (Basha *et al.*, 2015), *Amaranthus cruentus* L. (Amir y Khavar, 2012), *Molucella laevis* (Minisi *et al.*, 2013).

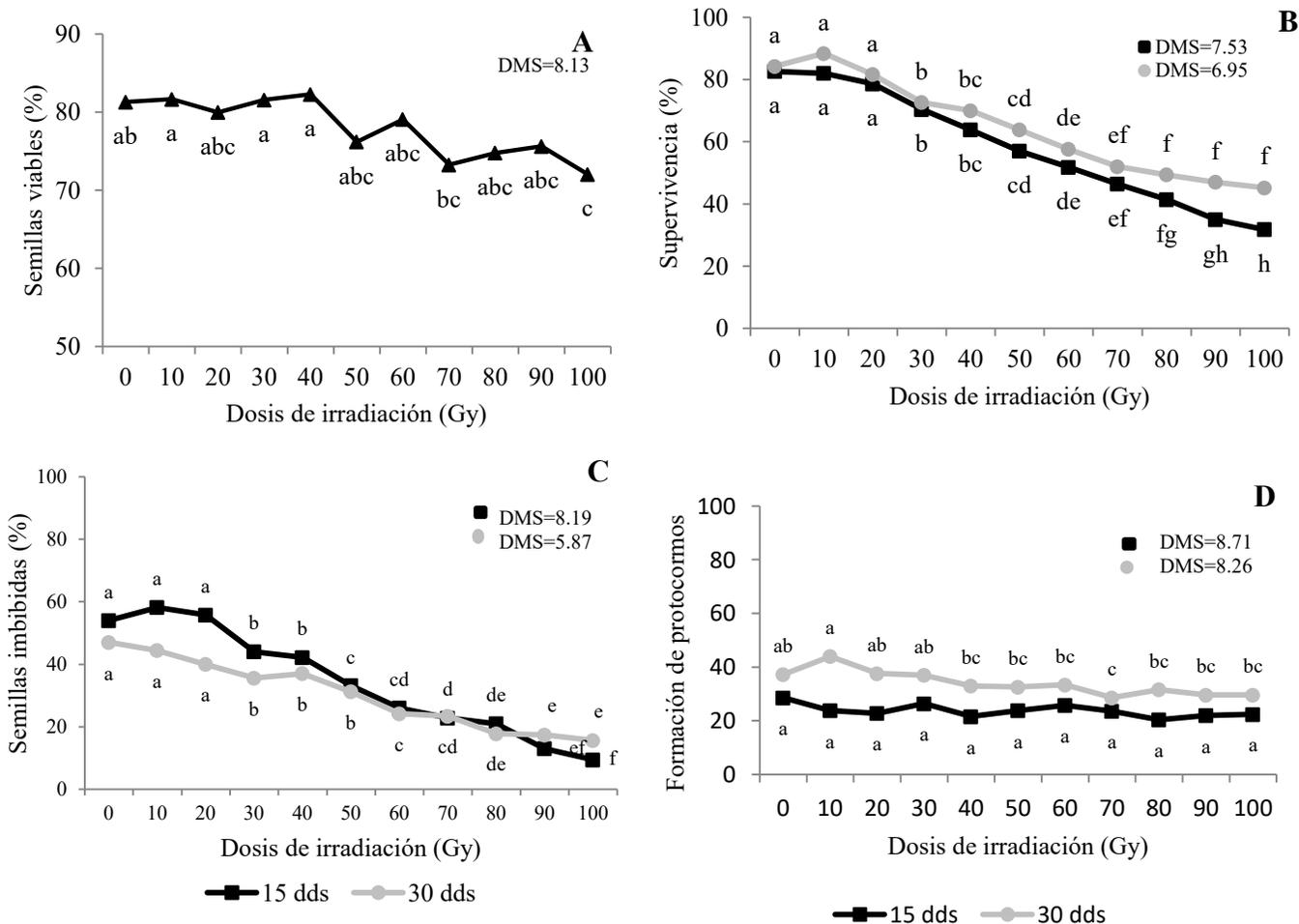


Figura 2. Efecto de la irradiación gama (^{60}Co) sobre la viabilidad y germinación de semillas de la orquídea *Laelia autumnalis*. A) porcentaje de semillas viables, B) porcentaje de supervivencia de semillas, C) porcentaje de semillas imbibidas y D) porcentaje de formación de protocormos.

Se obtuvo un coeficiente de correlación negativo y altamente significativo entre las diferentes dosis de irradiación aplicadas y la supervivencia de semillas (-0.96), y con la viabilidad obtenida con la prueba de tetrazolio (-0.63). Además, se presentó un coeficiente de correlación positivo y altamente significativo entre la supervivencia y viabilidad (0.61), estos resultados nos indican que la prueba de tetrazolio es un método confiable para determinar la viabilidad de las

semillas irradiadas con rayos gamma ^{60}Co y asimismo es posible determinar la dosis letal media (DL_{50}) a través de la viabilidad de las semillas obtenida con esta prueba. En *Cattleya mendelli* Salazar-Mercado (2012) encontró que la diferencia entre la prueba de viabilidad con tetrazolio y la prueba de germinación fue de 1.1 % lo que indica que no existe diferencia ($P < 0.05$) entre ambas pruebas. Esto demuestra que la prueba de tetrazolio puede ser utilizada para predecir la capacidad de germinación.

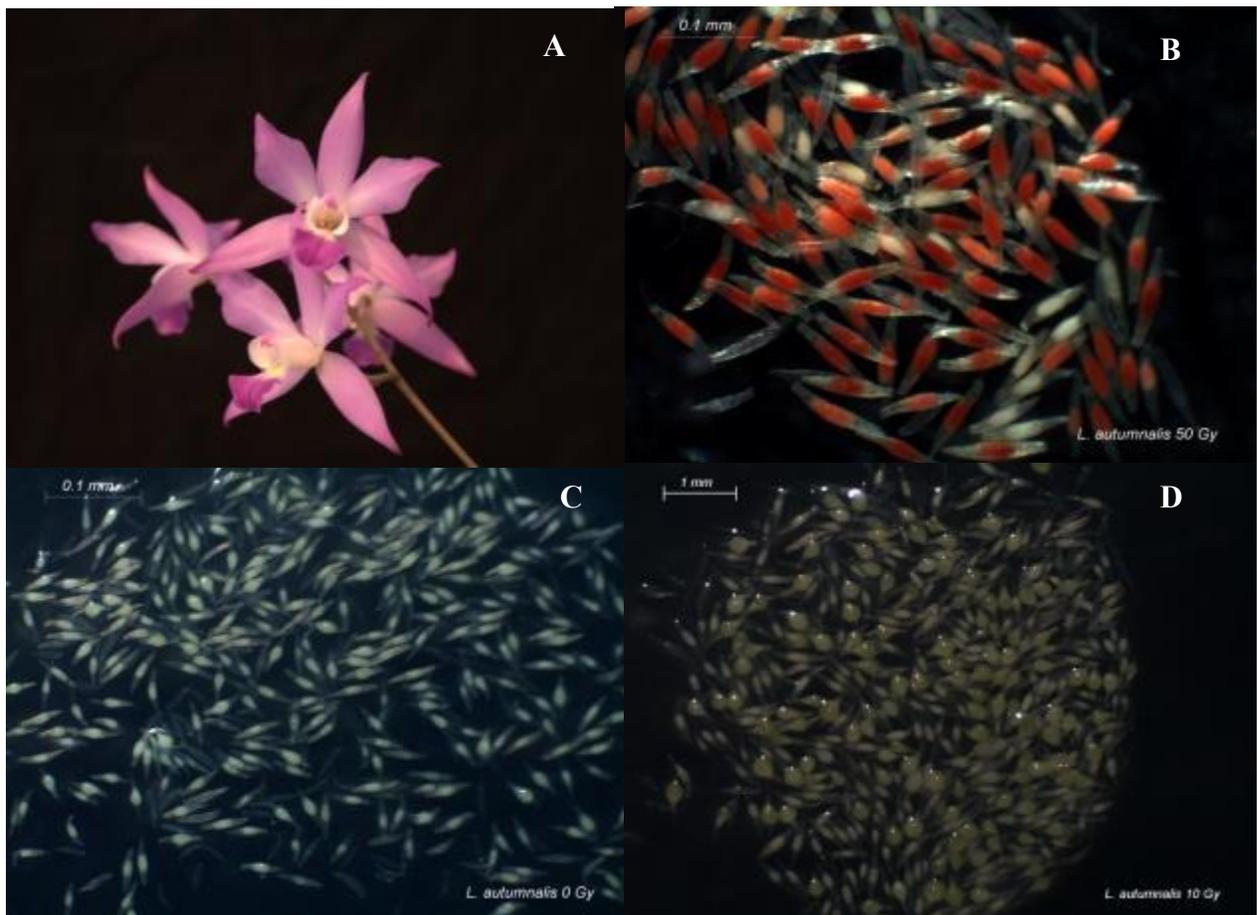


Figura 3. Efecto de la irradiación gamma sobre la viabilidad y germinación de semillas de la orquídea *Laelia autumnalis*. A) genotipo a partir del cual se obtuvo la semilla, B) prueba de viabilidad con tetrazolio, C) semillas imbibidas, D) formación de protocormos.

Dosis letal media en semillas irradiadas

El modelo de regresión lineal entre los diferentes niveles de irradiación y la supervivencia e imbibición de semillas mostraron ajustes superiores de $R^2=0.92$, la DL_{50} para la supervivencia se determinó en 81 Gy y 65 Gy para imbibición de semillas (Figura 4). Estos resultados indican que dosis cercanas a 80 Gy son las adecuadas para utilizarse en programas de mejoramiento genético, para la obtención de nuevos cultivares de la orquídea *Laelia autumnalis*.

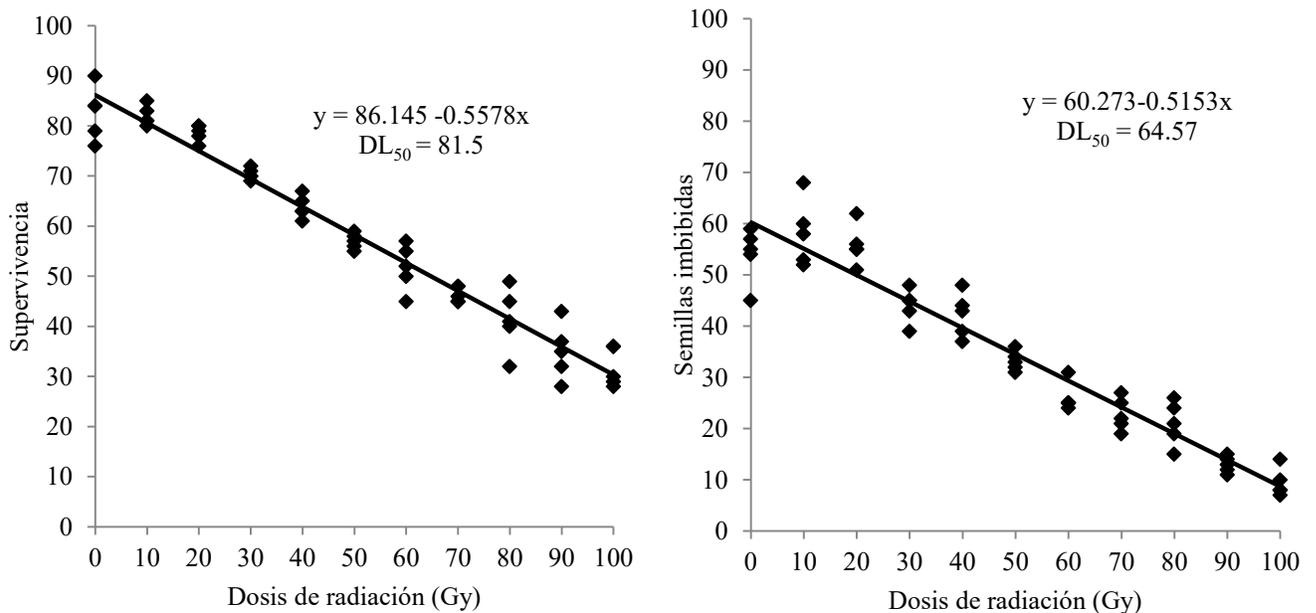


Figura 4. Regresión del efecto de la radiación gamma ^{60}Co sobre la germinación de semillas de la orquídea *Laelia autumnalis* A) supervivencia y B) semillas imbibidas.

Curva de radiosensibilidad

Se establecieron cinco intervalos de radiosensibilidad para las semillas de *Laelia autumnalis* (Figura 5). La zona de radioestimulación, con valores superiores o iguales al testigo, esta zona se presentó con la dosis de 5 Gy; la zona de transición, se registró apartir de la dosis de 10 y hasta 70 Gy, esta zona presentó una supervivencia menor que las semillas no irradiadas

pero mayor que la dosis letal media; la dosis letal media se obtuvo a 80 Gy, dosis en la que se presento el 50 % de supervivencia; el rango de radioinhibición se observó con las dosis de 90 a 150 Gy y a partir de 160 Gy se presentó la letalidad para las semillas.

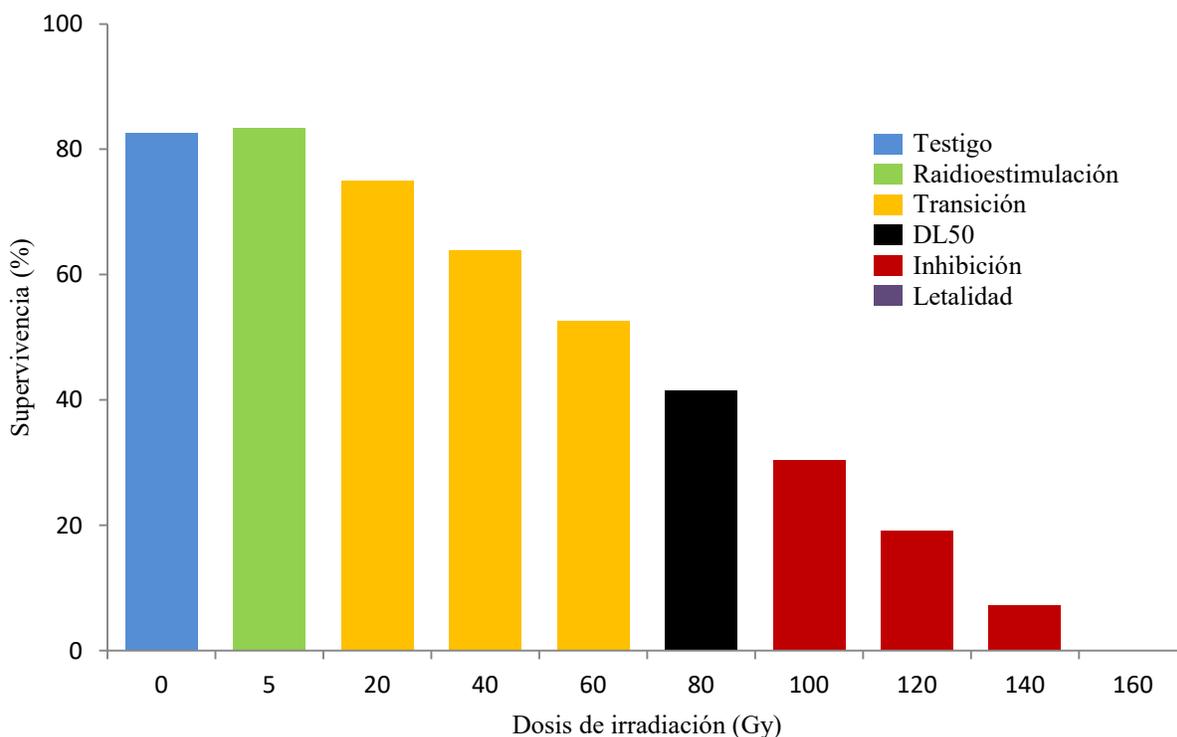


Figura 5. Curva de radiosensibilidad de semillas de *Laelia autumnalis* proyectada con base en la ecuación de regresión lineal para la supervivencia de semillas.

CONCLUSIONES

La prueba de tetrazolio es un método confiable para determinar la viabilidad de las semillas irradiadas con rayos gamma ^{60}Co .

La irradiación con rayos gamma con dosis cercanas a 81 Gy es una herramienta útil en la producción de plantas mutantes para la obtención de nuevos cultivares de *L. autumnalis*.

LITERATURA CITADA

- Amir, A. and A. Khavar. 2012. **Effect of gamma irradiation on germination characters of amaranth seeds.** *European Journal of Experimental Biology* 2:995-999.
- Ashok, A. N., D. Rachayya, A. Akash, B. Harinath, S. Mahadeo and S. Penna. 2015. **Radiation-induced *in vitro* mutagenesis system for salt tolerance and other agronomic characters in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.).** *The Crop Journal* 3:46-56.
- Basha, M. H., A. K. Mehta, V. K. Gour and S. Kachare. 2015. **Biological effects of gamma irradiation in oat (*Avena sativa* L.).** *Range Management and Agroforestry* 36 (1): 60-65.
- Flores-Escobar G., I. Gil-Vázquez, M. T. Colinas-León y M. Mata-Rosas 2011. **Propagación *in vitro* de la orquídea *Brassia verrucosa* Bateman Ex. Lindl.** *Revista Chapingo Serie Horticultura* 17(1):5-8.
- Flores-Escobar, G., J. P. Legaria-Solano, I. Gil-Vázquez y M. T. Colinas-León. 2008. **Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. Una orquídea amenazada y endémica de México.** *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14(3):347-353.
- González, M. C., J. L. Fuentes, S. Cortés y O. Sam. 2005. **"Delia", Nueva variedad de violeta africana (*Saintpaulia* sp.) obtenida a partir del empleo de técnicas biotecnológicas y nucleares.** *Cultivos Tropicales* 26(1):67-68.
- Hameed, A., T. S. Mahmud, B. M. Atta, M. A. Haq and H. Sayed. 2008. **Gamma irradiation effects on seed germination and growth, protein content, peroxidase and protease activity, lipid peroxidation in desi and kabuli chickpea.** *Pakistan Journal of Botany* 40:1033-1041.
- Kazi N. A. 2015. **Mutation breeding in flower crops.** *Asian Journal of Multidisciplinary Studies* 3(3):228-230.

- Maamoun, M. K. M., M. E. El-Mahrouk, Y. H. Dewir and S. A. Omran. 2014. **Effect of radiation and chemical mutagens on seeds germination of black cumin (*Nigella sativa* L).** *Journal of Agricultural Technology* 10(5):1183-1199.
- Marcu, D., D. Grigore, C. Cosma and V. Cristea. 2013. **Gamma radiation effects on seed germination, growth and pigment content, and ESR study of induced free radicals in maize (*Zea mays*).** *Journal of Biological Physics* 39:625-634.
- Minisi, F. A., M. E. El-mahrouk, M. F. El-Din and M. N. Nasr. 2013. **Effects of Gamma radiation on germination, growth characteristics and morphological variations of *Moluccella laevis* L.** *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Sciences* 13(5): 696-704.
- Moussa, J. P. 2006. **Role of gamma irradiation in regulation of NO₃ level in rocket (*Eruca vescaria* subsp. *sativa*) plants.** *Russian Journal of Plant Physiology* 53:193–197.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. **A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures.** *Physiology Plantarum* 15:473-497.
- Nagatomi, S. and K. Degi. 2009. **Mutation breeding of *Chrysanthemum* by gamma field irradiation and *in vitro* culture.** In: Shu Q. Y. (Ed.). **Induced Plant Mutations in the Genomics.** Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. pp. 253-256.
- Nakano. M., J. Amano, Y. Watanabe, T. Nomizu, M. Suzuki, K. Mizunashi, S. Mori, S. Kuwayama, D. C. Han, H. Saito, H. Ryuto, N. Fukunishi and T. Abe. 2010. **Morphological variation in *Tricyrtis hirta* plants regenerated from heavy ion beam-irradiated embryogenic calluses.** *Plant Biotechnology* 27:155-160.
- Pavan, K. D., A. Chaturvedi, M. Sreedhar, M. Aparna, P. Venu-Babu and P. Singhal. 2013. **Gamma radiosensitivity study on rice (*Oryza sativa* L.).** *Asian Journal of Plant Science and Research* 3(1):54-68.

- Salazar-Mercado, S. A. 2012. **Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombroin (Orchidaceae).** *Acta Agronómica* 61 (1): 69-78.
- Sasaki, K., R. Aida, T. Niki, H. Yamaguchi, T. Narumi, T. Nishijima, Y. Hayashi, H. Ryuto, N. Fukunishi, T. Abe and N. Ohtsubo. 2008. **High-efficiency improvement of transgenic torenia flowers by ion beam irradiation.** *Plant Biotechnology* 25:81-89.
- Statistical Analysis System 2002. Institute Inc., SAS/STAT. **User's Guide.** Versión 9.0. Carey, N. C.
- Stoeva, N., Z. Zlatev and Z. Bineva. 2001. **Physiological response of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to gamma-irradiation treatment. II water-exchange, respiration and peroxidase activity.** *Journal of Environmental Protection and Ecology* 2(2):304-308.
- Sugiyama, M., H. Saito, H. Ichida, Y. Hayashi, H. Ryuto, N. Fukunishi, T. Terakawa, T. Abe. 2008. **Biological effects of heavy-ion beam irradiation on cyclamen.** *Plant Biotechnology* 25:101-104.
- Suprasanna P., S. M. Jain, S. J. Ochatt, V. M. Kulkarni and S. Predieri. 2012. **Applications of *in vitro* techniques in mutation breeding of vegetatively propagated crops.** *In:* Shu Q. Y., Forster B. P., Nakagawa H. (Eds.). **Plant Mutation Breeding and Biotechnology.** CAB International, Wallingford (UK). pp. 369–383.
- Thanki R. J., K. C. Patel and R. D. Patel. 2007. **Lipase Activity of Gamma-irradiated Castor Seeds Germinated in Dark.** *Earth Environmental Science* 10: 211-214.
- Urrea A. I., S. M. Ceballos. 2005. **Empleo de las radiaciones gamma en la inducción de variabilidad genética en *Heliconia psittacorum*.** *Actual Biology* 27 (82): 17-23

- Verdugo G., J. Marchant, M. Cisternas, X. Calderón and P. Peñaloza. 2007. **Caracterización morfológica de la germinación de *Chloraea crispa* Lindl. (Orchidaceae) usando análisis de imagen.** *Gayana Botánica* 64(2): 232-238.
- Wang, Z, and R. L. You. 2000. **Changes in wheat germination following γ -ray irradiation: An *in vivo* electronic paramagnetic resonance spin-probe study.** *Environmental and Experimental Botany* 43: 219-225.
- Xi, M., L. Sun, S. Qiu, J. Liu, J. Xu and J. Shi. 2012. ***In vitro* mutagenesis and identification of mutants via ISSR in lily (*Lilium longiflorum*).** *Plant Cell Reports* 31:1043–1051.

X. DISCUSIÓN GENERAL

El Plan de Acción Mundial para los Recursos Fitogenéticos establece como medidas para el uso sostenido de estos recursos, el desarrollo de investigaciones que permitan incrementar la variación intra e interespecífica, el impulso de las iniciativas en materia de fitomejoramiento que fortalezcan la capacidad para obtener variedades ya adaptadas a las condiciones locales, el incremento de la diversidad genética y el fomento de uso de cultivos, variedades y especies infrautilizadas, entre otras. Con estas medidas se espera un impacto positivo en el uso y conservación del amplio y variado conjunto de recursos fitogenéticos que garanticen un flujo continuo de variedades mejoradas, mediante el aprovechamiento de características sobresalientes y se incremente la producción de bienes y servicios agrícolas en calidad y cantidad, de tal manera que estos satisfagan la creciente demanda mundial (FAO, 2011).

México al ser un país megadiverso en flora, representa una fuente inagotable para generar variedades comerciales competitivas en los mercados internacionales. Sin embargo, hasta ahora las variedades desarrolladas a partir del germoplasma nativo han sido generadas en otros países, tal es el caso de las cactáceas, que son la base de grandes industrias en diversos países desarrollados (Villavicencio *et al.*, 2010); otro ejemplo es la dalia (*Dahlia* spp.) que a pesar de que México es el país de origen y que en 1963 fue declarada por decreto presidencial “flor nacional”, de la cual, existe una gran cantidad de variedades desarrolladas en Alemania, Francia e Inglaterra, en la actualidad se han registrado más de 15,000 formas en los países Europeos (Mera y Bye, 2006). La nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*) es un recurso fitogenético de México, ya que es el centro de diversidad de esta especie, sin embargo, se producen y comercializan más de 55 variedades de las cuales ninguna se ha generado en el país (Canul-Ku *et al.*, 2010).

Esta creciente demanda de variedades novedosas se puede lograr a través de la inducción de mutaciones. En plantas ornamentales la mutagénesis es considerada una herramienta poderosa, se han registrado 720 variedades ornamentales en la base de datos de la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA, 2017). Entre los géneros más empleados en la mutagénesis se encuentran *Alstroemeria*, *Begonia*, *Chrysanthemum*, *Dahlia*, *Dianthus*, *Rosa* y *Streptocarpus*, estos géneros agrupan 70 % de las variedades mutantes registradas. Estos datos demuestran que la inducción de mutaciones es un método eficiente en la generación de variedades ornamentales.

En México sólo se han realizado trabajos para determinar la radiosensibilidad en especies como *Tigridia pavonia* (Díaz *et al.*, 2003), *Polianthes tuberosa* (Estrada-Basaldúa *et al.*, 2011), *Dendranthema grandiflora* (Castillo-Martínez *et al.*, 2015), *Helianthus annuus* (Díaz *et al.*, 2017) y *Laelia autumnalis* (Hernández-Muñoz *et al.*, 2017). Conocer la radiosensibilidad es esencial en un programa de mejoramiento genético por mutagénesis, debido a que cada especie, genotipo e incluso tipo y tamaño de tejido irradiado presentan diferente sensibilidad a la radiación (Pavan *et al.*, 2013).

La exposición de tejidos a dosis altas de radiación incrementa la frecuencia de daños cromosómicos, lo que reduce el crecimiento de las plantas, por el contrario la aplicación de dosis bajas de irradiación estimula el crecimiento celular (Chakravarty y Sen, 2001). Los organismos vivos han desarrollado mecanismos de adaptación a dosis bajas de irradiación que conducen a la estimulación de ciertas funciones vitales (Aladjadjiyan, 2007), y actúan como un mecanismo disparador o impulsor que incrementa la actividad general de enzimas como las polifenoloxidasas, catalasas, peroxidasas y esterasas, las cuales conllevan a la formación de sustancias fisiológicamente activas que a bajas concentraciones aceleran la división celular

(Cwintal y Olszewski, 2007; Khalifa, 2011). Además se provoca un aumento en la velocidad de conversión de los sustratos respiratorios en pequeñas moléculas, a partir de las cuales se forman los nuevos constituyentes celulares que dan origen a la plántula (Chen *et al.*, 2005). Esto puede explicar porque en la presente investigación al evaluar el efecto de la radiación gamma ^{60}Co en semillas de la orquídea *Laelia autumnalis* a dosis entre 3 y 15 Gy se formó 61 % más protocormos fotosintéticos que en las semillas sin irradiar. Además, las semillas irradiadas con 3, 15 y 18 Gy formaron 73 % más promeristemas, lo que confirma el efecto estimulante de la radiación gamma ^{60}Co a dosis bajas en la germinación de semillas de *L. autumnalis* y el desarrollo de las plántulas.

Los radicales libres, iones y moléculas excitadas que se forman por la radiación contribuyen a una mayor eficiencia en la utilización de las vías bioquímico-metabólicas, las cuales se reflejan en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Álvarez *et al.*, 2012). Aunque en la germinación de semillas irradiadas de la orquídea *L. autumnalis* no se evaluaron rutas bioquímico-metabólicas que indiquen la estimulación de la germinación, se pudo comprobar que al tratar protocormos con 3 Gy se estimuló la formación de las hojas, ya que a los 60 días después de la siembra (dds) la totalidad de los protocormos tratados con 3 Gy presentaron hojas y en los protocormos no irradiados solo el 12.5 % generó hojas a los 60 dds. La radioestimulación con dosis bajas también se observó al irradiar con rayos gamma ^{60}Co protocormos de *L. autumnalis* con dosis de 5 a 30 Gy, donde las dosis de 20 a 30 Gy estimularon la presencia de clorofila en los protocormos y con 5 Gy se incrementó la altura de plántula en 32 %.

En los programas de fitomejoramiento es imprescindible conocer además de la sensibilidad de los tejidos a la radiación, la dosis letal media (DL_{50}), que en el caso de semillas

corresponde a la cantidad de radiación absorbida con la cual sobrevive el 50 % de la población que ha sido expuesta, proporción que se considera como el intervalo que favorece la aparición de mutaciones útiles en los programas de mejoramiento genético. En el caso de plántulas, la DL₅₀ o dosis reductiva media (GR₅₀) se determina cuando un carácter manifiesta una disminución de 50 % en su expresión respecto al tratamiento testigo, pues la radiación absorbida provoca cambios en el ADN y origina mutaciones somáticas, mismas que causan alteraciones en la fisiología de la plántula (Ángeles-Espino *et al.*, 2013).

Al igual que la sensibilidad, la DL₅₀ y GR₅₀ también son específicas para cada especie, genotipo e incluso para cada tipo de tejido, como se observó en *L. autumnalis*, donde la DL₅₀ para la supervivencia de protocormos se determinó en 53 Gy, la GR₅₀ para formación de hojas fue de 28 Gy y la DL₅₀ para semillas se estableció en 81 Gy. Estos resultados demuestran que en la determinación de la DL₅₀ y GR₅₀ influye el tipo de tejido, que está en función del contenido de agua del material vegetal expuesto, debido a que el efecto biológico de la radiación se basa en la interacción con átomos o moléculas en la célula, en particular con el agua, para producir radicales libres y efectuar cambios en bases y rupturas en las uniones de hidrógeno entre cadenas complementarias de ADN (Kovács y Keresztes, 2002). Estos radicales pueden dañar componentes importantes de las células y cambiar la morfología, anatomía, bioquímica y fisiología de las plantas en función de la dosis de radiación (Wi *et al.*, 2007) y del contenido de agua en el explante. Por esto las semillas de la orquídea *L. autumnalis* toleraron dosis más altas de radiación establecer la DL₅₀ que los protocormos.

XI. CONCLUSIONES GENERALES

El uso de radiación gamma ^{60}Co a dosis bajas estimuló la germinación y el desarrollo de las plántulas lo que permitió reducir el tiempo necesario para la germinación y obtención de plántulas listas para aclimatarse en invernadero.

La irradiación con rayos gamma ^{60}Co presentó un efecto inversamente proporcional sobre el desarrollo de las plántulas de *Laelia autumnalis*.

El establecimiento de la DL_{50} y GR_{50} para semillas y protocormos de *Laelia autumnalis* permitió establecer las bases para iniciar un programa de mejoramiento genético por mutagénesis con rayos gamma ^{60}Co en la orquídea *Laelia autumnalis*.

XI. LITERATURA CITADA COMPLEMENTARIA

- Aladjadjian, A. 2007. **The use of physical methods for plant growing simulation in Bulgaria.** *Journal Central European Agriculture* 8(3):369-380.
- Álvarez F. A., L. Chávez S. and R. Ramírez F. 2012. **Indicadores fisiológicos en plantas de *Solanum lycopersicum* L. procedentes de semillas irradiadas con rayos X.** *Bioteología Vegetal* 12(3):173-177.
- Ángeles-Espino A., J. A. Valencia-Botín, G. Virgen-Calleros, C. Ramírez-Serrano, L. Paredes-Gutiérrez y S. Hurtado-De la Peña. 2013. **Determinación de la dosis (DL₅₀) con ⁶⁰Co en vitroplántulas de *Agave tequilana* var. Azul.** *Revista Fitotecnia Mexicana* 36(4): 381-386.
- Canul-Ku J., F. García-Pérez, S. Ramírez-Rojas y F. de J. Osuna-Canizales. 2010. **Estrategias para el mejoramiento genético de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* willd. ex klotzsch).** *Investigación Agropecuaria* 7(1): 44-54.
- Castillo-Martínez, C. R., E. De la Cruz-Torrez, G. Carrillo-Castañeda y C. H. Avendaño-Arrazate, C. H. (2015). **Inducción de mutaciones en crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) usando radiación gamma y etil metano sulfonato.** *Agroproductividad* 8(2): 60-64.
- Chakravarty, B. and S. Sen. 2001. **Enhancement of regeneration potential and variability by γ -irradiation in cultured cells of *Scilla indica*.** *Biologia Plantarum* 44:189-193.
- Chen P. Y., Y. J. Liu, X. L. Wang, Z. Y. Ren and M. Yue. 2005. **Effect of microwave and He-Ne laser on enzyme activity and biophoton emission of *Isatis indigotica* Fort.** *Journal of Integrative Plant Biology* 47(7):849–855.

- Cwintal M. and J. Olszewski. 2007. **Effect of pre-sowing laser stimulation of seeds on the intensity of photosynthesis and transpiration and on the yielding of alfalfa (in Polish).** *Acta Agrophysica* 147:345-352.
- Díaz, L. E., A. Morales R., A. Olivar H., P. Hernández H., J. A. Juárez C., J. F. León R, N. Francisco F., H. Santiago S., C. H. Bravo D., J. M. Campos P., H. R. Bravo D., E. T. Díaz O. and J. M. Loeza C. 2017. **Gamma irradiation effect of ^{60}Co on the germination of two subtropical species in the Tehuacán-Cuicatlán Valley.** *International Journal of Advanced Engineering Research and Science* 4(8): 56-61.
- Díaz, L. E., J. Pichardo R., E. De la Cruz, T., T. Norman, M., F. Sandoval R. y L. Vázquez G. 2003. **Variabilidad inducida en *Tigridia pavonia* (L. f.) D.C. var. Sandra por irradiación de bulbos con rayos gamma de ^{60}Co .** *Revista Chapingo Serie Horticultura* 9(2): 235-241.
- Estrada-Basaldúa J. A., M. E. Pedraza-Santos, E. De la Cruz-Torres, A. Martínez-Palacios, C. Sáenz-Romero y J. L. Morales-García. 2011. **Efecto de rayos gamma ^{60}Co en nardo (*Polianthes tuberosa* L.).** *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3:445-458.
- FAO. 2011. **Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura. Segundo Plan de Acción Mundial para los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura.** FAO, Roma, Italia. 104 p.
- Hernández-Muñoz, S., M. E. Pedraza-Santos, P. A. López, E. De la Cruz-Torres, S. P. Fernández-Pavía, A. Martínez-Palacios, y M. Martínez-Trujillo. 2017. **Determinación de la DL_{50} y GR_{50} con rayos gamma (^{60}Co) en protocormos de *Laelia autumnalis* in vitro.** *Agrociencia*. 51(5):507-524.
- International Atomic Energy Agency (IAEA) (2017). Consultado 19-06-2017 en <https://mvd.iaea.org/#!/Search>

- Khalifa N. S. 2011. *Investigate the effect of nd-yag laser beam on soybean (Glycine max) leaves at the protein level. International Journal of Biology* 3(2):135-144.
- Mera O. L. M. y Bye B. R. 2006. **Dhalia una belleza originaria de México.** *Revista Digital Universitaria* 7(11):2-11.
- Pavan K., D., A. Chaturvedi, M. Sreedhar, M. Aparna, P. Venu-Babu and R. K. Singhal. 2013. **Gamma radiosensitivity study on rice (Oryza sativa L.). Asian Journal of Plant Science and Research** 3: 54-68.
- Villavicencio G., E. E., Arredondo, G. A., Carranza P. M. A., Mares A. O., Comparan S. S., y González C. A. 2010. **Cactáceas Ornamentales del Desierto Chihuahuense que se Distribuyen en Coahuila, San Luis Potosí y Nuevo León, México.** Campo Experimental Saltillo. CIRNE-INIFAP. Saltillo, Coah. México. 345 p.
- Wi, S. G., B. Y. Chung, J. S. Kim, J. H. Kim, M. H. Baek, J. W. Lee and Y. S. Kim. 2007. **Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants.** *Micron* 38: 553-564.



ESTIMULACIÓN DE LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO
in vitro DE *Laelia autumnalis* CON RAYOS GAMMA

GAMMA RAY STIMULATION OF GERMINATION AND DEVELOPMENT
in vitro OF *Laelia autumnalis*

Selene Hernández-Muñoz¹, Martha E. Pedraza-Santos^{1*}, Pedro A. López², Eulogio De La Cruz-Torres³, Alejandro Martínez-Palacios⁴, Sylvia P. Fernández-Pavía⁴ y Ana T. Chávez-Bárceñas¹

¹Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez". Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Paseo de la Revolución esquina con Berlín. 60180, Col. Emiliano Zapata, Uruapan, Michoacán. Teléfono: 014525236474. ²Campus Puebla, Colegio de Postgraduados. Boulevard Forjadores de Puebla Núm. 205. 72760, Santiago Momoxpan, San Pedro Cholula, Puebla. ³Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. Ocoyoacac, Estado de México, México. ⁴Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, UMSNH. km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro. 58880, Tarímbaro, Mich.

*Autor para correspondencia (marelpesa@yahoo.com.mx)

RESUMEN

La germinación natural de las semillas de la orquídea *L. autumnalis* es baja, porque requiere condiciones específicas del árbol hospedero y factores ambientales favorables. La germinación asimbiótica in vitro es un método de propagación eficiente; sin embargo, el desarrollo de las plántulas requiere de uno a dos años. El objetivo fue evaluar el efecto de la radiación gamma ⁶⁰Co para estimular la germinación de semillas y el desarrollo in vitro de plántulas de *L. autumnalis*. Se irradiaron 22 frutos a diferentes dosis (3 a 30 Gy, con intervalos de 3 Gy), además de un tratamiento sin irradiar utilizado como testigo. Las semillas se cultivaron en medio Murashige y Skoog sin fitohormonas. El diseño experimental fue completamente al azar con 16 a 32 repeticiones; la unidad experimental fue un frasco con 20 mg de semillas. A los cinco días y posteriormente cada 10 días se cuantificó el número de semillas en las etapas de imbibición, formación de protocormos fotosintéticos, protocormos en diferenciación, desarrollo de promeristemos, hojas y plántulas. Se realizó un análisis de varianza y prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$). Las semillas irradiadas entre 3 y 15 Gy formaron 61 % más protocormos fotosintéticos que las semillas sin tratar. Las semillas irradiadas con 3, 15 y 18 Gy formaron 73 % más promeristemos. Todos los protocormos tratados con 3 Gy formaron hojas 60 días después de la siembra (dds); en contraste, sólo 12.5 % de las semillas no tratadas formaron hojas. El 66.5 % de las semillas tratadas con 15 Gy desarrollaron plántulas a los 80 dds. Se confirmó el efecto radioestimulante de la radiación gamma a dosis bajas; con 3 Gy se formaron promeristemos, hojas y plántulas completas 20, 20 y 10 días, respectivamente, antes que en el tratamiento control. La radiación a dosis superiores fue negativa al retrasar la germinación y el desarrollo de plántulas.

Palabras clave: *Laelia autumnalis*, cultivo in vitro, germinación asimbiótica, radiación gamma, radioestimulación.

SUMMARY

Natural seed germination of *L. autumnalis* orchid is low because it requires specific conditions of the host tree and favorable environmental factors. In vitro asymbiotic germination is an efficient propagation method; however, seedling development requires one to two years. The aim of this research was to evaluate the effect of ⁶⁰Co gamma radiation to stimulate in vitro germination and seedling development of *L. autumnalis*. Twenty-two fruits were irradiated at different doses (3 to 30 Gy, with intervals of 3 Gy), in addition to a non-irradiated treatment used as control. Seeds were cultured in Murashige

and Skoog medium without phytohormones. The experimental design was completely randomized with 16 to 32 replications; the experimental unit was a flask with 20 mg of seeds. At five days and then every 10 days the number of seeds in the stages of imbibition, photosynthetic protocorms formation, protocorms in differentiation, development of promeristems, leaves and seedlings was quantified. Analysis of variance and Tukey range test ($\alpha = 0.05$) were performed. Seeds irradiated between 3 and 15 Gy formed 61 % more photosynthetic protocorms than untreated seeds. Seeds irradiated with 3, 15 and 18 Gy formed 73 % more promeristems. All protocorms treated with 3 Gy formed leaves 60 days after sowing (das); in contrast, only 12.5 % of untreated seeds formed leaves. About 66.5 % of the seeds treated with 15 Gy developed seedlings at 80 das. The radiostimulating effect of gamma radiation was confirmed at low doses; with 3 Gy promeristems, leaves and complete seedlings were formed 20, 20 and 10 days, respectively, earlier than the control treatment. Radiation at higher doses was negative by delaying germination and seedling development.

Index words: *Laelia autumnalis*, in vitro culture, asymbiotic germination, gamma radiation, radio stimulation.

INTRODUCCIÓN

Las orquídeas (*Laelia autumnalis*) son plantas de difícil reproducción natural porque sus semillas diminutas tienen escasa o nula reserva de nutrientes y requieren de la simbiosis con hongos micorrizógenos para su germinación, los cuales no siempre están presentes debido a la perturbación de su hábitat. Además, no todas las semillas de una cápsula se forman por completo o son fértiles (Verma et al., 2014). En muchos casos el embrión es pequeño con relación a la testa, por lo que hasta 96 % del volumen de la semilla puede estar ocupado por aire, lo que dificulta que la humedad llegue al embrión (Arditti, 2008). En la germinación de algunas especies de orquídeas influye la concentración de ácido abscísico (ABA) presente en la semilla, de tal forma que existe una correlación negativa entre la concentración de ABA y el porcentaje de germinación (Lee et al., 2007); sumado a estas características, las semillas

Recibido: 13 de Octubre de 2016

Aceptado: 11 de Mayo de 2017

DETERMINACIÓN DE LA DL₅₀ Y GR₅₀ CON RAYOS GAMMA (⁶⁰Co) EN PROTOCORMOS DE *Laelia autumnalis in vitro*

DL₅₀ AND GR₅₀ DETERMINATION WITH GAMMA RAYS (⁶⁰CO) ON *in vitro* *Laelia autumnalis* PROTOCORMS

Selene Hernández-Muñoz¹, M. Elena Pedraza-Santos^{1*}, P. Antonio López², Eulogio De La Cruz-Torres³, S. Patricia Fernández-Pavía¹, Alejandro Martínez-Palacios¹, Miguel Martínez-Trujillo¹

¹Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Paseo de la Revolución esquina con Berlín, Colonia Emiliano Zapata, 60180. Uruapan, Michoacán. (selene451a@hotmail.com), (marelpesa@yahoo.com.mx), (fernandezpavia@hotmail.com), (apalacios56@gmail.com), (codigogenetico@gmail.com). ²Colegio de Postgraduados Campus Puebla. Boulevard Forjadores de Puebla Núm. 205, Santiago Momoxpan, 72760. Municipio de San Pedro Cholula. (palopez@colpos.mx). ³Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. Carretera México-Toluca s/n. La Marquesa, 52750. Ocoyoacac, México. (eulogio.delacruz@inin.gob.mx).

RESUMEN

Laelia autumnalis es una orquídea con valor ornamental alto en México, pero su comercialización se restringe porque las variedades con calidad comercial no existen. La mutagénesis con radiación es un método efectivo para generar variedades y depende de la radiosensibilidad de los tejidos. El objetivo del estudio fue determinar las dosis letal y reductiva media a los rayos gamma en protocormos de *L. autumnalis* tratados con 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 Gy. El diseño experimental fue completamente al azar, con tres repeticiones y 500 a 700 protocormos como unidad experimental. A los 45 d después de la irradiación (ddi) se cuantificaron los porcentajes de supervivencia, protocormos fotosintéticos, protocormos con promeristemas, con hojas, y materia fresca de protocormos. A los 214 ddi, en 15 plántulas por tratamiento, se evaluó el número de hojas y raíces, longitud de plántulas, pseudobulbos y raíces, anchura de hojas y pseudobulbos, materia fresca y biomasa de plántula. Los datos se analizaron con ANDEVA, correlación de Pearson, prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), y regresión lineal. La radiación con 5 a 20 Gy no afectó la supervivencia de los protocormos, dosis de 20 a 30 Gy estimularon la presencia de clorofila. La longitud de plántulas se aumentó 32 % con 5 Gy. A partir de 40 Gy se redujo la materia fresca (44 %) y anchura de hojas (25 %). La correlación entre los niveles de radiación y la supervivencia de protocormos (-0.91), la formación de hojas (-0.90),

ABSTRACT

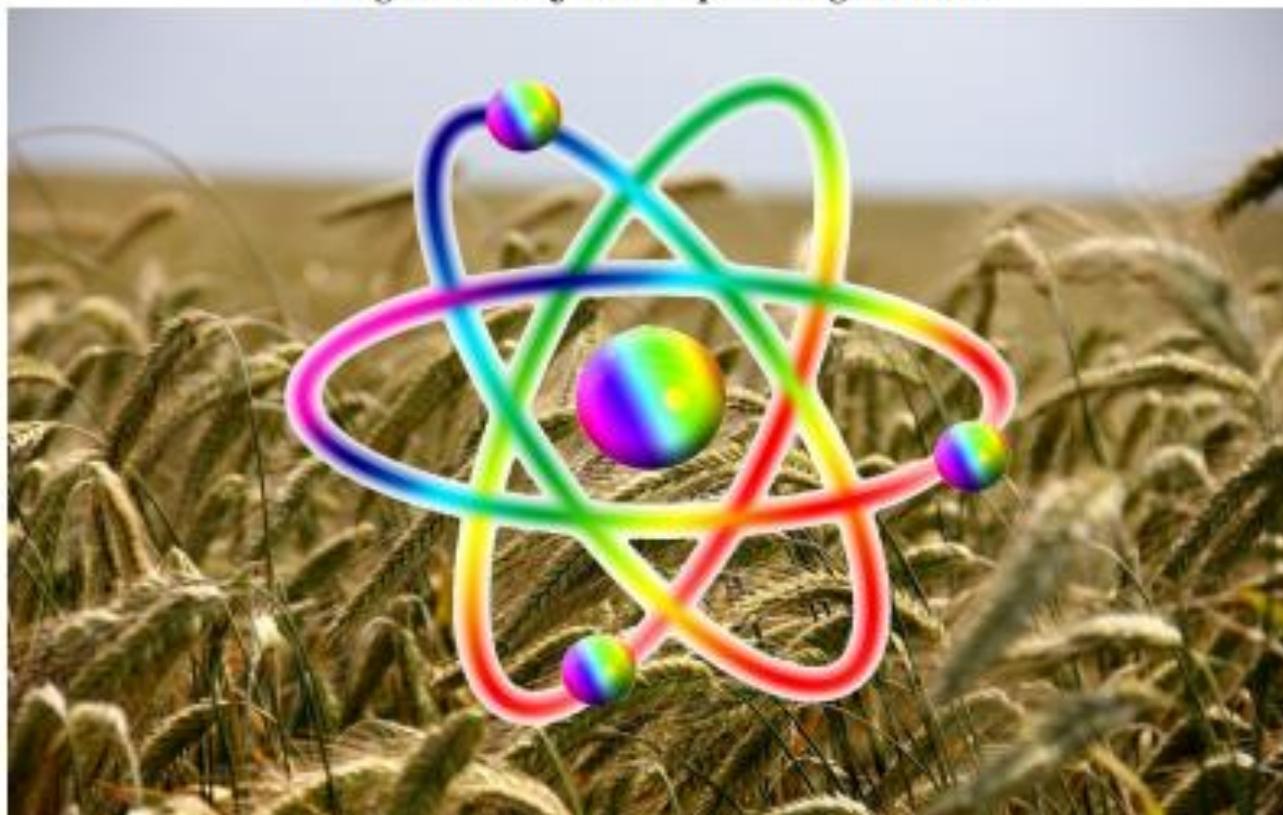
Laelia autumnalis is an orchid with high ornamental value in Mexico. Yet, their marketing is restricted because no commercial quality varieties exist. Mutagenesis radiation is an effective method for generating varieties. These depend on the radiosensitivity of the radiated tissues. The aim of the study was to determine the lethal and mean reductive dose to gamma rays in *L. autumnalis* protocorms treated with 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 and 50 Gy. The experimental design was completely random, with three repetitions and 500 to 700 protocorms as the experimental unit. Forty five days after irradiation (DAR) survival rates photosynthetic protocorms, protocorms with pro-meristems and leaves, and protocorm fresh matter were quantified. At 214 DAR we evaluated the number of leaves and roots, root length, leaf and pseudo-bulbs, width and length, and, fresh biomass and seedling biomass we evaluated in 15 seedlings per treatment. The data were analyzed with ANOVA, Pearson correlation, Tukey test ($p \leq 0.05$) and linear regression. Radiation with 5 to 20 Gy did not affect protocorms survival, doses between 20 and 30 Gy stimulated the chlorophyll presence. The length of the seedlings from the 5 Gy treatment increased 32 %. From 40 Gy fresh biomass (44 %) and leaf width (25 %) decreased. The correlation between radiation levels and protocorms survival (-0.91), leaf formation (-0.90), weight of fresh matter of protocorms (-0.69) seedling (-0.56) and seedling length (-0.57) were highly significant. The LD₅₀ for protocorm survival and the mean reductive dose for leaf formation were 53 and 28 Gy, each. The radiation dose to induce variability in *Laelia autumnalis* protocorm is between 28 and 53 Gy.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: marzo, 2016. Aprobado: mayo, 2016.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 51: 507-524. 2017.

Energía nuclear ¿benéfica para la agricultura?



Selene Hernández Muñoz y Martha Elena Pedraza Santos

Todos hemos escuchado sobre el peligro de las armas nucleares, debido a los efectos devastadores de las bombas atómicas lanzadas en Hiroshima y Nagasaki en 1945. Por esto, después de la segunda guerra mundial, se han creado tratados con el propósito de evitar los ensayos nucleares con fines militares y se ha fomentado el uso de la energía nuclear en beneficio de la humanidad.

¿Qué es energía nuclear?

La energía nuclear es la energía contenida en el núcleo de un átomo y permite que los protones y neutrones se mantengan unidos, el aprovechamiento de esta energía se puede realizar a partir del núcleo de un átomo (fisión nuclear) o al fusionar los núcleos de dos átomos (fusión nuclear), ambas reacciones generan pérdida de masa, que se convierte en energía calorífica y de radiación.

La radiación es una forma de energía igual que el calor y la luz emitidos por el sol, que se transmite a través de un material o del espacio y tiene muchas aplicaciones que pueden ser utilizadas con fines pacíficos. Por ejemplo, en la **medicina** se utilizan radiofármacos y radioisótopos para detectar y tratar enfermedades, la radiación gamma se aplica para diagnosticar y tratar el cáncer o esterilizar productos médicos y quirúrgicos (Figura 1).