

## EFFECTO DE RAYOS GAMMA $^{60}\text{Co}$ EN NARDO (*Polianthes tuberosa* L.)\*

## EFFECT OF $^{60}\text{Co}$ GAMMA RAYS IN TUBEROSE (*Polianthes tuberosa* L.)

Jorge Adán Estrada-Basaldúa<sup>1§</sup>, Martha Elena Pedraza-Santos<sup>1</sup>, Eulogio de la Cruz-Torres<sup>2</sup>, Alejandro Martínez-Palacios<sup>3</sup>, Cuauhtémoc Sáenz-Romero<sup>3</sup> y José Luciano Morales-García<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Agrobiología Presidente Juárez. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Paseo Lázaro Cárdenas esq. con Berlín. Uruapan, Michoacán, México. C. P. 60090. Tel. 01 452 5236474. (marelpesa@yahoo.com.mx), (jluciano@prodigy.net.mx). <sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. Carretera México-Toluca s/n. La Marquesa, Ocoyoacac, México. C. P. 52750. Tel. 01 55 53297200. (eulogio.delacruz@inin.gob.mx). <sup>3</sup>Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Carretera Morelia-Zinapécuaro, km 9.5. Tarímbaro, Michoacán, México. C. P. 58880. Tel. 01 443 3340475. Ext. 119. (aplalacios56@gmail.com), (csaenz@umich.mx). <sup>§</sup>Autor para correspondencia: joradesb@gmail.com.

### RESUMEN

Las plantas que se reproducen asexualmente como el nardo (*Polianthes tuberosa* L.), presentan poca variabilidad genética, ésta puede ser inducida por la técnica de la mutagénesis. Los objetivos del presente trabajo de investigación son: inducir variabilidad mediante el uso de radiación gamma  $^{60}\text{Co}$  y establecer la curva de radiosensibilidad en tubérculos y plantas *in vitro* de nardo. En el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), se irradiaron tubérculos de nardo con siete dosis de radiación gamma  $^{60}\text{Co}$  (0 a 30 Gy), con intervalos de 5 Gy entre tratamientos. De los tubérculos irradiados (con 2 a 21 bulbos laterales), se extrajeron los bulbos sin daños mecánicos y se establecieron *in vitro* en un medio de cultivo Murashige y Skoog (MS), con 1 mg L<sup>-1</sup> de benciladenina (BA) y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalenacético (ANA), los bulbos restantes se sembraron en una mezcla de sustrato (suelo, tierra de hojas y tezontle en una proporción de 1:1:1). Los nardos irradiados con altas dosis, el desarrollo de las plantas se vio disminuido; presentando una mayor variación en el largo y ancho de las hojas; comparadas con las plantas irradiadas, además se presentaron hojas deformes, brotes arrosados, y estos se resecaban repentinamente. Las plantas procedentes de brotes aclimatados de nardo presentaron una LD<sub>50</sub> (9.09

### ABSTRACT

The plants that are asexually reproduced like the tuberose (*Polianthes tuberosa* L.), have little genetic variability; this can be induced by the mutagenesis technique. The objectives of this paper are: to induce variability by using  $^{60}\text{Co}$  gamma radiation and, to establish the radiosensitivity curve in tubers and *in vitro* plants. At the National Institute for Nuclear Research (ININ by its Spanish acronym), tuberose's tubers were irradiated with seven doses of  $^{60}\text{Co}$  gamma radiation (0 to 30 Gy) with 5 Gy intervals between treatments. Of irradiated tubers (with 2 to 21 side bulbs), the bulbs were extracted without mechanical damage and established *in vitro* in a Murashige and Skoog (MS) culture medium with 1 mg L<sup>-1</sup> of benzyladenine (BA) and 0.5 mg L<sup>-1</sup> of naphthaleneacetic acid (NAA), the remaining bulbs were planted in a substrate mixture (soil, leaf mold and volcanic rock at a ratio of 1:1:1). In the tuberose irradiated with high doses, the plant growth decreased, showing a greater variation in the length and width of the leaves; compared to the irradiated plants, deformed leaves also appeared, rosette-shaped buds, these were suddenly desiccated. The plants from acclimatized tuberose's buds had an LD<sub>50</sub> (9.09 Gy), lower than tubers established *in vivo* (LD<sub>50</sub> of 25.91 Gy), where the dose of 30 Gy was lethal to all plants after five months of cultivation.

\* Recibido: febrero de 2011  
Aceptado: septiembre de 2011

Gy), menor a la de los tubérculos establecidos *in vivo* (LD<sub>50</sub> de 25.91 Gy), en donde la dosis de 30 Gy fue letal para todas las plantas después de cinco meses de cultivo.

**Palabras clave:** *Polianthes tuberosa*, cultivo *in vitro*, radiosensibilidad, variabilidad genética.

## INTRODUCCIÓN

La mutagénesis es una herramienta importante en el mejoramiento genético de los cultivos, ampliamente utilizada para generar variación genética y nuevas variedades de las plantas cultivadas, además de que está libre de las restricciones y regulaciones impuestas a los organismos genéticamente modificados (Waugh *et al.*, 2006; Shu y Lagoda, 2007; Parry *et al.*, 2009). Hasta 2007 aproximadamente 2 300 variedades se desarrollaron a partir de mutagénesis, estas fueron liberadas 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).

Las mutaciones pueden ser inducidas por mutágenos físicos y químicos, que se pueden aplicar a todas las especies de plantas y animales. Los mutágenos físicos consisten en radiaciones no-ionizantes (rayos UV) o ionizantes (rayos X y gamma, alfa, beta y neutrones rápidos y lentos), mientras que algunos de los mutágenos químicos más ampliamente utilizados en las plantas, incluyen etilmetano sulfonato (EMS), metilmetano sulfonato (MMS), fluoruro de hidrógeno (HF), azida de sodio, N-metil-N-nitrosourea (MNU) e hidroxilamina (Parry *et al.*, 2009).

El uso de la radiación ionizante como los rayos X, rayos gamma y neutrones, así como los mutágenos químicos para inducir variación está bien establecido (Ahloowalia y Maluszynski, 2001), debido a la gran cantidad de trabajos en el área de la mutagénesis convencional y en varios cultivos como en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Matsukura *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2007), oyamel [*Abies religiosa* (Kunth) Schltd. et Cham.] (Iglesias-Andreu *et al.*, 2010), chícharo de vaca [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] (Kumar y Verma, 2011), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Kazama *et al.*, 2008), trigo sarraceno perene (*Fagopyrum dibotrys* Hara) (Jia y Li, 2008), maíz (*Zea mays* L.) (Carrera y Cervantes, 2007), arroz (*Oryza sativa*

**Key words:** *Polianthes tuberosa*, genetic variability, *in vitro* cultivation, radiosensitivity.

## INTRODUCTION

Mutagenesis is an important tool in genetic improvement of crops, it's widely used to generate genetic variation and new varieties of crops, plus it is free of restrictions and regulations imposed on genetically modified organisms (Waugh *et al.*, 2006; Shu and Lagoda, 2007; Parry *et al.*, 2009). Until 2007, about 2 300 varieties were developed from mutagenesis, they were released and officially registered in the database of mutant varieties of the Food and Agriculture Organization-International Atomic Energy Agency (FAO-IAEA) (Toker *et al.*, 2007).

Mutations may be induced by physical and chemical mutagens, which can be applied to all species of plants and animals. Physical mutagens are non-ionizing radiation (UV) or ionizing radiation (X rays and gamma, alpha, beta and fast and slow neutrons), whereas some of the most widely used chemical mutagens in the plants are: ethylmethane sulfonate (EMS) methylmethane sulfonate (MMS), hydrogen fluoride (HF), sodium azide, N-methyl-N-nitrosourea (MNU) and hydroxylamine (Parry *et al.*, 2009).

The use of ionizing radiation such as X rays, gamma rays and neutrons, as well as chemical mutagens to induce variation is well established (Ahloowalia and Maluszynski, 2001), due to the large amount of papers about the conventional mutagenesis in several crops such as tomato (*Solanum lycopersicum* L.) (Matsukura *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2007), sacred fir [*Abies religiosa* (Kunth) Schltd. et Cham.] (Iglesias-Andreu *et al.*, 2010), cowpeas [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] (Kumar and Verma, 2011), snuff (*Nicotiana tabacum* L.) (Kazama *et al.*, 2008), perennial buckwheat (*Fagopyrum dibotrys* Hara) (Jia and Li, 2008), maize (*Zea mays* L.) (Carrera and Cervantes, 2007), rice (*Oryza sativa* L.) (Fu *et al.*, 2008; Yamaguchi *et al.*, 2009; Babaei *et al.*, 2010) and black cumin (*Nigella sativa* L.) (Kumar and Gupta, 2007).

The mutation effect in ornamentals it's quite visible so that, the selection for changes in flower color, shape and size it's simple but these changes do not always show innovations with value (Maluszynski *et al.*, 1995). In vegetative propagated plants, reproductive organs are

L.) (Fu *et al.*, 2008; Yamaguchi *et al.*, 2009; Babaei *et al.*, 2010) y comino negro (*Nigella sativa* L.) (Kumar y Gupta, 2007).

El efecto de la mutación en plantas ornamentales es muy visible, por lo que la selección para cambios en el color de la flor, forma y tamaño es fácil; sin embargo, estos cambios no siempre presentan novedades con valor (Maluszynski *et al.*, 1995). En las plantas de propagación vegetativa se utilizan los órganos de multiplicación como yemas, rizomas, bulbos, tubérculos, estacas enraizadas y segmentos de hojas; sin embargo, estos órganos son multicelulares por lo que el desarrollo de sectores mutados o genotípicamente diferentes conocidos como quimeras es complejo y pueden sufrir los efectos tóxicos de los mutágenos químicos, además la aplicación homogénea de estos es difícil, por lo que las radiaciones ionizantes con un gran poder de penetración como los rayos X y gamma, son la opción para el desarrollo de variedades mejoradas a partir de la inducción de mutaciones en las plantas de propagación vegetativa (Prina *et al.*, 2010).

La combinación entre las técnicas de inducción de mutantes y de cultivo *in vitro*, pueden ofrecer muchas ventajas como la separación quimeras, la capacidad de producir grandes poblaciones en poco tiempo y la posibilidad de obtener clones de un sólo brote (Van Harten, 1998). La dosis de radiación es un factor clave para lograr mutaciones en material vegetal. En el caso de las plantas cultivadas *in vitro*, sólo unos miligramos de tejido son irradiados por lo que se requieren dosis bajas (Ahoowalia y Maluszynski, 2001).

Existen varios trabajos en los que se realizó la inducción de mutaciones *in vitro* en plantas, como caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) (García *et al.*, 2001; Suprasana *et al.*, 2008), cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) (Muthusamy *et al.*, 2007), papa (*Solanum tuberosum* L.) (Li *et al.*, 2005), henequén (*Agave fourcroydes*) (González *et al.*, 2007), camote (*Ipomoea batatas* L.) (Luan *et al.*, 2007), crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*) (Yamaguchi *et al.*, 2008; Yamaguchi *et al.*, 2009), violeta africana (*Saintpaulia* sp.) (González *et al.*, 2005), ciclamen (*Cyclamen persicum*) (Kondo *et al.*, 2009; Sugiyama *et al.*, 2008), torenia (*Torenia fournieri* Lind) (Sasaki *et al.*, 2008), lirio sapo [*Tricyrtis hirta* (Thund.) Hook] (Nakano *et al.*, 2010) y petunia (*Petunia hybrida*) (Hase *et al.*, 2010).

El nardo (*Polianthes tuberosa* L.) presenta poca variabilidad genética porque sólo se propaga a través de tubérculos (Shillo, 1992), situación que dificulta su mejoramiento

used such as buds, rhizomes, bulbs, tubers, rooted cuttings and leaf segments; these organs are multicellular and so the development of mutant sectors or genotypically different known as chimeras is complex and can suffer the toxic effects of chemical mutagens, the consistent application of these it's difficult, so that ionizing radiation with great penetrating power as X and gamma rays are the choice for the development of improved varieties from mutation induction in vegetative propagated plants (Prina *et al.*, 2010).

The combination of techniques of mutant induction and *in vitro* culture can provide many benefits as chimeras' separation, the ability to produce large populations in a short period of time and, the possibility to obtain clones from a single bud (Van Harten, 1998). The radiation dose is a key factor in achieving mutations in plant material. In the case of plants grown *in vitro*, only a few milligrams of tissue are irradiated so, low doses are required (Ahoowalia and Maluszynski, 2001).

There are several papers that performed *in vitro* mutation induction in plants, such as sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) (García *et al.*, 2001; Suprasana *et al.*, 2008), peanut (*Arachis hypogaea* L.) (Muthusamy *et al.*, 2007), potato (*Solanum tuberosum* L.) (Li *et al.*, 2005), sisal (*Agave fourcroydes*) (González *et al.*, 2007), sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) (Luan *et al.*, 2007), chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) (Yamaguchi *et al.*, 2008; Yamaguchi *et al.*, 2009), african violet (*Saintpaulia* sp.) (González *et al.*, 2005), cyclamen (*Cyclamen persicum*) (Kondo *et al.*, 2009; Sugiyama *et al.*, 2008), Torenia (*Torenia fournieri* Lind) (Sasaki *et al.*, 2008), toad lily [*Tricyrtis hirta* (Thund.) Hook] (Nakano *et al.*, 2010) and petunia (*Petunia hybrida*) (Hase *et al.*, 2010).

The tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) showed little genetic variation because it is only spread by tubers (Shillo, 1992), hampering its genetic improvement. There are few papers about the effect of gamma radiation on the induction of genetic variation in tuberose and none examines the impact of growing tissues irradiated *in vitro*, which justifies the development of techniques for genetic variability increases of this species, such as mutagenesis caused by exposure of living tissues to gamma radiation or a combination of *in vitro* culture and gamma radiation, which generate changes in the flowers such as color, shape and growth habits (dwarf or trailing) that could be selected in future breeding programs.

genético. Existen pocos trabajos donde se estudie el efecto de las radiaciones gamma en la inducción de variación genética en nardo y en ninguno se estudia el efecto de cultivar tejidos irradiados *in vitro*, por lo que se justifica el desarrollo de técnicas que permitan incrementos en la variabilidad genética de esta especie, como la mutagénesis causada por la exposición de tejidos vivos a radiaciones gamma o la combinación de cultivo *in vitro* y radiaciones gamma, que generen alteraciones en las flores como el color, forma y hábitos de crecimiento (enanos o rastreros) que podrían ser seleccionados en programas de mejoramiento genético.

La presente investigación se realizó con los siguientes objetivos: 1) inducir variabilidad mediante el uso de radiación gamma  $^{60}\text{Co}$  en tubérculos y tejidos cultivados *in vitro*; y 2) establecer la curva de radiosensibilidad en tubérculos y plantas *in vitro* de nardo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal que se utilizó en esta investigación, son tubérculos de nardo (primera generación) de San Andrés, Municipio de Zumpahuacán, Estado de México. El experimento se realizó de julio de 2009 a julio de 2010, durante los ciclos otoño-invierno y primavera-verano. Los tubérculos con 2 a 21 bulbos pequeños (diámetro de 0.7 a 3 cm y longitud de 1 a 3.4 cm), se dejaron secar a la sombra esparcidos en una superficie plana dentro de una habitación por 30 días y posteriormente se clasificaron por tamaños de mayor a menor, se colocaron cinco o seis tubérculos en sobres de papel tamaño carta y se identificaron según su tratamiento. El trabajo de investigación se llevó a cabo en el departamento del irradiador gamma del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), con un irradiador Gammacell 220. Se establecieron seis dosis de radiación de  $^{60}\text{Co}$  (5, 10, 15, 20, 25 y 30 Gy) que generaron seis tratamientos y su respectivo testigo sin irradiar.

### Cultivo *in vitro* de bulbos laterales

De los tubérculos irradiados se extrajeron los bulbos laterales sin daños mecánicos visibles para su cultivo *in vitro*, éstos se separaron por tratamientos y posteriormente se lavaron con agua del grifo y detergente, después se sumergieron durante tres horas en una solución compuesta por los fungicidas Tecto 60<sup>®</sup> (Tiabendazol 60% i. a.) (1 g L<sup>-1</sup>), Switch<sup>®</sup>

This research was performed with the following objectives: 1) to induce variability by using  $^{60}\text{Co}$  gamma radiation on tubers and tissue cultured *in vitro*; and 2) to establish the radiosensitivity curve of *in vitro* tubers and plants of tuberose.

## MATERIALS AND METHODS

Tuberose tubers were the plant material used in this paper (first generation) of San Andrés, Zumpahuacán Municipality, Mexico State. The experiment was conducted from July 2009 to July 2010, during the autumn-winter and spring-summer cycles. The tubers with 2 to 21 small bulbs (diameter of 0.7 to 3 cm and length of 1 to 3.4 cm) were dried in the shade and spread over a flat surface for 30 days and, thereafter, they were classified by size from largest to lowest, five or six tubercles were placed on letter-sized envelopes and identified according to their treatment. The research was conducted in the Department of Gamma Irradiator of the National Institute for Nuclear Research (ININ by its Spanish acronym) with a Gammacell 220 irradiator. Six doses of  $^{60}\text{Co}$  radiation were established (5, 10, 15, 20, 25 and 30 Gy) that generated six treatments and their respective non-irradiated control.

### *In vitro* culture of lateral bulbs

From irradiated tubers, lateral bulbs were extracted without visible mechanical damage for *in vitro* cultivation; they were removed by treatments and subsequently washed with tap water and detergent then, immersed for three hours in a solution composed of fungicides Tecto 60<sup>®</sup> (Thiabendazole 60% a. i.) (1 g L<sup>-1</sup>), Switch<sup>®</sup> (Cyprodinil Fludioxonil 37.5 and 25% a. i.) (1 g L<sup>-1</sup>) and Cercobin M<sup>®</sup> (70% Methyl Thiophanate a. i.) (2 g L<sup>-1</sup>). Disinfection was performed with a solution of commercial sodium hypochlorite at 70% v/v (6% active chlorine) for 20 min.

In a laminar flow hood, chlorine solution was removed and explants were rinsed four to five times with sterile water. Three bulbs were placed in flasks with a volume of 100 mL, adding 15 mL of liquid culture medium containing the Murashige and Skoog mineral salts (1962) (MS) at 100% and supplemented with benzyladenine (BA) (1 mg L<sup>-1</sup>), naphthaleneacetic acid (NAA) (0.2 mg L<sup>-1</sup>) and Switch<sup>®</sup> fungicide (1 g L<sup>-1</sup>). The flasks with the explants were

(Cyprodinil 37.5 y Fludioxonil 25% i. a.) ( $1\text{ g L}^{-1}$ ) y Cercobin M<sup>®</sup> (Tiofanato metílico 70% i. a.) ( $2\text{ g L}^{-1}$ ). La desinfección se efectuó con una solución de hipoclorito de sodio comercial a 70% v/v (6% de cloro activo) durante 20 min.

En una campana de flujo laminar se retiró la solución con cloro y se enjuagaron los explantes de cuatro a cinco veces con agua estéril. Se colocaron tres bulbos en frascos con un volumen de 100 mL, adicionándole 15 mL de medio de cultivo líquido que contenía las sales minerales de Murashige y Skoog (1962) (MS) a 100% y suplementados con benciladenina (BA) ( $1\text{ mg L}^{-1}$ ), ácido naftalenacético (ANA) ( $0.2\text{ mg L}^{-1}$ ) y el fungicida Switch<sup>®</sup> ( $1\text{ g L}^{-1}$ ). Los frascos con los explantes se incubaron con un fotoperiodo de 16:8 (luz:oscuridad) blanca fría fluorescente de 75 W y una radiación fotosintéticamente activa de  $45\text{ }\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Los bulbos se distribuyeron en un diseño experimental completamente al azar con 27 repeticiones por tratamiento. A los siete días y cuando los explantes estaban incubándose en medio con fungicida, se midieron las siguientes variables número de explantes con brotes y porcentaje de contaminación. Después de subcultivarlos a un medio sin fungicida y se midió la altura de los brotes; los brotes se aclimataron transfiriéndolos a macetas de 113.4 g con turba (Peat moss<sup>®</sup>) como sustrato y se colocaron en contenedores de plástico herméticos dentro de un invernadero por 30 días, después se quitó la tapa.

Los brotes de nardo que sobrevivieron a la contaminación y aclimatación, se distribuyeron en un diseño estadístico de bloques al azar con 15 bloques y una repetición por bloque; después se trasplantaron a vasos de poliestireno expandido (unicel) con 226.8 g de un sustrato conformado por suelo (extraído de tierras de cultivo) y turba (Peat moss<sup>®</sup>) en proporción 1:1. Un mes después se trasplantaron nuevamente a recipientes con capacidad de un litro y utilizando suelo como sustrato. Los brotes de nardo aclimatados recibieron dos riegos por semana con solución nutritiva Steiner al 75% (Steiner 1984), durante los dos primeros meses después de ser aclimatados y cuatro veces se fertilizaron con 2-3 g de fórmula especial jardín 12-24-12<sup>®</sup> una vez al mes. A los cuatro meses después de la aclimatación de los brotes de nardo, se tomaron los datos de las variables largo y ancho de hojas. Un mes después se contó el número de plantas aclimatadas supervivientes.

incubated with a photoperiod of 16:8 (light:dark) cool white fluorescent of 75 W and a photosynthetically active radiation of  $45\text{ }\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

The bulbs were distributed in a completely randomized design with 27 replicates per treatment. After seven days and when the explants were incubated in a fungicide medium, the following variables were measured: the number of explants with buds and contamination percentage. After sub-cultivated them in a medium without fungicide, bud's height was measured, the shoots were acclimated by transferring them to pots with peat 113.4 g (Peat moss<sup>®</sup>) as a substrate and placed in sealed plastic containers in a greenhouse for 30 days, then the lid was removed.

The tuberose's buds that survived the pollution and acclimatization were distributed in a statistical design of random blocks with 15 blocks and a repetition per block; then they were transplanted into expanded polystyrene cups (Styrofoam) with 226.8 g of a substrate consisting of soil (extracted from farmlands) and peat (Peat moss<sup>®</sup>) in a 1:1 ratio. One month later they were transplanted back into containers with one liter capacity, using ground as substrate. The acclimated tuberose's buds received two irrigations per week with Steiner 75% nutrient solution (Steiner 1984), during the first two months after being acclimated, they were fertilized four times with 2-3 g of garden<sup>®</sup> 12-24-12 special formula once a month. Four months after the acclimatization of tuberose's buds, variable data of leaves length and width were recorded. A month later, the number of acclimated survivors' plants was counted.

### **Tubers culture in greenhouses**

The tubers that remained after the explants removal for *in vitro* culture were sown in expanded polystyrene containers (Styrofoam) of 2 L capacity, with substrate composed of soil, leaf mold and volcanic rock in a 1:1:1 ratio, and were distributed in a randomized block design with five blocks and one replicate per block. Later information about beginning and end of tuber sprouting and bulbs percentage of sprouted tubers per radiation dose was recorded. Two months later, when budding finished, variables of number of shoots per pot, number of leaves per shoot, length and width of leaves were measured. Four months after planting the data of length and width of the leaves was taken again, a month later the number of surviving plants was counted.

## Cultivo de tubérculos en invernadero

Los tubérculos que quedaron después de la extracción de explantes para cultivar *in vitro*, se sembraron en recipientes de poliestireno expandido (unicel) de 2 L de capacidad con sustrato conformado por suelo, tierra de hojas y tezontle en una proporción de 1:1:1, y se distribuyeron en un diseño bloques al azar con cinco bloques y una repetición por bloque. Posteriormente se tomaron los datos de inicio y final de la brotación de tubérculos y porcentaje de bulbos que brotaron por tubérculos por dosis de radiación. A los dos meses, cuando terminó la brotación, se midieron las variables número de brotes por maceta, número de hojas por brote, largo y ancho de hojas. A los cuatro meses de la siembra se tomaron nuevamente los datos de las variables largo y ancho de hojas, un mes después se contó el número de plantas supervivientes.

Los tubérculos se fertilizaron con 2 a 3 g del mismo fertilizante, que se utilizó en los brotes de nardo aclimatados; al quinto mes se adicionó de 4 a 5 g de sulfato de magnesio® al fertilizante. Todos los nardos recibieron un ataque severo por araña roja (*Tetranychus urticae* Koch), que se controló con aplicaciones de Supresor® (Naleb 58%) (1.25 ml L<sup>-1</sup>), Talstar 100 CE® (Bifentrina 12.15%) (0.4 ml L<sup>-1</sup>) y Avalanch® (Abamectina 1.8%) (0.25 ml L<sup>-1</sup>), por lo menos una vez cada 15 días, sin repetir el mismo insecticida acaricida dos veces seguidas para evitar aparición de resistencia.

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

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las variables evaluadas en las plántulas *in vitro* derivadas de tubérculos irradiados, presentaron diferencias estadísticas significativas (porcentaje de explantes con brotes  $p=0.00001$ , porcentaje de explantes contaminados  $p=0.0001$  y altura de brotes  $p=0.0001$ ), por lo que se puede

The tubers were fertilized with 2 to 3 g of the same fertilizer that was used in acclimated tuberose shoots; in the fifth month 4 to 5 g of magnesium sulphate® were added to fertilize them. All tuberose showed a severe attack by spider mites (*Tetranychus urticae* Koch), which was controlled with applications of Suppressor® (Naleb 58%) (1.25 ml L<sup>-1</sup>), Talstar 100 CE® (Bifenthrin 12.15%) (0.4 ml L<sup>-1</sup>) and Avalanch® (Abamectin 1.8%) (0.25 ml L<sup>-1</sup>) at least once every 15 days, without repeating the same miticide insecticide twice, in order to avoid resistance.

All the recorded variables were subjected to variance analysis (ANOVA) with PROC GLM procedure and comparison test of Tukey with Tukey's lines procedure by using SAS version 9 (SAS, 2004). With the number of tuberose survivor plants, survival rates were obtained and linear regression tests were made. Besides, the standard error was calculated and variation coefficients with the Distribution command of Analyze menu of the JMP program version 8 (SAS, 2008).

## RESULTS AND DISCUSSION

All variables evaluated of *in vitro* plantlets derived from irradiated tubers, showed statistically significant differences (percentage of explants with shoots  $p=0.00001$ , percentage of contaminated explants  $p=0.0001$  and shoot height  $p=0.0001$ ), so it can be stated that different radiation doses used influenced the budding and seedlings growth. The shoot development began on the third day after *in vitro* seeding and ended on the seventh day. Plants treated with gamma radiation of 5 Gy showed a shoots' growth equal than the control's treatment (100%) and this variable decreased when radiation doses increased (Table 1).

Similar results were reported for *in vitro* regeneration of adventitious shoots, from internodal sections of carnation (*Dianthus gratianopolitanus* Vill.), where the shoot's development was reduced from 1.1 to 0.1 shoots per explant, with increasing doses of gamma radiation from 5 to 30 Gy, with intervals of 5 Gy (Jerzy and Zalewska, 2000) and the regeneration of toad lily seedlings [*Tricyrtis hirta* (Thunb.) Hook] from irradiated callus, where the treatments exposed to 5 and 10 Gy were similar to the un-irradiated treatment and decreased with increasing radiation doses (Nakano *et al.*, 2010). In this paper, explants contamination was higher in the treatment exposed to doses of 5 Gy (85.3%).

afirmar que las diferentes dosis de radiación empleadas influyeron en la brotación de yemas y desarrollo de las plántulas. El desarrollo de brotes inició a los tres días después de la siembra *in vitro* y terminó a los siete días. Las plantas tratadas con la radiación gamma de 5 Gy, presentaron un desarrollo de brotes igual al tratamiento testigo (100%) y esta variable disminuyó conforme se aumentó la dosis de radiación (Cuadro 1).

The seedlings exposed to 5 and 10 Gy showed a higher level (2.63 and 2.66 cm respectively) to the control treatment (1.87 cm), probably due to the stimulating effect of low radiation doses, similar to that observed in plants of *Lactuca sativa* L. (González *et al.*, 2004), this result is similar to that obtained in *in vitro* potato plantlets of the Atlantic variety that developed with a 4 Gy dose at 23.2% more micro tubers than the control's treatment (Li *et al.*, 2005), although it is

**Cuadro 1. Desarrollo de plántulas *in vitro* derivadas de tubérculos de nardo (*Polianthes tuberosa* L.) irradiados con  $^{60}\text{Co}$ .**  
**Table 1. Development of *in vitro* plantlets derived from tuberose's tubers (*Polianthes tuberosa* L.) irradiated with  $^{60}\text{Co}$ .**

| Dosis (Gy) | Explantos con brotes (%) | Explantos contaminados (%) | Altura de brotes (cm) Media $\pm$ ES |
|------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| 0          | 100 a                    | 62 abc                     | 1.87 $\pm$ 0.33 ab                   |
| 5          | 100 a                    | 85.3 a                     | 2.63 $\pm$ 0.29 a                    |
| 10         | 96.3 a                   | 70.3 ab                    | 2.66 $\pm$ 0.23 a                    |
| 15         | 92.7 a                   | 33.3 bc                    | 1.07 $\pm$ 0.21 b                    |
| 20         | 66.7 b                   | 26 c                       | 1.07 $\pm$ 0.23 b                    |
| 25         | 85.3 ab                  | 37 bc                      | 1.77 $\pm$ 0.28 ab                   |
| 30         | 77.7 ab                  | 44.3 bc                    | 1.39 $\pm$ 0.24 b                    |

Valores con diferentes letras en una columna presentan diferencias estadísticas significativas ( $p \leq 0.05$ ); ES= error estándar; n= 189.

Resultados similares fueron reportados para la regeneración *in vitro* de brotes adventicios, a partir de secciones internodales de clavel (*Dianthus gratianopolitanus* Vill.), donde el desarrollo de brotes se redujo de 1.1 a 0.1 brotes por explante, al aumentar las dosis de radiación gamma de 5 a 30 Gy, en intervalos de 5 Gy (Jerzy y Zalewska, 2000) y a la regeneración de plántulas de lirio sapo [*Tricyrtis hirta* (Thunb.) Hook] a partir de callos irradiados, donde los tratamientos expuestos a 5 y 10 Gy, fue similar al tratamiento no irradiado y disminuyó al aumentar las dosis de radiación (Nakano *et al.*, 2010). En el presente estudio la contaminación de explantes fue mayor en el tratamiento expuesto a la dosis de 5 Gy (85.3%).

Las plántulas expuestas a 5 y 10 Gy presentaron una altura superior (2.63 y 2.66 cm respectivamente) al tratamiento testigo (1.87 cm), probablemente por el efecto estimulante de bajas dosis de radiación, similar a lo observado en plantas de (*Lactuca sativa* L.) (González *et al.*, 2004), resultado que es similar al obtenido en plántulas *in vitro* de papa de la variedad Atlantic, que desarrollaron con la dosis de 4 Gy 23.2% más de micro tubérculos que el tratamiento testigo (Li *et al.*, 2005), aunque también es opuesto al obtenido en ápices de henequén (*Agave fourcroides* Lem.), expuestos a dosis de radiación gamma  $^{60}\text{Co}$  de 0 a 50 Gy con intervalos de 10 Gy, ninguno de los tratamientos expuestos a radiación pudo superar al testigo (3.5 brotes por explante) (González *et al.*, 2007).

opposite to that obtained in sisal apices (*Agave fourcroides* Lem.), exposed to  $^{60}\text{Co}$  gamma radiation doses from 0 to 50 Gy with intervals of 10 Gy, none of the treatments exposed to radiation could exceed the control's (3.5 shoots per explant) (González *et al.*, 2007).

However, it is similar to that obtained at *in vitro* shoots of grape varieties (*Vitis vinifera* L.) 3309, Helwani and Cabernet Franc exposed to gamma radiation dose of 7 Gy, they produced a bud length (BL) (5.33, 4.11 and 7.46 cm) and number of leaves (NL) (14.66, 10 and 8.66 respectively) that exceeded the control's treatment (shoots of 5.03, 1.4 and 2.9 cm length and 8.33, 5 and 2.66 leaves, respectively) (Charbaji and Nabulsi, 1999).

In the case of irradiated tubers established *in vivo*, there were only statistically significant differences in the length and width of the obtained shoots' leaves ( $p = 0.0001$  and  $p = 0.0001$ , respectively). As with the seedlings *in vitro*, *in vivo* plants exposed to a gamma radiation dose of 5 Gy, showed a very similar development than the control's treatment and plants development appeared to decrease when increasing the radiation dose (Table 2).

Similar results were observed in black cumin plants (*Nigella sativa* L.), where the height of seed-derived plants decreased from 54.86  $\pm$  0.45 to 36.84  $\pm$  0.29 cm, with the increase

Sin embargo, es similar al obtenido en brotes *in vitro* de las variedades de uva (*Vitis vinifera* L.) 3309, Helwani y Cabernet Franc expuestos a una dosis de radiación gamma de 7 Gy produjeron una longitud de brote (LB) (5.33, 4.11 y 7.46 cm) y número de hojas (NH) (14.66, 10 y 8.66 respectivamente) que superaron a los tratamientos testigo (brotes de 5.03, 1.4 y 2.9 cm de longitud y 8.33, 5 y 2.66 hojas, respectivamente) (Charbaji y Nabulsi, 1999).

En el caso de los tubérculos irradiados que se establecieron *in vivo*, sólo se presentaron diferencias estadísticas significativas en el largo y ancho de las hojas de los brotes obtenidos ( $p= 0.0001$  y  $p= 0.0001$ , respectivamente). Al igual que en las plántulas *in vitro*, las plantas *in vivo* expuestas a una dosis de radiación gamma de 5 Gy, presentaron un desarrollo muy similar al tratamiento testigo y el desarrollo de las plantas pareció disminuir al aumentar las dosis de radiación (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Desarrollo vegetativo de plantas derivadas de tubérculos de nardo (*Polianthes tuberosa* L.) irradiados con  $^{60}\text{Co}$ .**  
**Table 2. Vegetative growth of plants derived from tuberose’s tubers (*Polianthes tuberosa* L.) irradiated with  $^{60}\text{Co}$ .**

| Dosis (Gy) | Brotación (%) | Largo de hojas (cm) Media $\pm$ ES | Ancho de hojas (cm) Media $\pm$ ES |
|------------|---------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 0          | 60 a          | 17.76 $\pm$ 1.32 a                 | 1.27 $\pm$ 0.02 a                  |
| 5          | 100 a         | 19.07 $\pm$ 1.11 a                 | 1.27 $\pm$ 0.02 a                  |
| 10         | 100 a         | 11.56 $\pm$ 0.91 b                 | 1.34 $\pm$ 0.04 a                  |
| 15         | 100 a         | 13.92 $\pm$ 0.9 ab                 | 1.22 $\pm$ 0.04 a                  |
| 20         | 60 a          | 11.56 $\pm$ 0.87 b                 | 1.19 $\pm$ 0.04 a                  |
| 25         | 100 a         | 9.11 $\pm$ 1.08 b                  | 1.13 $\pm$ 0.05 a                  |
| 30         | 80 a          | 3.38 $\pm$ 0.77 c                  | 0.86 $\pm$ 0.07 b                  |

Valores con diferentes letras en una columna, presentan diferencias estadísticas significativas ( $p\leq 0.05$ ); ES= error estándar; n= 35 para brotación; y n= 312 para hojas.

Resultados similares fueron observados en plantas de comino negro (*Nigella sativa* L), donde la altura de las plantas derivadas de semillas disminuyó de 54.86 $\pm$ 0.45 a 36.84 $\pm$ 0.29 cm, con el incremento de la radiación gamma de 0 a 300 Gy en intervalos de 50 Gy (Kumar y Gupta, 2007) y en plántulas de oyamel [*Abies religiosa* (Kunth) Schltd. et Cham.], generadas a partir de semillas expuestas a dosis de radiación gamma de 0 a 20 Gy con intervalos de 5 Gy entre tratamientos, en donde la altura de las plántulas y número de hojas primarias, disminuyó conforme aumentaban las dosis de radiación (Iglesias-Andreu *et al.*, 2010). El desarrollo de brotes de nardo inició a los cinco días de la siembra y terminó a los dos meses.

Las diferencias estadísticas que se encontraron en los tubérculos establecidos *in vivo* después de la brotación, se conservaron después de cuatro meses de cultivo (Cuadro 3). Por otra parte, los brotes que fueron aclimatados también

of gamma radiation from 0 to 300 Gy at intervals of 50 Gy (Kumar and Gupta, 2007) and in fir seedlings [*Abies religiosa* (Kunth) Schltd. et Cham.], generated from seeds exposed to gamma radiation dose of 0 to 20 Gy at intervals of 5 Gy between treatments, where the seedling height and number of primary leaves, decreased with increasing doses of radiation (Iglesias-Andreu *et al.*, 2010). The development of tuberose’s buds began five days after planting and ended after two months.

Statistical differences found in the tubers established *in vivo* after emergence were retained after four months of culture (Table 3). Moreover, the acclimated shoots also showed statistically significant differences ( $p\leq 0.01$ ), after a culture period equal to the tubers’ established *in vivo*. In acclimated outbreaks, the dose that showed the highest variation in the length and width of the leaves’ variables (51.37 and 26.8 CV, respectively) was of 25 Gy (Table 3), similar than in

tubers’ established *in vivo*, the highest variation in leaves length (51.14 CV) was shown at the 25 Gy dose, although, the greatest variation in leaves width (25.56 CV) was shown at the 5 Gy dose.

Similar to this paper results, *in vitro* shoots of pear (*Pyrus communis* L.) irradiated with gamma rays (3.5 Gy) showed variation frequencies of 0.81 and 3.64% in fruit traits for Doyenné d’Hiver and Passe Crassane varieties, compared with non-irradiated plants (Predieri and Zimmerman, 2001). By comparing the variation in the aforementioned variables between the control treatments, it’s shown that acclimated shoots (31.76 and 26.04 CV) show a greatest variation than *in vivo* tubers’ (27.12 and 18.93 CV); maybe because not every shoot developed roots before being acclimated, therefore they did not have a uniform development in the substrate. In an opposite case to the results obtained in this paper, *in*

presentaron diferencias estadísticas significativas ( $p \leq 0.01$ ), después de un periodo de cultivo igual al de los tubérculos establecidos *in vivo*. En los brotes aclimatados, la dosis que presentó una variación más elevada en las variables largo y ancho de hojas (51.37 y 26.80 CV, respectivamente) fue de 25 Gy (Cuadro 3), similarmente en los tubérculos establecidos *in vivo*, la mayor variación en el largo de hojas (51.14 CV) se presentó en la dosis de 25 Gy, aunque la mayor variación en el ancho de hojas (25.56 CV) se presentó en la dosis de 5 Gy.

*vitro* culture reduced the variation in the development of wild plants of *Yucca valida* Brandegees, from 39.46 to 9.11 CV (Arce-Montoya *et al.*, 2006).

In the acclimated shoots, the average values of the studied variables decreased when increasing radiation doses, however; shoots exposed to 30 Gy had leaves with a length and width ( $12.16 \pm 0.63$  and  $1.12 \pm 0.04$  cm) comparable with those obtained with doses of 5 and 10 Gy

**Cuadro 3. Desarrollo vegetativo de plantas derivadas de brotes *in vitro* y tubérculos de nardo (*Polianthes tuberosa* L.) irradiados con  $^{60}\text{Co}$  después de cuatro meses.**

**Table 3. Vegetative growth of plants derived from *in vitro* shoots and tuberose's tubers (*Polianthes tuberosa* L.) irradiated with  $^{60}\text{Co}$  after four months.**

| Dosis (Gy)                                      | Largo de hoja (cm)   |       | Ancho de hoja (cm)  |       |
|-------------------------------------------------|----------------------|-------|---------------------|-------|
|                                                 | Media $\pm$ ES       | CV    | Media $\pm$ ES      | CV    |
| Brotes aclimatados de nardo                     |                      |       |                     |       |
| 0                                               | 15.83 $\pm$ 0.89 a   | 31.76 | 1.39 $\pm$ 0.06 a   | 26.04 |
| 5                                               | 12.44 $\pm$ 0.69 ab  | 42.82 | 1.27 $\pm$ 0.04 ab  | 25.6  |
| 10                                              | 10.22 $\pm$ 0.78 bcd | 38.06 | 1.04 $\pm$ 0.03 bc  | 17.72 |
| 15                                              | 9.13 $\pm$ 0.67 bcd  | 29.36 | 1.07 $\pm$ 0.04 bc  | 15.17 |
| 20                                              | 8.7 $\pm$ 0.55 cd    | 39.34 | 0.93 $\pm$ 0.04 c   | 24.91 |
| 25                                              | 7.77 $\pm$ 1.15 d    | 51.37 | 0.9 $\pm$ 0.07 c    | 26.8  |
| 30                                              | 12.16 $\pm$ 0.63 abc | 33.07 | 1.12 $\pm$ 0.04 bc  | 21.86 |
| Tubérculos de nardo establecidos <i>in vivo</i> |                      |       |                     |       |
| 0                                               | 28.85 $\pm$ 0.94 a   | 27.12 | 1.43 $\pm$ 0.03 abc | 18.93 |
| 5                                               | 26.63 $\pm$ 0.92 a   | 32.24 | 1.48 $\pm$ 0.04 ab  | 25.56 |
| 10                                              | 27.38 $\pm$ 1.04 a   | 31    | 1.56 $\pm$ 0.03 a   | 16.7  |
| 15                                              | 23.54 $\pm$ 0.62 ab  | 28.13 | 1.49 $\pm$ 0.03 ab  | 24.54 |
| 20                                              | 16.84 $\pm$ 0.86 bc  | 38.06 | 1.32 $\pm$ 0.04 abc | 22.09 |
| 25                                              | 12.53 $\pm$ 0.90 cd  | 51.14 | 1.08 $\pm$ 0.03 c   | 21.76 |
| 30                                              | 3.75 $\pm$ 1.25 d    | 47.14 | 1.15 $\pm$ 0.05 bc  | 6.14  |

Valores con diferentes letras en una columna presentan diferencias estadísticas significativas ( $p \leq 0.05$ ); ES= error estándar; CV= coeficiente de variación; n= 224 para hojas de brotes aclimatados; n= 446 para hojas de tubérculo.

En forma similar a los resultados del presente estudio brotes *in vitro* de pera (*Pyrus communis* L.), irradiados con rayos gama (3.5 Gy), presentaron frecuencias de variación de 0.81 y 3.64% en rasgos de la fruta para las variedades Doyenné d'Hiver y Passe Crassane, en comparación con las plantas no irradiadas (Predieri y Zimmerman, 2001). Al comparar la variación en las variables ya mencionadas entre los tratamientos testigo, muestran que los brotes aclimatados (31.76 y 26.04 CV), presentan mayor variación que los tubérculos establecidos *in vivo* (27.12 y 18.93 CV); sin embargo, tal vez se debe que no todos los brotes desarrollaron raíces antes de ser aclimatados, por lo que no presentaron

( $12.44 \pm 0.69$  and  $1.27 \pm 0.04$  and  $10.22 \pm 0.78$  and  $1.04 \pm 0.03$  cm respectively); while in the tubers established *in vivo*, doses of 5, 10 and 15 Gy showed wider leaves ( $1.48 \pm 0.04$ ,  $1.56 \pm 0.03$  and  $1.49 \pm 0.03$  cm) than the control's ( $1.43 \pm 0.03$  cm), this result is similar to that obtained in peanut plants *Arachis hypogaea* L., germinated from somatic embryos developed in irradiated embryogenic callus of Co. 5 y Co. 7 varieties, which showed in doses of 10, 20 and 30 Gy a height in field conditions (37.2, 38.5 and 45.2 cm for Co. 5 and 37.4, 39.4 and 40.4 cm for Co. 7) higher than the control's (35.8 and 36.4 cm) (Muthusamy *et al.*, 2007).

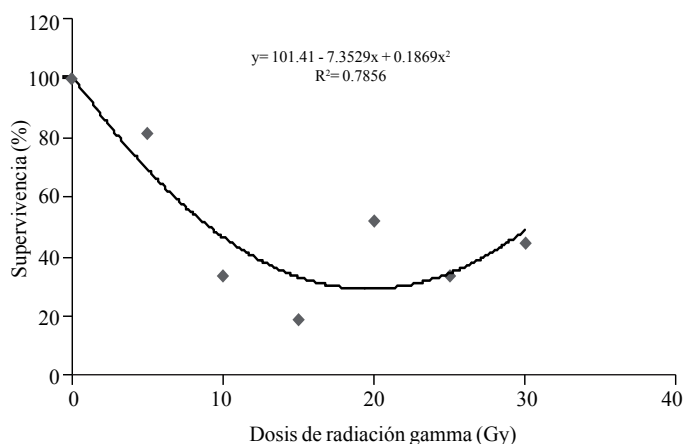
un desarrollo uniforme en el sustrato. En un caso opuesto a los resultados obtenidos en la presente investigación el cultivo *in vitro*, redujo la variación en el desarrollo de plantas silvestres de (*Yucca valida* Brandege) de 39.46 a 9.11 CV (Arce-Montoya *et al.*, 2006).

En los brotes aclimatados los valores promedio de las variables estudiadas, disminuyeron conforme aumentaban las dosis de radiación; sin embargo, los brotes expuestos a 30 Gy, presentaron hojas con un largo y ancho ( $12.16 \pm 0.63$  y  $1.12 \pm 0.04$  cm), comparable con los obtenidos con las dosis de 5 y 10 Gy ( $12.44 \pm 0.69$  y  $1.27 \pm 0.04$ , y  $10.22 \pm 0.78$  y  $1.04 \pm 0.03$  cm respectivamente); mientras que, en los tubérculos establecidos *in vivo* las dosis de 5, 10 y 15 Gy, presentaron hojas más anchas ( $1.48 \pm 0.04$ ,  $1.56 \pm 0.03$  y  $1.49 \pm 0.03$  cm) que el testigo ( $1.43 \pm 0.03$  cm), este resultado es similar al obtenido en plantas de cacahuete *Arachis hypogaea* L., germinadas a partir de embriones somáticos desarrollados en callos embriogénicos irradiados de las variedades Co. 5 y Co. 7, que presentaron en las dosis de 10, 20 y 30 Gy una altura en condiciones de campo (37.2, 38.5 y 45.2 cm para Co. 5 y 37.4, 39.4 y 40.4 cm para Co. 7), superiores a los tratamientos testigo (35.8 y 36.4 cm) (Muthusamy *et al.*, 2007).

Aunque los brotes aclimatados generaron algunas plantas muy vigorosas con la dosis de 30 Gy, éstos presentaron una LD<sub>50</sub> de 9.09 Gy, obtenida con la fórmula de regresión  $y = 101.41 - 7.3529x + 0.1869x^2$  (Figura 1), un resultado similar se presentó en callos irradiados de papa (*Solanum tuberosum* L.) de la variedad Desirée, donde se obtuvo una LD<sub>50</sub> de 12.51 Gy (Veitía *et al.*, 2007). Es necesario tomar en cuenta que otros factores ajenos al efecto de la radiación, como la contaminación *in vitro* y daños mecánicos ocurridos durante la etapa de aclimatación, pueden influir negativamente en la supervivencia de las plántulas y causar una LD<sub>50</sub> menor a la que se obtendría solo con la radiación. Por otra parte, la presencia de plantas vigorosas con la dosis de 30 Gy observadas en esta investigación, es opuesta a los resultados obtenidos en brotes *in vitro* de crisantemo, donde la dosis de 16 Gy fue letal (Yamaguchi *et al.*, 2009).

En el caso de los tubérculos establecidos *in vivo* se obtuvo una LD<sub>50</sub> de 25.91 Gy, con la fórmula de regresión  $y = 93.81 + 3x - 0.181x^2$  (Figura 2), resultado cercano a la dosis que alcanzó la mayor variación en el largo y ancho de las hojas (25 Gy) y es menor a otras plantas como el henequén (*Agave fourcroides* Lem.), donde se presentó una DL<sub>50</sub> de 30 Gy (González *et al.* 2007), o las DL<sub>50</sub> de 28 y 27 Gy calculadas para las variedades de aguacate (*Persea americana* Mill.)

Even though, acclimated shoots generated some very vigorous plants with a dose of 30 Gy, they also showed an LD<sub>50</sub> of 9.09 Gy obtained with the regression formula  $y = 101.41 - 7.3529x + 0.1869x^2$  (Figure 1), a similar result was observed in irradiated potato calluses (*Solanum tuberosum* L.) of Desirée variety, which yielded an LD<sub>50</sub> of 12.51 Gy (Veitía *et al.*, 2007). It is necessary to consider other factors beyond the effect of radiation, such as *in vitro* contamination and mechanical damage occurring during the acclimatization stage may adversely affect the survival of seedlings and may cause an LD<sub>50</sub> lower than that obtained only with radiation. Moreover, the presence of vigorous plants with 30 Gy dose observed in this paper is opposite to the results obtained from *in vitro* shoots of chrysanthemum, where the 16 Gy dose was lethal (Yamaguchi *et al.*, 2009).



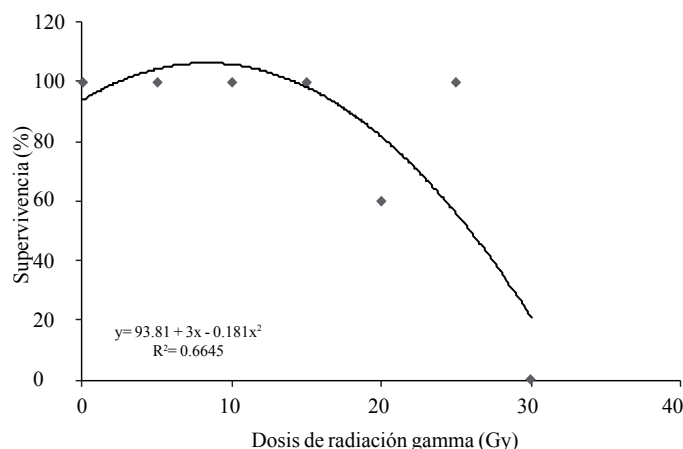
**Figura 1. Efecto de rayos gamma <sup>60</sup>Co en la supervivencia de brotes después de cinco meses de ser aclimatados.**

**Figure 1. Effect of <sup>60</sup>Co gamma rays on the survival of shoots after five months of being acclimated.**

In the case of tubers established *in vivo*, an LD<sub>50</sub> of 25.91 Gy was obtained, with the regression formula  $y = 93.81 + 3x - 0.181x^2$  (Figure 2), a result close to the dose that reached the highest variation in the leaves' length and width (25 Gy) and is lower than other plants such as sisal (*Agave fourcroides* Lem.), where there was a LD<sub>50</sub> of 30 Gy (González *et al.* 2007) or the LD<sub>50</sub> of 28 and 27 Gy calculated for the avocado varieties (*Persea americana* Mill) Duke and Hass (Fuentes *et al.*, 2004), in tubers established *in vivo*, 30 Gy dose was lethal after five months of culture.

From the materials established *in vivo*, the plants exposed at 30 Gy died because their tubers did not develop roots, so these plants survived until its reserves ran out; while acclimated plants exposed to 30 Gy survived because they

Duke y Hass (Fuentes *et al.*, 2004); en los tubérculos establecidos *in vivo* la dosis de 30 Gy fue letal después de cinco meses de cultivo.



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

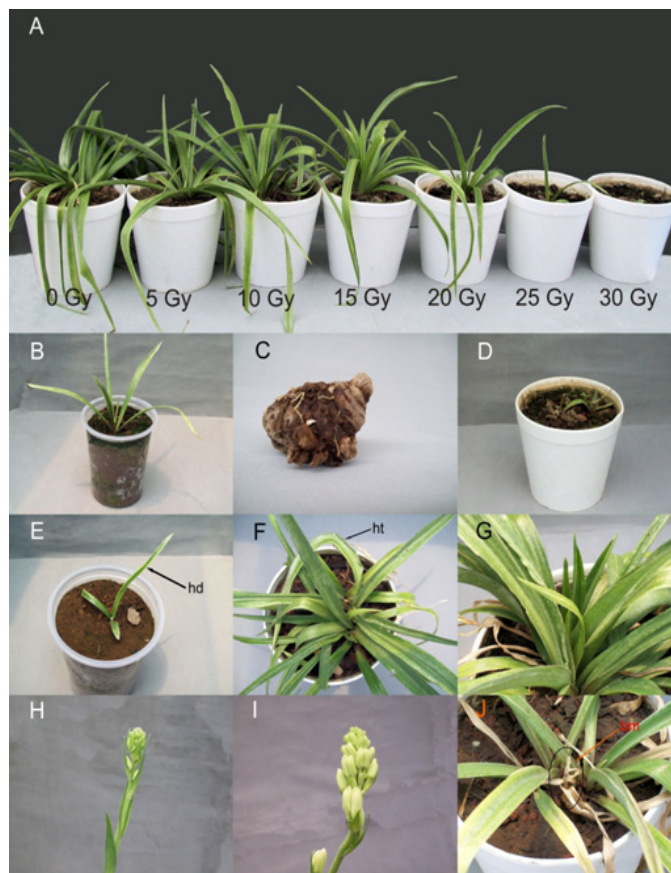
**Figure 2. Effect of  $^{60}\text{Co}$  gamma rays on the survival of tubers set *in vivo* after five months of culture.**

En los materiales establecidos *in vivo*, las plantas expuestas a 30 Gy murieron porque sus tubérculos no desarrollaron raíces; así que estas plantas sobrevivieron hasta que agotaron sus reservas, mientras que las plantas aclimatadas expuestas a 30 Gy sobrevivieron, por que desarrollaron raíces viables como un posible efecto de la exposición de tejidos irradiados a reguladores del crecimiento vegetal (ANA BA), presentes en el medio de cultivo durante la etapa de desarrollo *in vitro*. Por otra parte, también se presentaron deformaciones en las hojas (hojas torcidas o muy delgadas), brotes que surgían muy rosetados y brotes que se secaban repentinamente, a 11 meses de la siembra de los tubérculos establecidos *in vivo*, una planta expuesta a una dosis de 10 Gy empezó a desarrollar una inflorescencia, a tres semanas de este hecho otra planta expuesta a 15 Gy también inició el desarrollo de una inflorescencia.

En la Figura 3 se muestra el efecto de la radiación gamma sobre las plantas de nardo: A= disminución del vigor de plantas de nardo al aumentar la dosis de radiación; B= brote aclimatado expuesto a 30 Gy; C= tubérculo de nardo necrosado de una planta expuesta a 30 Gy; D= planta expuesta a 30 Gy antes de morir, E y F= brote aclimatado plantas *in vivo* con deformaciones en hojas; G= plantas rosetadas, H e I= inflorescencias que se desarrollaron

desarrolló viable raíces como un posible efecto de la exposición de irradiado tejido a reguladores de crecimiento vegetal (ANA BA) presente en el medio de cultivo durante la etapa de *in vitro* desarrollo. Además, también se presentaron hojas deformadas (hojas torcidas o muy delgadas), brotes que surgían muy rosetados y brotes que se secaban repentinamente; 11 meses después de plantar los tubérculos establecidos *in vivo*, una planta expuesta a una dosis de 10 Gy comenzó a desarrollar una inflorescencia, tres semanas después de esto otra planta expuesta a 15 Gy también inició el desarrollo de una inflorescencia.

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



**Figura 3. Efecto de la radiación gamma en plantas de nardo.**  
**Figure 3. Effect of gamma radiation on tuberose plants.**

en una plantas expuestas a 15 y 10 Gy respectivamente; J= planta con un brote muerto repentinamente; ht= hoja torcida; hd= hoja delgada; bm= brote muerto.

De forma similar a las observaciones realizadas en este estudio otras plantas expuestas a radiación gamma, también presentan deformaciones como hojas pálidas, hojas y frutos de color verde amarillento similares a las plantas silvestres, también con frutos de color rosa en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) miniatura var. Micro-Tom expuestas a radiación gamma (300 Gy) (Matsukura *et al.*, 2007), flores con un pétalo extra en comino negro (*Nigella sativa* L.) (Kumar y Gupta, 2007), o alteraciones en la forma y color de los pétalos de ciclamen (*Cyclamen persicum*) (Sugiyama *et al.*, 2008; Kondo *et al.*, 2009), petunia (*Petunia hybrida*) (Hase *et al.*, 2010) y torenia (*Torenia fournieri* Lind.) (Sasaki *et al.*, 2008).

En el presente estudio, las deformaciones observadas en las plantas que se desarrollaron a partir de los tubérculos irradiados, sugieren el desarrollo de quimeras que junto con el aumento en los coeficientes de variación de estas plantas con respecto a las plantas del tratamiento testigo no irradiado, indican que la radiación gamma posiblemente si afectó variación genética en los nardos.

## CONCLUSIONES

Al aumentar la dosis de radiación disminuye el desarrollo de las plantas de nardo, tanto en plantas desarrolladas a partir de brotes aclimatados, como en las desarrolladas a partir de tubérculos establecidos *in vivo*. Las plantas irradiadas presentan mayor variación en el largo y ancho de hojas que las plantas no irradiadas. La LD<sub>50</sub> de las plantas desarrolladas a partir de brotes aclimatados (9.09 Gy), fue menor a la LD<sub>50</sub> de plantas desarrolladas a partir de tubérculos establecidos *in vivo* (25.91 Gy). La dosis de radiación de 30 Gy fue letal para las plantas desarrolladas a partir de tubérculos establecidos *in vivo*.

## LITERATURA CITADA

Ahloowalia, B. S. and Maluszynski, M. 2001. Induced mutations-a new paradigm in plant breeding. *Euphytica*. 118:167-173.

Similar to the observations of this paper, other plants exposed to gamma radiation showed deformations such as pale leaves, yellowish-green leaves and fruits similar to wild plants also, pink fruits in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) thumbnail var. Micro-Tom exposed to gamma radiation (300 Gy) (Matsukura *et al.*, 2007), flowers with extra petals in black cumin (*Nigella sativa* L.) (Kumar and Gupta, 2007) or alterations in shape and color of cyclamen petals (*Cyclamen persicum*) (Sugiyama *et al.*, 2008; Kondo *et al.*, 2009), petunia (*Petunia hybrida*) (Hase *et al.*, 2010) and Torenia (*Torenia fournieri* Lind.) (Sasaki *et al.*, 2008).

In this paper, deformations observed in plants that developed from irradiated tubers suggest the development of chimeras that along with the increase of the variation coefficients of these plants with respect to the control treatment with non-irradiated plants indicated that, the gamma radiation may affect genetic variation of tuberose.

## CONCLUSIONS

Increased radiation doses reduce the development of tuberose plants, both in plants developed from acclimated buds, as in those developed from tubers established *in vivo*. Irradiated plants show a greater variation in the length and width of leaves than non-irradiated plants. The LD<sub>50</sub> of the plants grown from acclimated shoots (9.09 Gy) was lower than the LD<sub>50</sub> of plants grown from tubers established *in vivo* (25.91 Gy). The radiation dose of 30 Gy was lethal for the plants grown from tubers established *in vivo*.

*End of the English version*



- Arce-Montoya, M.; Rodríguez-Áglvarez, M.; Hernández-González, J. A. and Robert, M. L. 2006. Micropropagation and field performance of *Yucca valida*. *Plant Cell Reports*. 25:777-783.
- Babaei, A.; Nematzadeh, G. A.; Avagyan, V. and Hashemi-Petrodi, S. H. 2010. Radio sensitivity studies of morpho-physiological characteristics in some Iranian rice varieties (*Oryza sativa* L.) in M1 generation. *African J. Res.* 5(16):2124-2130.
- Carrera, V. J. A. y Cervantes, S. T. 2007. Comportamiento de cruas de maíz obtenidas por irradiación y selección. *Rev. Fitotec. Mex.* 30(2):173-180.

- Charbaji, T. and Nabulsi, I. 1999. Effect of low doses of gamma irradiation on *in vitro* growth of grapevine. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 57:129-132.
- Fu, H. W.; Li, Y. F. and Shu, Q. Y. 2008. A revisit of mutation induction by gamma rays in rice (*Oryza sativa* L.): implications of microsatellite markers for quality control. Mol. Breed. 22:281-288.
- Fuentes, J. L.; Santiago, L.; Valdés, Y.; Guerra, M.; Ramírez, I. M.; Prieto, E. F.; Rodríguez, N. N. and Velázquez, B. 2004. Mutation induction in zygotic embryos of avocado (*Persea americana* Mill). Biotecnología Aplicada. 21(2):82-84.
- García, R. L.; Orellana, P. P.; García, R. L.; Pérez, P. J. N.; Veitia, R. N.; Bermúdez, C. I.; Clavero, G. J. and Romero, Q. C. 2001. Empleo de la mutagénesis en la mejora al grosor del tallo del somaclón IBP 89-169 de caña de azúcar. Biotecnología Vegetal. 1(2):71-75.
- González, L. M.; Ramírez, R.; Licea, L.; Porra, E. and García, B. 2004. Acción estimulante de las dosis bajas de rayos X en plantas *Lactuca sativa*. Universidad y Ciencia. 20(39):1-6.
- González, M. C.; Fuentes, J. L.; Cortes, S. y Sam, O. 2005. "Delia", nueva variedad de violeta africana (*Saintpaulia* sp.) obtenida a partir del empleo de técnicas biotecnológicas y nucleares. Cultivos Tropicales. 26:67-68.
- González, O. G.; Alemán, G. S.; Garriga, M.; Ortiz, R. and De La Fe, C. 2007. Radiosensitivity to gamma rays ( $^{60}\text{Co}$ ) in shoot tips of henequen. Biotecnología Vegetal. 7(2):115-117.
- Hase, Y.; Okamura, M.; Takeshita, D.; Narumi, I. and Tanaka, A. 2010. Efficient induction of flower-color mutants by ion beam irradiation in petunia seedlings treated with high sucrose concentration. Plant Biotechnol. 27:99-103.
- Iglesias-Andreu, L. G.; Sánchez-Velásquez, L. R.; Tivo-Fernández, Y.; Luna-Rodríguez, M.; Flores-Estévez, N.; Noa-Carranza, J. C.; Ruiz-Bello, C. and Moreno-Martínez, J. L. 2010. Efecto de radiaciones gamma en *Abies religiosa* (Kunth) Schltd. et Cham. Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. 16(1):5-12.
- Jerzy, M. and Zalewska, M. 2000. Effect of X and gamma rays on *in vitro* adventitious bud production of pot carnation (*Dianthus gratianopolitanus* Vill.). Revista Chapingo. Serie Horticultura. 6(1):49-52.
- Jia, C. F. and Li, A. L. 2008. Effect of gamma radiation on mutant induction of *Fogopyrum dibotrys* Hara. Photosynthetica. 46(3):363-369.
- Kazama, Y.; Saito, H.; Miyagai, M.; Takehisa, H.; Ichida, H.; Miyazawa, Y.; Mishiba, K.; Kanaya, T.; Suzuki, K.; Bae, C. H.; Miyoshi, K.; Mii, M. and Abe, T. 2008. Effect of heavy ion-beam irradiation on plant growth and mutation induction in *Nicotiana tabacum*. Plant Biotechnol. 25:105-111.
- Kondo, E.; Nakayama, M.; Kameari, N.; Tanikawa, N.; Morita, Y.; Akita, Y.; Hase, Y.; Tanaka, A. and Ishizaka, H. 2009. Red-purple flower due to delphinidin 3,5-diglucoside, a novel pigment for *Cyclamen* spp., generated by ion-beam irradiation. Plant Biotechnol. 26:565-569.
- Kumar, G. and Gupta, P. 2007. Mutagenic efficiency of lower doses of gamma rays in black cumin (*Nigella sativa* L.). Cytologia. 72(4):435-440.
- Kumar, G. and Verma, S. 2011. Comparative effect of individual and sequential treatment of gamma rays and sodium azide in *Vigna unguiculata*. Chromosome Botany. 6:33-36.
- Li, H. Z.; Zhou, W. J.; Zhang, Z. J.; Gu, H. H.; Takeuchi, Y. and Yoneyama, K. 2005. Effect of  $\gamma$ -radiation on development, yield and quality of microtubers *in vitro* in *Solanum tuberosum* L. Biol. Plant. 49(4):625-628.
- Luan, Y.; Zhang, J.; Gao, X. and An, L. 2007. Mutation induced by ethylmethanesulphonate (EMS), *in vitro* screening for salt tolerance and plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). Plant Cell Tissue Organ Cult. 88:77-81.
- Maluszynski, M.; Ahloowalia, B. S. and Sigurbjörnsson, B. 1995. Application of *in vivo* and *in vitro* mutation techniques for crop improvement. Euphytica. 85:303-315.
- Matsukura, C.; Yamaguchi, I.; Inamura, M.; Ban, Y.; Kobayashi, Y.; Yin, Y.; Saito, T.; Kuwata, C.; Imanishi, S. and Nishimura, S. 2007. Generation of gamma irradiation-induced mutant lines of the miniature tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar 'Micro-Tom'. Plant Biotechnol. 24:39-44.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Muthusamy, A.; Vasanth, K.; Sivasankari, D.; Chandrasekar, B. R. and Jayabalan, N. 2007. Effects of mutagens on somatic embryogenesis and plant regeneration in groundnut. Biol. Plant. 51(3):430-435.

- Nakano, M.; Amano, J.; Watanabe, Y.; Nomizu, T.; Suzuki, M.; Mizunashi, K.; Mori, S.; Kuwayama, S.; Han, D-C.; Saito, H.; Ryuto, H.; Fukunishi, N. and Abe, T. 2010. Morphological variation in *Tricyrtis hirta* plants regenerated from heavy ion beam-irradiated embryogenic calluses. *Plant Biotechnol.* 27:155-160.
- Parry, M. A. J.; Madgwick, P. J.; Bayon, C.; Tearall, K.; Hernández-López, A.; Baudo, M.; Rakszegi, M.; Hamada, W.; Al-Yassin, A.; Ouabbou, H.; Labhili, M. and Phillips, A. L. 2009. Mutation discovery for crop improvement. *J. Expe. Bot.* 60(10):2817-2825.
- Predieri, S. and Zimmerman, R. H. 2001. Pear mutagenesis: *In vitro* treatment with gamma-rays and field selection for productivity and fruit traits. *Euphytica.* 117:217-227.
- Prina, A.; Landau, A.; Pacheco, M. G. y Hopp, E. H. 2010. Mutagénesis, TILLING y EcoTILLING. *In: Levitus, G.; Echenique, V.; Rubinstein, C.; Hopp, E. y Mroginski, L. (Eds.) Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Editorial INTA. Segunda edición. Argentina. 217-228 pp.*
- Sasaki, K.; Aida, R.; Niki, T.; Yamaguchi, H.; Narumi, T.; Nishijima, T.; Hayashi, Y.; Ryuto, H.; Fukunishi, N.; Abe, T. and Ohtsubo, N. 2008. High-efficiency improvement of transgenic torenia flowers by ion beam irradiation. *Plant Biotechnol.* 25:81-89.
- Statistical Analysis System (SAS Institute). 2004. SAS/STAT User's Guide. Release 9 Edition. Cary, NC. USA.
- Statistical Analysis System (SAS Institute). 2008. JMP User's Guide. Release 8 Edition. Cary, NC. USA.
- Shillo, R. 1992. The cuber community holds the answer to flowering problems in polianthes tuberosa. *Acta Hort.* 325:139-364.
- Shu, Q. Y. and Lagoda, P. J. L. 2007. Mutation techniques for gene discovery and crop improvement. *Mol. Plant Breed.* 5:193-195.
- Steiner, A. A. 1984. The universal nutrient solution. ISOSC. *In: Proceedings 6<sup>th</sup> International Congress on Soilless Culture. Lunteren. The Netherlands 633-649 pp.*
- Sugiyama, M.; Saito, H.; Ichida, H.; Hayashi, Y.; Ryuto, H.; Fukunishi, N.; Terakawa, T. and Abe, T. 2008. Biological effects of heavy-ion beam irradiation on cyclamen. *Plant Biotechnol.* 25:101-104.
- Suprasanna, P.; Rupali, C.; Desai, N. S. and Bapat, V. A. 2008. Partial desiccation augments plant regeneration from irradiated embryogenic cultures of sugarcane. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 92:101-105.
- Toker, C.; Yadav, S. S. and Solanki, I. S. 2007. Mutation breeding. *In: Yadav, S. S. (eds.) Lentil: An ancient crop for modern times. Springer. 209-224 pp.*
- Van Harten, A. M. 1998. Mutation breeding: theory and practical applications. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 353 pp.
- Veitia, N.; García, L. R.; Bermúdez-Caraballosa, I.; Orellana, P.; Padrón, Y. and Torres, D. 2007. Efecto de las radiaciones gamma sobre callos de papa var. 'Desirée'. *Biotecnología Vegetal.* 7(1):57-61.
- Watanabe, S.; Mizoguchi, T.; Aoki, K.; Kubo, Y.; Mori, H.; Imanishi, S.; Yamazaki, Y.; Shibata, D. and Ezura, H. 2007. Ethylmethanesulfonate (EMS) mutagenesis of *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom for large-scale mutant screens. *Plant Biotechnol.* 24:33-38.
- Waugh, R.; Leader, D. J.; McCallum, N. and Caldwell, D. 2006. Harvesting the potential of induced biological diversity. *Trends Plant Sci.* 11(2):71-79.
- Yamaguchi, H.; Shimizu, A.; Degi, K. and Morishita, T. 2008. Effects of dose and dose rate of gamma ray irradiation on mutation induction and nuclear DNA content in chrysanthemum. *Breed. Sci.* 58:331-335.
- Yamaguchi, H.; Hase, Y.; Tanaka, A.; Shikazono, N.; Degi, K.; Shimizu, A. and Morishita, T. 2009. Mutagenic effects of ion beam irradiation on rice. *Breed. Sci.* 59:169-177.
- Yamaguchi, H.; Shimizu, A.; Hase, Y.; Degi, K.; Tanaka, A. and Morishita, T. 2009. Mutation induction with ion beam irradiation of lateral buds of chrysanthemum and analysis of chimeric structure of induced mutants. *Euphytica.* 165:97-103.