

DETERMINACIÓN DE LA DL_{50} Y GR_{50} CON RAYOS GAMMA (^{60}Co) EN PROTOCORMOS DE *Laelia autumnalis in vitro*

DL_{50} AND GR_{50} DETERMINATION WITH GAMMA RAYS (^{60}Co) 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 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. 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 LD_{50} 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.

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* está entre 28 y 53 Gy.

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

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 cultivos de plantas (Aros *et al.*, 2012; Kazi, 2015), en particular ornamentales como las orquídeas (Kikuchi, 2000; Luan *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2015), anthurio (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-Basaldúa *et al.*, 2011). El cultivo *in vitro* es indispensable para la germinación asimbiótica de semillas de orquídeas, proceso que en su hábitat requiere

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

INTRODUCTION

The orchid *Laelia autumnalis* is native to Mexico, has inflorescences with showy purple flowers in various shades, shapes, sizes and essences. This species has been used as an ornamental species since prehispanic times by different indigenous groups. Nevertheless, it has never been subject to a breeding program. Wild specimens are illegally traded in local and regional markets from diverse communities in Mexico at very low prices (Beltrán-Rodríguez *et al.*, 2012). The generation of new and improved varieties can increase its value and acceptance of this species in domestic markets and constitute an economic advantage in an export market.

Improvement by mutagenesis is one of the most efficient methods to generate new plant cultivars (Aros *et al.*, 2012; Kazi, 2015), and ornamental plants, particularly orchids (Kikuchi, 2000; Luan *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2015), anthurium (Puchooa, 2005), and chrysanthemums (Yamaguchi *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2012). If the use of ionizing radiation techniques is combined with *in vitro* culture, time and costs for the development of new cultivars are reduced (Yunus *et al.*, 2013), a continuous large-scale production of plants can be obtained, as well as maintain and multiply mutant individuals (Barakat and El-Sammack, 2011; Ángeles-Espino *et al.*, 2013). Also, the somaclonal variation that can occur during micropropagation offers the possibility to increase the frequency of gene and point mutations, which are important for genetic improvement (Estrada-Basaldúa *et al.*, 2011). The *in vitro* culture is essential for asymbiotic seed germination of orchids, which in their habitat require the symbiosis with mycorrhizal fungi for that process (Verma *et al.*, 2014).

Applying ionizing radiation in plants has improved a wide range of characters such as architecture, performance, flowering, and tolerance to biotic and abiotic stress (Kon *et al.*, 2007). The main advantage is its ability to change one or few characters in an adequate cultivar without changing the rest of the genotype (Patil *et al.*, 2015). The efficiency of this radiation is high because about 89 % of the plant varieties obtained by mutagenesis were developed

de la simbiosis con hongos micorrícicos (Verma *et al.*, 2014).

El uso de radiaciones ionizantes en las plantas ha mejorado una gama amplia de caracteres como la arquitectura, el rendimiento, la floración, la tolerancia a estrés biótico y abiótico (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 es alta porque cerca de 89 % de las variedades vegetales obtenidas por mutagénesis se desarrollaron con mutágenos físicos como los rayos X, rayos gamma y neutrones rápidos; dentro de estos agentes mutagénicos los más usados en especies cultivadas (granos, frutales, y ornamentales) son los rayos gamma, pues con esta técnica se ha desarrollado 60 % de las variedades vegetales mutantes (Kon *et al.*, 2007).

Los mutágenos alteran el ADN y causan mutaciones puntuales, deleciones y aberraciones cromosómicas (Tanaka *et al.*, 2010), y los individuos nuevos tienen 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 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 cambian 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).

with physical mutagens, such as X rays, gamma rays and fast neutrons. Gamma rays are within the most mutagens used in cultivated species (grains, fruits and ornamentals), because with this technique 60 % of plant varieties mutants has been developed (Kon *et al.*, 2007).

Mutagens alter DNA and cause point mutations, deletions and chromosomal aberrations (Tanaka *et al.*, 2010) so that new individuals have significant changes in their genomic structure (Emmanuel and Levy, 2002). The mutagenesis technique is particularly efficient in plants with long juvenile periods before flowering and seed production (Predieri, 2001), as well as in native ornamental plants with limited genetic variability (Lee *et al.*, 2008).

Physical mutagens, particularly gamma radiation, are tiny particles of ionizing radiation having a high capacity of penetrable energy on biological tissues (Sadhukhan *et al.*, 2015). Its wavelength is 10 nm (Kitano *et al.*, 2015). Its biological effect is based on the interaction with atoms or molecules, particularly water, in the cell to produce free radicals and make changes in bases and breaks in hydrogen bonds between complementary strands of DNA (Kovács and Keresztes, 2002). These radicals can damage or modify major components of plant cells and change their morphology, anatomy, biochemistry and physiology, depending on the radiation dose (Wi *et al.*, 2007). These effects include changes in cell structure and plant metabolism (Kovács and Keresztes, 2002), such as dilation of the thylakoid membranes, alteration in photosynthesis, modulation of the antioxidant system and accumulation of phenolic compounds (Wi *et al.*, 2005). The cell nucleus is the organelle most affected by ionizing radiation (Pavan *et al.*, 2013).

The radiation effect on cell tissues is divided into three phases. The physical or initial phase lasts only a split second, the chemical phase lasts a few seconds and the biological stage in which the time scale varies from tens of minute to decades (Pavan *et al.*, 2013).

The interval in which the appearance of useful mutations in breeding programs is favored is the median lethal dose (LD_{50}) or mean reductive dose (GR_{50}). This is the amount of radiation absorbed by the population to which 50 % survives or the growth is reduced by 50 %, so it is important to know this dosage range (Ángeles-Espino *et al.*, 2013) before starting a breeding program assisted by mutagenesis. The LD_{50} is unique for each species,

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 es la cantidad de radiación absorbida con la cual sobrevive 50 % de la población expuesta o se reduce el crecimiento en 50 %, por lo que es importante conocer este rango (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 una planta. En callos generados de flores liguladas de *Chrysanthemum morifolium* cv. Delistar White con 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 aumentó el número de flores por vara (Minisi *et al.*, 2013). Para explantes de hoja en *Torenia fournieri* la DL₅₀ fue 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 *L. 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

genotipo and even in different tissues of the same plant. For example, in callus generated from ligulate flowers of *Chrysanthemum morifolium* cv. Delistar White with a DL₅₀ of 0.5 Gy, changes in the flower's shape and the number of flowers per inflorescence were obtained (Barakat *et al.*, 2010). The LD₅₀ of *Tricyrtis hirta* embryogenic callus was determined at 20 Gy and variants with dwarfism, with more green thin leaves and increased number and size of flowers were obtained (Nakano *et al.*, 2010). In seeds of *Moluccella laevis* the DL₅₀ of 25 Gy increased the number of flowers per stem (Minisi *et al.*, 2013). For leaf explants of *Torenia fournieri* the DL₅₀ was 63 Gy and 72 Gy in diploid and polyploid plants, both cases obtained mutants with red leaves (Chanchula *et al.*, 2015).

The radiosensitivity of tissues to gamma radiation is not known for the orchid's native to Mexico, nor has the optimal dose for variants of ornamental importance been determined. Therefore, the objective of this study was to determine the DL₅₀ and GR₅₀ with gamma rays (⁶⁰Co) in *L. autumnalis* protocorms cultured *in vitro*. Our hypothesis was that there is an optimal dose to generate variants of *L. autumnalis* from irradiated protocorms.

MATERIALS AND METHODS

This research was conducted at the *in vitro* Plant Tissue Laboratory of the Facultad de Agrobiología of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, located in Uruapan, Michoacán, México (19° 23' 41" N and 102° 03' 31"), from May 2014 to March 2015. Protocorms irradiation was conducted at the Gamma Irradiator Department of the Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), located at Ocoyoacac, State of Mexico, Mexico.

Plant material

In this study, powder seeds from six fruit obtained via manual autofecundation from *L. autumnalis* plants, from the germplasm bank of the National Plant Genetic Resources System Collection, were used.

Culture medium

Culture medium with the Murashige and Skoog (1962) (MS) mineral salts was used, without phytohormones and supplemented with sucrose (30 g L⁻¹), myoinositol (100 mg

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

Un medio con las sales minerales de Murashige y Skoog (1962) (MS) fue usado, 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. De este medio se sirvieron 20 mL 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°C .

Establecimiento del cultivo aséptico

Para la siembra se tomaron 33 muestras de semillas (20 mg cada una) y se colocaron en jeringas de 10 mL, y se efectuó la desinfección con hipoclorito de sodio comercial 15 % v/v (6 % de ingrediente activo) por 15 min. 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 promeristemas y protocormos con hojas. Estas fases se observaron de manera simultánea en todas las unidades experimentales,

L^{-1}), thiamine (0.4 mg L^{-1}) and agar (6 g L^{-1}). The pH was adjusted to 5.7 ± 0.1 with NaOH 1N. 20 mL of this medium were served in 100 mL glass bottles and autoclaved for 15 min at 1.2 kg cm^{-2} pressure and 121°C .

Aseptic culture establishment

For planting, 33 sample seeds (20 mg each) were placed in 10 mL syringes, and disinfection with commercial sodium hypochlorite 15 % v/v (6 % active ingredient) for 15 min was performed. In a laminar flow hood disinfectant solution was removed and three rinses with sterile water were performed. The powder seeds of each sample were suspended in 0.5 mL of sterile water and placed in a vial with culture medium. Their incubation was carried out in a 16/8 h light/dark photoperiod and photosynthetically active radiation of $45 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ provided by 75 W white fluorescent light lamps.

Irradiation with ^{60}Co gamma rays

Forty-five days after sowing (das), the obtained protocorms were treated with ten irradiation doses (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 and 50 Gy) plus a control treatment without irradiation. The experimental design was completely randomized with 11 treatments and three repetitions, the experimental unit was a vial with protocorms obtained from germination of 20 mg of seeds. The amount fluctuated between 500 and 700 protocorms. One day after irradiation (46 das), the protocorms of each bottle were transferred to fresh culture medium. At 90 das, these were transferred to Petri dishes in order to facilitate their evaluation. Throughout all this time, the development of the protocorms was divided into three phenological stages: photosynthetic protocorms, protocorms with pro-meristems and protocorms with leaves. These phases were observed simultaneously in all the experimental units because the seedlings development in *L. autumnalis* is an asynchronous process.

At 135 das, protocorms were subcultured in 250 mL plastic containers with 50 mL of fresh basal medium and incubated in the already described environmental conditions.

Variables evaluated in protocorms

In the protocorms, we assessed the percentages of survival, photosynthetically active, and with pro-meristems and leaves. Each experimental unit (bottle) was divided into quadrants to facilitate counts. In each quadrant, the number of living, dead, photosynthetic, with pro-meristems and leaf protocorms were counted. With the addition of protocorms at each phenological stage, the total protocorm number per experimental unit was

porque 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 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: % de supervivencia por unidad experimental = (Número de protocormos vivos por frasco/Número total de protocormos contenidos en el frasco) X 100. En cada variable se utilizó el mismo procedimiento.

Materia fresca de protocormos. Todos los protocormos por unidad experimental se pesaron en una balanza analítica marca OHAUS® con legibilidad de 0.01 mg.

Estas variables se evaluaron 45 d después de la irradiación (90 dds).

Variables evaluadas en plántulas

Longitud de plántula, pseudobulbo y raíz. La distancia entre la base y el ápice de la plántula, pseudobulbo y raíz, se midió 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 (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 (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).

obtained. This was used as denominator to obtain the survival percentage, percentage of photosintetic protocorms, with pro-meristems and leaves as follows: survival percentage per experimental unit = (number of living protocorms per vial/total number of protocorms per flask) x 100. The same procedure was used for each variable.

Protocorm fresh matter. The total protocorms per experimental unit were weighed on an analytical balance (OHAUS®) with 0.01 mg readability.

These variables were assessed 45 d after irradiation (90 das).

Variables evaluated in the seedlings

We assessed the seedling, root and pseudobulbs length. The distance between the base and the apex of the seedling, pseudobulbs and root with digital vernier was measured.

Leaves and pseudobulb width. It was measured in the intermediate area of each organ with a digital vernier.

Number of leaves and roots. It was quantitated directly on each seedling.

Seedlings fresh mass (mg). Each seedling was weighed on a digital analytical balance (OHAUS®) with 0.01 mg readability.

Seedling biomass. Each seedling was dried in an oven (FELISA), at 70 °C for 72 h. The dry seedlings were then weighed into digital analytical balance (OHAUS®) with a 0.01 mg readability.

The assessment of these variables was performed in five seedlings per repetition, a total of 15 per treatment, at 214 d after irradiation (259 das).

Statistical analysis

An ANOVA was performed on the data obtained at 45 and 214 days after radiation, the Pearson correlation coefficient was calculated and the Tukey test was carried out for means comparison between treatments. These were performed with the SAS software version 9.0 (Statistical Analysis System, 2002).

In order to assess the magnitude of the response of each variable to the radiation doses a linear regression model was evaluated. However, only the survival and leaves emergence variables adjusted to this model, thus, the LD₅₀ and GR₅₀ determination was performed only for these variables.

Análisis estadístico

Con los datos obtenidos a los 45 y 214 ddi se realizó ANDE-VA, 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 DL₅₀ y GR₅₀ 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 promeristemos, con hojas y la materia fresca de protocormos (Cuadro 1).

La radiación con dosis bajas (5 a 20 Gy) no afectó la supervivencia de protocormos comparado al tratamiento testigo, aunque hubo reducción de protocormos vivos entre 17.6 y 46.4 % en los tejidos tratados con 25 a 50 Gy (Figura 1A). Dosis de 20 a 30 Gy estimularon en los protocormos la presencia de clorofila, que se notó como un cambio de color amarillo claro a verde (Figura 1B), niveles no diferentes a 45 Gy. La acumulación de materia fresca fue similar entre los protocormos del tratamiento testigo y los tratados con los niveles de radiación, aunque distinta entre los irradiados a 5 y 10 Gy respecto a 35 Gy, los

RESULTS AND DISCUSSION

Radiation effect on protocorm development

The analysis of variance revealed that the radiation affected the protocorm's survival, the presence of photosynthetic protocorms, protocorm with promeristems, with leaves and fresh protocorm matter (Table 1).

Radiation at low doses (5 to 20 Gy) did not affect the survival of protocorms compared to the control treatment, although there was a reduction of live protocorms between 17.6 % and 46.4 % in the tissues treated with 25 to 50 Gy (Figure 1A). Doses between 20 and 30 Gy stimulated chlorophyll presence in the protocorms, which was noted as a change from the light yellow coloration to green (Figure 1B), statistically not different to those of 45 Gy. The fresh material accumulation was similar between the protocorms of the control treatment and those treated with radiation levels, but different between those irradiated at 5 and 10 Gy regard those treated with 35 Gy, the first with 69 % and 66 % more accumulation of fresh matter (Figure 1C). A similar response was observed for the promeristems formation, which was statistically similar in irradiated treatments and the control, but almost twice in the irradiated protocorms at 20, 30 and 35 Gy, compared to the 50 Gy (Figure 1D).

The formation of protocorms with leaves did not differ ($p>0.05$) between the non-radiated seedlings and those treated with 5 and 10 Gy. From 15 Gy on, protocorms with leaves formation was reduced ($p\leq 0.05$), as the irradiation dose increased (Figure

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

Table 1. Analysis of variance for the ⁶⁰Co gamma radiation effect on survival and development of *Laelia autumnalis* protocorms.

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

** $p\leq 0.01$; ns=no significativo ♦ $p\leq 0.01$; ns = not significant.

primeros con 69 y 66 % más materia fresca acumulada (Figura 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, comparado con 50 Gy (Figura 1D).

La formación de protocormos con hojas no difirió ($p>0.05$) entre las plántulas no irradiadas y las tratadas con 5 y 10 Gy; desde 15 Gy se redujo ($p\leq 0.05$) la formación de protocormos con hojas al aumentar

1E). The explants development accelerated at low radiation doses (radio-stimulation), but decreased with the increasing gamma radiation doses, as in *Chrysanthemum morifolium in vitro* callus (Soliman *et al.*, 2014).

Although our investigation did not carried out assessments at molecular level, it is known that tissue damage with increasing gamma radiation dose occurred, even though the cells have a DNA-repair mechanism that acts when exposed to any

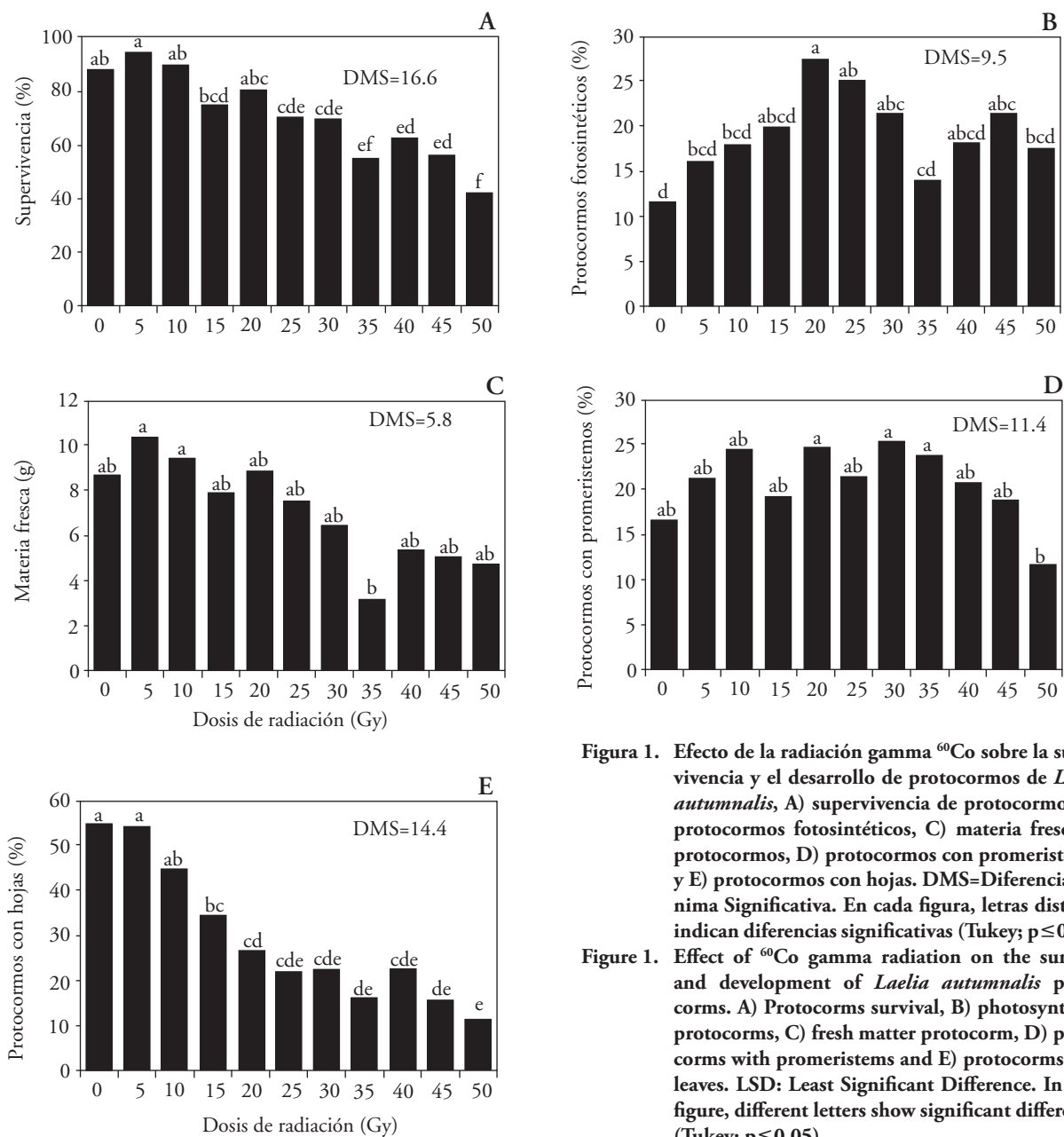


Figura 1. Efecto de la radiación gamma ^{60}Co sobre la supervivencia y el desarrollo de protocormos de *Laelia autumnalis*, A) supervivencia de protocormos, B) protocormos fotosintéticos, C) materia fresca de protocormos, D) protocormos con promeristemos y E) protocormos con hojas. DMS=Diferencia Mínima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

Figure 1. Effect of ^{60}Co gamma radiation on the survival and development of *Laelia autumnalis* protocorms. A) Protocorms survival, B) photosynthetic protocorms, C) fresh matter protocorm, D) protocorms with promeristems and E) protocorms with leaves. LSD: Least Significant Difference. In each figure, different letters show significant differences (Tukey; $p\leq 0.05$).

la dosis de irradiación (Figura 1E). El desarrollo de los explantes se aceleró a dosis de radiación baja (radioestimulación), pero se redujo al aumentar la dosis de radiación gamma, como sucede en callos *in vitro* de *Chrysanthemum morifolium* (Soliman *et al.*, 2014).

Aunque en nuestra investigación no hubo estudios a nivel molecular, los tejidos se dañan al aumentar la dosis de radiación gama, aunque las células presentan un mecanismo de reparación del ADN cuando están expuestas a cualquier fuente de radiación. Pero si la intensidad de la fuente de radiación es demasiado alta, este mecanismo ya no puede reparar todas las células dañadas, las cuales mueren como ocurre en plantas de jengibre (*Zingiber officinale*) (Yoon *et al.*, 2014). En las células sobrevivientes 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), y causa 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 a nivel fisiológico o físico, incluidos daños en los cromosomas y la reducción de la supervivencia al aumentar la dosis de radiación, se reportan 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 niveles de radiación aplicados y la supervivencia de protocormos (−0.91), protocormos con hojas (−0.90) y materia fresca de protocormos (−0.69). Además hubo correlación positiva entre la supervivencia y los protocormos con hojas (0.89) y materia fresca de protocormos (0.71), y entre la formación de protocormos con hojas y la materia fresca de protocormos (0.65) (Cuadro 2).

Efecto de la radiación sobre el desarrollo de plántulas

El ANDEVA reveló que la radiación influyó en la materia fresca, biomasa y longitud de las plántulas y

source of radiation. Nevertheless, if the intensity of the radiation source is too high, this mechanism cannot repair any damaged cells, which die as is the case in ginger plants (*Zingiber officinale*) (Yoon *et al.*, 2014). Free radicals that cause metabolic disorders are produced in surviving cells (Pavan *et al.*, 2013), the gene expression pattern is modified (Corthals *et al.*, 2000), which regulates certain metabolic pathways and defense systems (Zolla *et al.*, 2003), causing quantitative and qualitative changes in the total soluble protein content (Corthals *et al.*, 2000). These proteins have an important role in signal transduction in antioxidant defense, antifreeze, heat shock, anti-pathogenesis, and osmolytes synthesis, which are essential for the functions and growth of plants (El-Fiki *et al.*, 2015). These alterations at cellular level, caused either by physiological or physical malfunctions, which include chromosome damage and reduced survival as the radiation dose increases, are reported in *Jatropha curcas* L. (Dhakshanamoorthy *et al.*, 2011), as well as in four commercial varieties of *Lycopersicon esculentum* (Ramírez *et al.*, 2006), *Withania somnifera* (Bhosale and More, 2014), *Orthosiphon stamineus* (Kiong *et al.*, 2008) and *Chrysanthemum* (Yamaguchi *et al.*, 2009).

The correlation coefficients were negative and highly significant between the levels of applied radiation and protocorms survival (−0.91), protocorms with leaves (−0.90) and fresh protocorm matter (−0.69). There was also a positive correlation between survival and protocorms with leaves (0.89) and between fresh protocorm matter (0.71) and the formation of protocorms with leaves and protocorm fresh matter (0.65) (Table 2).

Radiation effect on seedling development

The ANOVA revealed that the radiation influenced fresh matter, biomass and length seedling, roots and leaves width, but did not affect the number of leaves, pseudobulbs length and width and number of roots (Table 3).

The length of the seedlings increased 32 % relative to the unirradiated treatment when radiation at 5 Gy was used. This suggests a radio-stimulant growth effect at low radiation doses; at 35, 40 and 50 Gy seedlings were 31, 50 and 42 % smaller than the unirradiated seedlings (Figures 2A and 3). The greatest fresh material accumulation (189 and

Cuadro 2. Correlación del efecto de la radiación gamma ^{60}Co sobre la supervivencia y desarrollo de protocormos de *Laelia autumnalis*.**Table 2. Correlation of the effect of ^{60}Co gamma radiation on the survival and development of protocorms of *Laelia autumnalis*.**

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

** $p \leq 0.01$; * ≤ 0.05 ; ns=no significativo ♦ ** $p \leq 0.01$; * ≤ 0.05 ; ns: not significant.

la anchura de hojas y raíces, pero no afectó el número de hojas, la longitud y ancho de pseudobulbos y el número de raíces. (Cuadro 3).

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 (Figuras 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 a los otros tratamientos (Figura 2B). La anchura de las hojas se redujo en 25 y 29 % con 40 y 50 Gy respecto al testigo, y el número de raíces

176 mg) was recorded in seedlings treated with 5 and 10 Gy. This was statistically similar to the control and treated with 15 Gy, but superior to other treatments (Figure 2B). The width of the leaves decreased by 25 and 29 % with doses of 40 and 50 Gy as compared to control: the roots number decreased by 37% with 45 Gy (Figure 2C and D). Biomass accumulation was similar in all seedlings treatments, except in those treated with 5 and 15 Gy, which accumulated almost twice the biomass than those irradiated with 45 Gy (Figure 2E). The biomass decreased by the increase in the radiation dose was observed in *Arabidopsis* seedlings that inhibit carbohydrate transport when treated with radiation dosages greater than 50 Gy (Bondada and Oosterhuis, 2003), because of damage

Cuadro 3. Análisis de varianza para el efecto de la radiación gamma ^{60}Co sobre el desarrollo de plántulas de *Laelia autumnalis*.**Table 3. Analysis of variance for the ^{60}Co gamma radiation effect on *Laelia autumnalis* seedling development.**

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	1.13 ^{ns}	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	3.50 ^{ns}	3.48	21.84	0.52
Ancho de pseudobulbos (mm)	2.52	0.16 ^{ns}	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	52.94 ^{ns}	42.31	41.19	0.17

** $p \leq 0.01$; ns: no significativo v ** $p \leq 0.01$; ns: not significant.

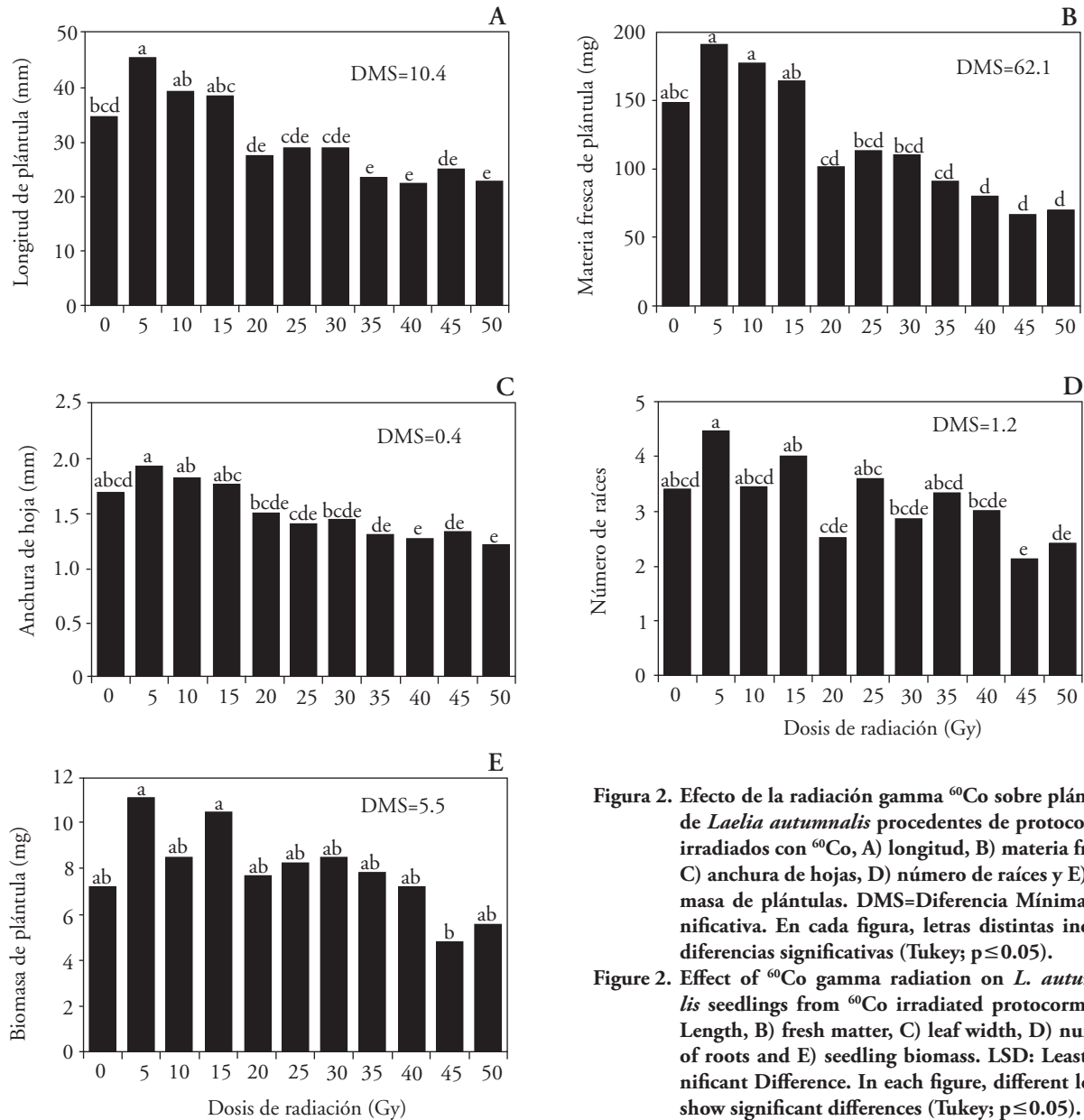


Figura 2. Efecto de la radiación gamma ^{60}Co sobre plántulas de *Laelia autumnalis* procedentes de protocormos irradiados con ^{60}Co , A) longitud, B) materia fresca, C) anchura de hojas, D) número de raíces y E) biomasa de plántulas. DMS=Diferencia Mínima Significativa. En cada figura, letras distintas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

Figure 2. Effect of ^{60}Co gamma radiation on *L. autumnalis* seedlings from ^{60}Co irradiated protocorms. A) Length, B) fresh matter, C) leaf width, D) number of roots and E) seedling biomass. LSD: Least Significant Difference. In each figure, different letters show significant differences (Tukey; $p \leq 0.05$).

disminuyó en 37 % con 45 Gy (Figura 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 (Figura 2E). La disminución de la biomasa al aumentar la dosis de radiación se ha observado en plántulas de *Arabidopsis* que inhiben su transporte de carbohidratos cuando se tratan con radiaciones mayores de 50 Gy (Bondada y Oosterhuis, 2003), porque hay daños y desorientación de los tilacoides del grana y aumenta

and disorientation in the grana of the thylakoids, as well as increased accumulation of starch granules in the chloroplasts. These ultrastructural changes were not observed in the chloroplasts of cells irradiated with low doses (Wi *et al.*, 2007).

In contrast to the radioinhibition phenomenon, the hormesis observed at 5 Gy dose on *L. autumnalis* seedlings growth is described alike to the stimulatory effect of any growth factor on an organism (Szarek, 2005). This is attributed to a change in the hormone signaling network in plant cells or an increase in the

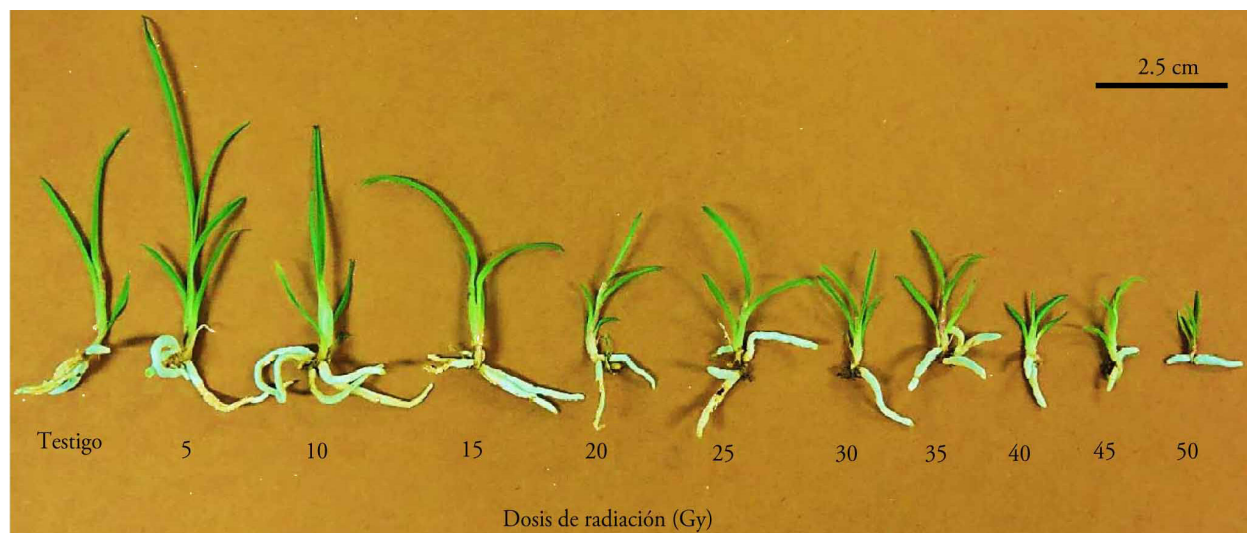


Figura 3. Plántulas de *Laelia autumnalis* procedentes de protocormos irradiados con rayos gama ^{60}Co a diferentes dosis de radiación.

Figure 3. Seedlings of *Laelia autumnalis* from protocorms irradiated with ^{60}Co gamma rays at different radiation doses.

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 a la radioinhibición, el fenómeno de hormesis observado con 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). Esto 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, reportado en *Gypsophilla paniculata* en la cual al irradiar callos con 1 Gy aumentó la longitud de brotes (3.4 cm) (Barakat y El-Sammak, 2011). En *L. 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 aumentó 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 , 30 Gy hubo el porcentaje mayor de callos regenerados (80.8 %), 20.8 % más que en

antioxidant capacity of the cells in order to overcome stress factors such as fluctuations of light intensity and temperature in growth conditions (Kim *et al.*, 2004). In addition, radiation accelerates the rate of cell division and activates auxin, this phenomenon has been reported in *Gypsophilla paniculata* in which, when calluses were irradiated with 1 Gy increased shoot length (3.4 cm) was obtained (Barakat and El-Sammak, 2011). In *L. esculentum* there is a radio-stimulant interval between 5 and 25 Gy for plant height (Ramírez *et al.*, 2006); the gamma radiation on seeds of *Triticum durum* increased between 32 and 75 % the number and length of roots when irradiated with 20 Gy (Melki and Marouani, 2010). In the regeneration of embryogenic callus of *Heliconia psittacorum* irradiated with ^{60}Co gamma radiation, the 30 Gy dose showed the highest percentage of regenerated callus (80.8 %), 20.8 % more than in the unirradiated treatment and 74.8 % more than in callus treated with 75 Gy (6 %) (Urrea and Ceballos, 2005).

The correlation coefficients were negative and highly significant between the different levels of applied radiation and the seedlings fresh matter (−0.57), seedling length (0.56), leaf width (−0.52), number of roots (−0.40) and length of pseudobulbs (−0.40) (Table 4). This confirms a negative correlation between the energy absorbed per unit mass in the

el tratamiento sin irradiar y 74.8 % más que en los callos tratados con 75 Gy (6 %) (Urrea y Ceballos, 2005).

Los coeficientes de correlación fueron negativos y altamente significativos entre los niveles de radiación aplicados y la materia fresca de plántula (-0.57), longitud de plántulas (-0.56) anchura de hojas (-0.52), número de raíces (-0.41) y longitud de pseudobulbos (-0.40) (Cuadro 4). Esto confirma una correlación negativa entre la energía absorbida por unidad de masa en la dosis aplicada y las variables 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 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 500 Gy (Kitano *et al.*, 2015). En *Agave tequilana* la radiación absorbida produce mutaciones en el ADN de las células y altera su desarrollo normal al aumentar la dosis de radiación (Ángeles-Espino *et al.*, 2013).

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

applied dose and the growth and development variables of the plants (Giovannini *et al.*, 2015). In *Arabidopsis* this inhibition is attributed to the arrest of the cell cycle at the G2/M phase during the division of somatic cells or by genome damage (Preuss and Britt, 2003). On chrysanthemums this is attributed to the generation of chromosomal aberrations and the loss of the cells proliferative capacity (Patil *et al.*, 2015) and damage to the genes involved in the morphogenesis of true leaves, as in *Rumex obtusifolius* leaves irradiated with 500 Gy (Kitano *et al.*, 2015). In *Agave tequilana* the absorbed radiation produces mutations in the cell's DNA and alter their normal development as the radiation dose increases (Ángeles-Espino *et al.*, 2013).

There were positive correlation coefficients between fresh matter and seedling length (0.70), root length (0.66), leaf width (0.64) and roots number (0.55). Significant correlation coefficients were also present between the length of seedling and width leaves (0.65) and pseudobulb length (0.54).

Determination of LD_{50} and GR_{50}

The linear regression model showed the best adjustment to explain the radiation effect on the protocorms survival (Table 5). The protocorm and seedlings fresh matter showed a tendency to decrease as the radiation dose increased. However, they presented a low R^2 value (0.48 and 0.35) and, therefore, these variables were not considered for the calculation of the GR_{50} . The average lethal dose for

**Cuadro 4. Correlación del efecto de la radiación gamma ^{60}Co sobre el desarrollo de plántulas de *Laelia autumnalis*.
Table 4. Correlation of the ^{60}Co gamma radiation effect on seedling development of *Laelia autumnalis*.**

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 Radiación	1	1.00	-0.570**	-0.253**	-0.562**	-0002 ^{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

** $p \leq 0.01$; * ≤ 0.05 ; ns: no significativo ♦ ** $p \leq 0.01$; * ≤ 0.05 ; ns: not significant.

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). La materia fresca de protocormos y de plántulas mostraron una tendencia a disminuir conforme se aumentó 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 calcular la GR₅₀. La dosis letal media para la supervivencia de protocormos fue 53 Gy (Figura 4), lo cual se considera que favorece la aparición de mutaciones útiles. La dosis de reducción media del crecimiento (GR₅₀) para la formación de hojas en protocormos fue 28 Gy (Cuadro 5 y Figura 4).

La DL₅₀ para *L. autumnalis* difiere a la reportada para rizomas de *Alstroemeria aurea* G. irradiados con

the protocorms survival was 53 Gy (Figure 4), which is considered as the dose that favors useful mutations development. The average growth reduction dose (GR₅₀) for forming protocorm leaves was 28 Gy (Table 5 and Figure 4).

The LD₅₀ for *L. autumnalis* differs to that reported for *Alstroemeria aurea* G. rhizomes irradiated with gamma rays at doses between 0 and 40 Gy, and LD₅₀ was determined at 40 Gy; this dose reduced survival explants in 50 %, and might be used for breeding purposes (Aros *et al.*, 2012). The GR₅₀ for the percentage of seed germination in two varieties of rice (*Oryza sativa* L.) irradiated with ⁶⁰Co gamma radiation from 20 to 200 Gy, was 89 and 188 Gy in the JGL and Vijetha varieties (Pavan *et al.*, 2013). In strawberries shoots irradiated with doses between 30 to 325 Gy the survival LD₅₀ was 177 Gy (Murti *et al.*, 2013.); long bean seeds (*Vigna sesquipedalis*)

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

Table 5. Regression analysis for protocorm survival and leaf emergency in *Laelia autumnalis* protocorms irradiated with ⁶⁰Co gamma radiation.

	Supervivencia	Formación de hojas
R ²	0.87	0.83
Pr>F	0.0001	0.0001
Ecuación lineal	Dosis= (Y _{testigo} /2-95.20)/-0.97	Dosis=(Y _{testigo} /2-52.29)/-0.88
DL ₅₀ o GR ₅₀	53	28

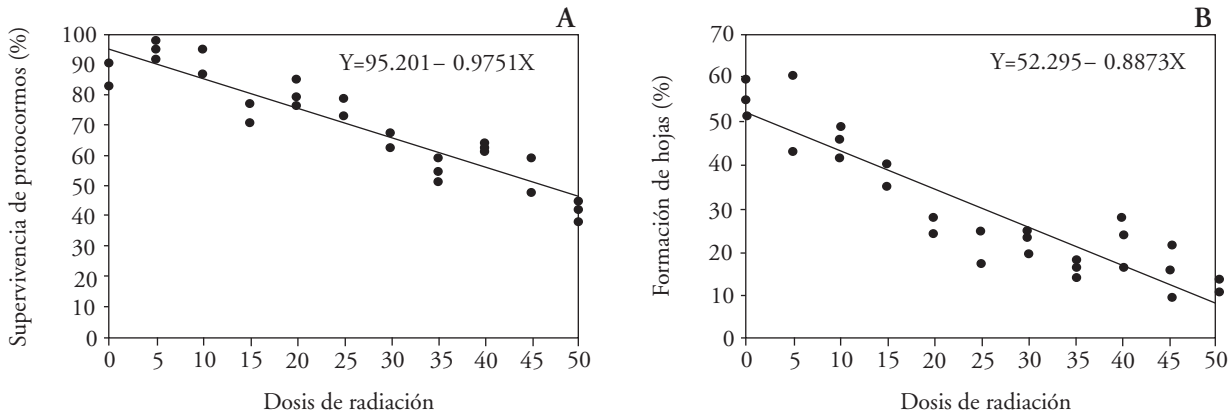


Figura 4. Efecto de la radiación gamma ⁶⁰Co sobre protocormos de la orquídea *Laelia autumnalis*, A) porcentaje de supervivencia en protocormos y B) formación de hojas en protocormos.

Figure 4. Effect of ⁶⁰Co gamma radiation on *Laelia autumnalis* orchid protocorms. A) Protocorms survival rate and B) leaf formation in protocorms.

rayos gamma a dosis de 0 a 40 Gy y la DL₅₀ se determinó en 40 Gy; esta dosis redujo la supervivencia de explantes en 50 %, y se puede usar para 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 de 20 a 200 Gy, fue 89 y 188 Gy en las variedades JGL y Vijetha (Pavan *et al.*, 2013). En brotes de fresa irradiados con 30 a 325 Gy, la DL₅₀ para supervivencia de brotes fue 177 Gy (Murti *et al.*, 2013); en semillas de frijol largo (*Vigna sesquipedalis*) irradiadas con 300 a 800 Gy la DL₅₀ para supervivencia fue 600 a 800 Gy y la GR₅₀ para altura de planta fue de 400 a 500 Gy (Kon *et al.*, 2007).

Con base en esos datos se confirmó 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). Además 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 *L. 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 epífitas altas intensidades de radiación solar reducen la capacidad fotosintética y afectan el intercambio gaseoso (Stancato *et al.*, 2002).

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*, en la que se determinó una GR₅₀ de 20 Gy para el peso de materia fresca. Además, el peso de materia fresca de callo es un excelente indicador de la radiosensibilidad (González *et al.*, 2007). En explantes de *A. tequilana* irradiados con rayos gamma de 0 a 50 Gy, la dosis reductiva media fue 20 a 25 Gy para la formación de plántulas y de 15 a 25 Gy para la formación de callos. Con estas dosis aumenta la probabilidad de inducir

irradiated with 300 to 800 Gy had a LD₅₀ for survival between 600 and 800 Gy, and GR₅₀ for plant height was between 400 and 500 Gy (Kon *et al.*, 2007).

Based on those data, it is confirmed that the DL₅₀ and GR₅₀ are specific to each species, genotype and even size and type of the irradiated tissue, and that the sensitivity to radiation depends on the nature and extent of chromosomal damage (Kiong *et al.*, 2008; Pavan *et al.*, 2013). Besides, it varies depending on the DNA content, size and number of chromosomes (Sparrow *et al.*, 1961), and upon water content in the irradiated plant material, since the radiation interacts with molecules, particularly water, to produce free radicals in the cells. These radicals modify various important compounds in plants cells, because of which, seeds tolerate higher LD₅₀ due radiation doses compared to succulent tissues (Yunus *et al.*, 2013).

The LD₅₀ determined for *L. autumnalis* seedlings confirms that this species is highly sensitive to gamma radiation. This sensitivity is also observed for solar radiation, which is attributed to the fact that *L. autumnalis* is an epiphytic species that lives under tree canopies. In epiphytic orchids high solar radiation intensities reduce photosynthetic capacity and affect gas exchange (Stancato *et al.*, 2002).

The average reductive dose of 28 Gy for *L. autumnalis* protocorms to form leaves is similar to that of *Agave fourcroides*, in which, a GR₅₀ of 20 Gy for fresh weight was identified. Besides, weight of fresh callus material was an excellent indicator of radiosensitivity (González *et al.*, 2007). In *A. tequilana* explants irradiated with gamma rays at doses up to 50 Gy the average reductive dose was between 20 and 25 Gy for seedlings formation and 15 to 25 Gy for callus formation. These doses are likely to induce favorable mutations for selection and increased breeding purposes (Ángeles-Espino *et al.*, 2013). However, the GR₅₀ determined for leaves formation for *L. autumnalis* protocorms is high when compared with the results in *Etlingera elatior* explants irradiated with ⁶⁰Co gamma rays from 0 to 140 Gy, where the DL₅₀ for survival explants was determined to be at 10 Gy (Yunus *et al.*, 2013). Also, in nard tubers (*Polianthes tuberosa* L.) irradiated with gamma ray doses, between 0 to 30 Gy, LD₅₀ was 9.09 Gy for the survival of acclimated seedlings from *in vitro* cultured shoots; this was not the case for the tubers established *in vivo*, for which a LD₅₀ of 25.91 Gy for the survival of plants was determined (Estrada-Basaldúa *et al.*, 2011).

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 en explantes de *Etlingera 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). En tubérculos de nardo (*Polianthes tuberosa* L.), irradiados con rayos gamma de 0 a 30 Gy la DL₅₀ fue 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, pero 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. Rev. Fitotec. Mex. 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. Rev. FCA UNCUIYO 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. Austr. J. Crop Sci. 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*. Afr. J. Agric. Res. 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

CONCLUSIONS

The ⁶⁰Co gamma radiation exercised an inversely proportional effect on growth and development of *L. autumnalis* seedlings. Low doses stimulate seedling growth, high doses inhibit protocorms survival, leaf formation and seedling fresh material.

Irradiation dose between 28 and 53 Gy may be used in breeding programs of *L. autumnalis* in order to promote mutations that favor variants of ornamental importance.

—End of the English version—



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. Biol. 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. Int. J. 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 α -ray irradiation. Int. Trans. J. Eng. Manag. Sci. Tech. 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. C. R. 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. Not. Sci. Biol. 7: 66-71.

Emmanuel E., and A. A. Levy. 2002. Tomato mutants as tools for functional genomics. Curr. Opin. Plant. Biol. 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 ⁶⁰Co en nardo (*Polianthes tuberosa* L.). Rev. Mex. Cienc. Agríc. 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 Hort. 1087: 373-378.

González O., G., S. Alemán G., M. Garriga, R. Ortíz, and C. De la Fe. 2007. Radio sensitivity to gamma rays (⁶⁰Co) in shoot tips of henequen. Biot. Veg. 7: 115-117.

- Kazi N. A. 2015. Mutation breeding in flower crops. A. J. M. S. 3: 228-230.
- Kikuchi K., O. 2000. Orchid flowers tolerance to gamma-radiation. Radiat. Phys. Chem. 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. J. Plant Biol. 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. Am.-Eurasian J. Sustain. Agric. 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*). Am. J. Appl. Sci. 4: 1090-1093.
- Kovács E., and A. Keresztes. 2002. Effect 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 J. Plant Res. 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 mutagenesis. J. Plant Biol. 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. Biotechnol. 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. Sci. Hort. 144: 1-9.
- Melki M., and A. Marouani. 2010. Effects of gamma rays irradiation on seed germination and growth of hard wheat. Environ. Chem. Lett. 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. Am.-Eurasian J. Agric. Environ. Sci., 13: 696-704.
- Murashige T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays whit tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Murthi 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. Afr. J. Biotechnol. 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 Biotechnol. 27: 155-160.
- Patil U. H., G. N. Deshmukh, and N. A. Kazi. 2015. Mutation breeding in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* T.). Asian J. Multidiscipl. 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 J. Plant Sc. Res. 3: 54-68.
- Predieri S. 2001. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. Plant Cell Tiss. Org. 64: 185-210.
- Preuss S. B., and A. B. Britt. 2003. A DNA-damage-induced cell cycle checkpoint in *Arabidopsis*. Genetics 164: 323-334.
- Puchooa D. 2005. In vitro mutation breeding of *Anthurium* by gamma radiation. Int. J. Agri. Biol. 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). Cult. Trop. 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.). J. Crop 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. Radiat. Bot. 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. Rev. Bras. Bot. 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. EJPAP 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. J. Radiat. Res. 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*. Actual Biol. 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. Turk. J. Bot. 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. J. Plant Biol. 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 Sci. 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., 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. Ras-hid A. 2013. *In vitro* mutagenesis of *Eitlingera elatior* (Jack) and early detection of mutation using RAPD markers. Turk. J. Biol. 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 Physiol. 13: 198-214.