

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**

**ESCUELA DE PREGRADO**

**MEMORIA DE TÍTULO**

**ESTIMACIÓN DE DOSIS LETAL 50 EN DOS EXPLANTES DE *Alstroemeria* spp  
IRRADIADOS CON RAYOS GAMMA**

**CIPRIANO ANDRÉS CORTÉS CONGET**

**SANTIAGO – CHILE**  
**2017**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**

**ESCUELA DE PREGRADO**

**MEMORIA DE TÍTULO**

**ESTIMACIÓN DE DOSIS LETAL 50 EN DOS EXPLANTES DE *Alstroemeria* spp  
IRRADIADOS CON RAYOS GAMMA**

**ESTIMATION OF LETAL DOSE 50 IN TWO EXPLANTS OF *Alstroemeria* spp  
IRRADIATED WITH GAMMA RAYS**

**CIPRIANO ANDRÉS CORTÉS CONGET**

**SANTIAGO – CHILE**  
**2017**

# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

ESTIMACIÓN DE DOSIS LETAL 50 EN DOS EXPLANTES DE *Alstroemeria* spp  
IRRADIADOS CON RAYOS GAMMA

Memoria para optar al Título  
Profesional de Ingeniero Agrónomo

CIPRIANO ANDRÉS CORTÉS CONGET

	Calificaciones
<b>PROFESORES GUÍAS</b>	
Sr. Danilo Aros O. Ingeniero Agrónomo, Ph.D	6,8
Sra. María Loreto Prat del R. Ingeniero Agrónomo, Dr.	6,8
<b>PROFESORES EVALUADORES</b>	
Sr. Herman Silva A. Bioquímico, Ph.D.	4,5
Sra. Marcela Esterio G. Ingeniero Agrónomo, Mg.Sc	6,4

SANTIAGO – CHILE  
2017

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	7
<b>Lugar de estudio</b> .....	7
<b>Material vegetal</b> .....	7
<b>Dosimetría química</b> .....	7
<b>Irradiación del material</b> .....	9
<b>Calculo de DL50</b> .....	9
<b>Evaluaciones</b> .....	10
Rizomas .....	10
Callos embriogénicos.....	10
<b>Análisis estadístico</b> .....	10
Dosimetría física.....	10
Dosimetría química.....	10
<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	12
<b>Dosimetría química</b> .....	12
<b>Irradiación del material</b> .....	14
<b>Rizomas</b> .....	14
Tiempo a primer brote .....	14
Brotación diaria .....	15
Muerte de rizomas .....	17
Cálculo de DL50.....	17
<b>Callos embriogénicos</b> .....	19
Oxidación del material.....	19
Aumento de peso y muerte de callos embriogénicos.....	20
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	22
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	23

## RESUMEN

La inducción de mutagénesis mediante la aplicación de rayos gamma es una técnica ampliamente utilizada en el mejoramiento genético de especies ornamentales, debido a la importancia que genera la novedad en la floricultura. En estos cultivos, es relativamente simple la selección para características relevantes (color de flores, tamaño de planta y flores, entre otras), lo que se traduce en una técnica de mejoramiento genético más eficiente. En *Alstroemeria* existen diversas variedades producto de mutagénesis con aplicación de radiación, donde las variaciones principales que se buscan son: cambio en el tamaño y color de las flores, forma y rayado interno de los tépalos, el vigor de la planta, productividad y periodo de floración. Previo a la irradiación con fines de mejoramiento genético se deben calcular los tiempos de exposición del material y la uniformidad de aplicación de radiación, lo que se conoce como dosimetría química. Junto con esto, se debe determinar una dosis que produzca un alto porcentaje de mutaciones, y que a la vez permita la sobrevivencia de un alto número de explantes, siendo la dosis donde se produce una mortalidad de 50% (DL50) un punto óptimo para irradiar con fines de mejoramiento genético.

El objetivo de este estudio fue estimar la dosis letal 50 (DL50) utilizando 2 explantes de *Alstroemeria* spp los cuales fueron irradiados con rayos gamma. Para determinar los tiempos de irradiación y la uniformidad de irradiación, se utilizaron dosímetros de Fricke, los cuales se irradiaron por 4, 8 y 12 min, para luego medir su absorbancia en agua en un espectrofotómetro. Para calcular la DL50, se irradiaron rizomas y callos embriogénicos de *Alstroemeria* spp con dosis de 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120 Gy con el fin de evaluar la brotación en rizomas y germinación en callos embriogénicos durante un periodo de 8 semanas.

En rizomas, se observa que aplicaciones de rayos gamma reducen el número de brotes y dosis altas de radiación gamma producen mortalidad. Una dosis de 120 Gy produce la mortalidad total de los rizomas, mientras que 31,2 Gy produce la reducción del 50% de la brotación, siendo la dosis óptima de aplicación con fines de mejoramiento genético. En callos embriogénicos no se observó germinación en ninguno de los tratamientos, pero si disminución en el aumento de peso y oxidación de los explantes en todos los tratamientos irradiados en relación al tratamiento testigo. Es por esto, que los rizomas de *Alstroemeria* spp presenta mejores proyecciones para trabajos de mejoramiento genético utilizando mutagénesis que callos embriogénicos.

Palabras claves: Mutagénesis, rayos gamma, rizomas, callos embriogénicos.

## ABSTRACT

The induction of mutagenesis by the application of gamma rays is a technique widely used in the genetic improvement of ornamental species, due to the importance that generates the novelty in floriculture. In these crops, selection for relevant characteristics (flower color, plant size and flowers, among others) is relatively simple, which translates into a more efficient genetic improvement technique. In alstroemeria there are several varieties of mutagenesis with application of radiation, where the main variations that are sought are: change in the size and color of the flowers, shape and internal scoring of the tepals, plant vigor, productivity and period of flowering. Prior to irradiation for genetic improvement purposes, the exposure times of the material and the uniformity of radiation application must be calculated, known as chemical dosimetry. Along with this, a dose that produces a high percentage of mutations must be determined, while allowing the survival of a high number of explants, the dose where a 50% mortality (LD50) is produced, an optimal point for Irradiate for breeding purposes.

The objective of this study was to estimate the lethal dose 50 (LD50) using 2 explants of *Alstroemeria* spp which were irradiated with gamma rays. To determine the irradiation times and the uniformity of irradiation, Fricke dosimeters were used, which were irradiated for 4, 8 and 12 min, and then measured their absorbance in water in a spectrophotometer. To calculate the LD50, *Alstroemeria* spp. Rhizomes and embryogenic calli were irradiated at doses of 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 and 120 Gy in order to evaluate bud sprouting in rhizomes and germination in embryogenic callus during A period of 8 weeks.

In rhizomes, it is observed that gamma ray applications reduce the number of shoots and high doses of gamma radiation produce mortality. A dose of 120 Gy produces the total mortality of the rhizomes, while 31.2 Gy produces the 50% reduction of the bud, being the optimal dose of application for genetic improvement purposes. In embryogenic calli, no germination was observed in any of the treatments, but there was a decrease in the weight gain and oxidation of the explants in all treatments irradiated in relation to the control treatment. For this reason, the rhizomes of *Alstroemeria* spp have better projections for genetic improvement work using mutagenesis than embryogenic calli.

Keywords: Mutagenesis, gamma rays, rizhomes, embryogenic callus.

## INTRODUCCIÓN

El mejoramiento genético vegetal comienza 10.000 años antes de cristo durante la revolución neolítica, cuando los cazadores recolectores comienzan a volverse sedentarios y desarrollan la agricultura (Gepts, 2001). Esto conlleva a un aumento de rendimientos, basados en el uso de fertilizantes, maquinarias, agroquímicos y rotaciones, el cual no sería posible sin la generación de variedades adecuadas a las condiciones edafoclimáticas (Ahloowalia and Maluszynski, 2001).

En la actualidad, los métodos de mejoramiento genético son más sofisticados, dejando atrás la selección sencilla de poblaciones provenientes de variación natural y recombinación sexual, logrando crear variabilidad, seleccionar, evaluar y multiplicar los genotipos deseados (Green, 1986; Dribnenki 1996). En cultivos ornamentales, se han utilizado principalmente las siguientes técnicas: hibridación interespecífica e intergenérica (Wang *et al.*, 2009, Hao *et al.*, 2013, Deng *et al.*, 2011), poliploidización (Lu and Bridgen, 1997; Van Tuyl and Lim, 2003), mutagénesis (Schum, 2003; Aros *et al.*, 2012) y transgenia (Akutsu, 2004).

Durante la evolución de los cultivos, debido al enfoque de utilizar y generar sólo variedades elite, se ha ido perdiendo la diversidad genética. Debido a esta erosión genética es que emergen diferentes formas de inducir mutaciones e incrementar artificialmente la variabilidad (Smartt and Simmonds, 1995), como son la inducción de mutaciones Físicas, químicas y sitio específica (Datta, 1997; Jain and Spencer, 2006; Schiml *et al.*, 2016) y variación somaclonal (Larkin and Scowcroft, 1981). Dentro de las físicas destaca el uso de radiación, la que puede ser radiación ultravioleta (UV) y radiación ionizante: rayos X y gamma, partículas alfa y beta, protones y neutrones (Predieri 2001), los cuales actúan, principalmente, rompiendo el ADN nuclear, lo que provoca que, en el proceso de reparación, se induzcan nuevas mutaciones aleatorias y heredables. Los cambios pueden ocurrir también en organelos citoplasmáticos (Jain and Maluszynski, 2004).

De los agentes mutágenos físicos antes señalados, los más utilizados son los rayos gamma, los cuales presentan una longitud de onda menor que los rayos X lo que le da mayor energía por fotón. Estos se pueden obtener a partir de radioisótopos, siendo las principales fuentes de rayos gamma los isotopos  $\text{Co}^{60}$  y  $\text{Cs}^{137}$  (Medina *et al.*, 2005)

La aplicación de rayos gamma genera radicales libres, los que pueden dañar o modificar diferentes componentes celulares de las plantas, además de generar cambios en la morfología, anatomía, bioquímica y fisiología, dependiendo de la intensidad aplicada (Kóvacs and Keresztes, 2002; Kim *et al.*, 2004; Wi *et al.*, 2005). Además, por la radiolisis del agua se producen especies reactivas de oxígeno (ROS), como son los peróxidos de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), radicales hidroxilos, y oxígeno singlete (Luckey, 1980; Quintiliani, 1986; Miller and Miller, 1987; Rosenberg *et al.*, 2008; Dubner *et al.*, 1995; Kóvacs and Keresztes, 2002). Según Halliwell (2006), los ROS son metabolitos

normales en la planta bajo condiciones óptimas y no son citotóxicos, pero cuando las concentraciones aumentan, pueden ser letales para la planta. Es por esto que para un mismo genotipo se pueden encontrar distintos niveles de tolerancia a la aplicación de rayos gamma, en función de su estado de desarrollo, siendo los tejidos con mayor tasa de crecimiento los más susceptibles a daños por aplicación de radiación ionizante (Sparrow *et al.*, 1960). La respuesta de las plantas a la radiación está dada por factores biológicos y físicos. Dentro de los factores biológicos están: el número y tamaño de los cromosomas, el volumen nuclear, la cantidad de ADN por célula, la tasa de crecimiento durante la exposición y edad o segmento de la planta. Dentro de las físicas, se encuentran la tasa de dosificación de radiación, clase de radiación y temperatura (Sparrow *et al.*, 1960).

Respecto a los usos de las mutaciones en el mejoramiento genético, lo que se busca es mejorar variedades al alterar uno o más rasgos principales. Estos pueden ser: altura de plantas, resistencia de semillas a roturas, resistencia a enfermedades, entre otras, que ayudan a un aumento del rendimiento o darles valor agregado a las plantas ornamentales (Ahloowalia and Maluszynski, 2001). Muchos mutantes inducidos se han lanzado como variedades elite y otros se han utilizado como líneas parentales (Green, 1986; Dribnenki 1996).

Para obtener la dosis óptima de aplicación de radiación para realizar mejoramiento genético, es necesario estimar de la dosis letal media (DL50) (Cheema and Atta, 2003; Mohanjain, 2001), en donde se busca la dosis que produzca mortalidad del 50% de plántulas provenientes de los explantes irradiados. Las tasas de mutación son por lo general muy bajas (<1%) por lo que grandes poblaciones deben ser tratados para lograr resultados exitosos (Broertjes and Verboom 1974).

Además, existen metodologías para obtener los puntos óptimos de irradiación mediante una dosimetría biológica (Vral *et al.*, 2011) y la estimación de dosis reductiva (GR50) (González *et al.*, 2007) o la utilización de técnicas de inducción de mutagénesis, que tienen como finalidad, aumentos de rendimiento y adaptabilidad, apuntando a una modificación de genes cuantitativos a la irradiación recurrente mediante irradiaciones recurrentes (Vega, 1994), las cuales producen acumulación de variabilidad, tomando en cuenta que las poblaciones no se deterioren genéticamente en el proceso (Frydenberg and Sandfaer, 1965).

En relación a la aplicación de mutagénesis inducida en el mejoramiento genético de cultivos ornamentales, las características que se buscan generalmente son visibles, por lo que es muy simple seleccionar plantas mutadas en caracteres como: color, forma y tamaño. Respecto al mercado de variedades, los cultivos ornamentales tienen una característica muy particular: es líder en el número de variedades registradas a nivel mundial, llegando a ocupar un 47,9% del registro de variedades en Europa el año 2014 (CPVO, 2015) y cualquier carácter novedoso puede generar un valor agregado. Por lo tanto, la mutagénesis se ha convertido en una de las herramientas más utilizada para los cultivos ornamentales (Maluszynski *et al.*, 1995). Ejemplo de esto, son las variedades en plantas ornamentales mutantes desarrolladas, como, por ejemplo, achimenes, crisantemo, clavel, rosas y



streptocarpus, se obtuvieron mediante la irradiación de esquejes enraizados, hojas desprendidas, etc. (Broertjes, 1977).

Las técnicas de cultivo *in vitro* han mejorado la inducción de mutagénesis en varios aspectos, ya que ofrecen la posibilidad de elegir el material vegetal para el tratamiento (yemas, órganos, tejidos y células), lo que comparado con el cultivo *in vivo*, entrega mejores resultados, ya que puede disminuir el riesgo de obtener quimeras y aumenta la probabilidad de que las células mutadas expresen mutaciones en el fenotipo. Además, permite, a la vez, el manejo de grandes poblaciones y la selección y clonación de las variedades seleccionadas. Junto con esto, permite realizar en forma rápida los ciclos de propagación, separando los sectores mutados de los no mutados y permite un eficiente control fitosanitario (Ahloowalia, 1997; Predieri, 2001).

Dentro de las plantas ornamentales, el género *Alstroemeria* es uno de los principales en la industria de flores de corte (Kamminga, 2008). Este género pertenece a la familia de *Alstroemeriaceae* con más de 60 especies descritas, todas originarias de Sudamérica, donde Chile y Brasil son los principales centros de diversidad, corresponden a plantas herbáceas, perennes y rizomatosas de flores grandes, las cuales, en Chile, se desarrollan en amplios ambientes, desde bosques lluviosos hasta desiertos y desde la Cordillera de los Andes hasta la costa chilena (Bayer, 1987; Muñoz y Moreira, 2003)

En *alstroemeria*, el mejoramiento genético se centra principalmente en los siguientes parámetros: en color y tamaño de flores, forma y rayado interior de los tepalos, vigor de la planta, productividad y tiempo de floración (Broertjes and Verboom, 1974; Schum, 2003). Para esto, en el mejoramiento genético de este género se han utilizado principalmente técnicas de inducción de mutagénesis mediante la irradiación de rizomas con rayos X (Broertjes and Verboom, 1974) y rayos gamma (Przybyla, 1992; 2000, Aros *et al.*, 2012).

Las especies de *alstroemeria* comúnmente se propagan a través de la división de sus rizomas y es poco común mediante semillas, debido a la alta esterilidad que presentan y la variabilidad de sus ejemplares (Bond, 1991; Sanso and Xifreda, 2001). A pesar de esto, la división de los rizomas no resulta eficiente presentando una baja tasa y restricciones estacionales. Debido a esto es que se desarrollaron métodos de propagación *in vitro* los cuales han resuelto las limitaciones mencionadas (Lin *et al.*, 2000).

Se ha estimado la  $DL_{50}$  en rizomas de híbridos y mutantes de *alstroemeria* (Przybyla, 1998) y rizomas de *Alstroemeria aurea in vitro* (Aros *et al.*, 2012).

Otra forma de propagación son los callos embriogénicos. Esta técnica busca reducir los costos de propagación y aumentar la eficiencia en comparación a los rizomas (Cruz *et al.*, 2003). Los callos embriogénicos son un grupo de células no diferenciadas, se basan en la totipotencialidad de las células vegetales que pueden generar una planta completa o embriones somáticos a partir de cualquier célula vegetal, además de tener un desarrollo celular más rápido (Tapia, 2007).

La inducción de mutagénesis en callos tienen mejores resultados que en órganos con células bien organizados ya que las células de los callos tienen mayor chance de sobrevivencia, y si esto se suma a los sub cultivos sucesivos, se obtendrán mutantes sólidos debido a que el origen de estos vendrá a partir de un número de células restringido (Broertjes and Van Harten, 1978)

Si bien es cierto la irradiación de rizomas, esquejes y semillas está bastante descrita, el cálculo de DL50 en callos embriogénicos no se ha descrito anteriormente en cultivos ornamentales. Ejemplos de estudios en callos embriogénicos con aplicación de rayos gamma son: efectos sobre la regeneración de callos en rosa canina (Moallem *et al.*, 2013) y rudbeckia (Oates *et al.*, 2013), además en especies no ornamentales como son: papa dulce (Lee *et al.*, 2002), echinocereus (Hutabarat, 1986), ajo (Mostafa *et al.*, 2015), maíz (Moustafa *et al.*, 1989) y con fines de cálculo de DL50: maravilla (Omar *et al.*, 1993) y caña de azúcar (Suprasanna *et al.*, 2008) encontrándose ambos entre 20 y 30 Gy.

Considerando todo lo anterior, este estudio plantea la siguiente hipótesis:

**Hipótesis:** La radiación gamma aplicada a rizomas y callos de *Alstroemeria spp.* produce efectos sobre la brotación de rizomas y germinación de callos embriogénicos dependiendo de la dosis utilizada

### **Objetivo General**

Desarrollar un protocolo de aplicación de rayos gamma sobre *Alstroemeria spp.*, mediante el cálculo de DL50 para inducir mutaciones.

### **Objetivos específicos**

Desarrollar un sistema para lograr una aplicación de radiación gamma uniforme.

Realizar un cálculo de la Dosis Letal 50 (DL50) de acuerdo a dosis de radiación gamma sobre rizomas y callos de *Alstroemeria spp.*

Comparar ambos explantes para determinar cual es el que presentan mejores proyecciones para realizar mejoramiento genético mediante inducción de mutagénesis con aplicación de rayos gamma.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Lugar de estudio**

La presente memoria se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

La irradiación del material se llevó a cabo en el Laboratorio de Irradiaciones del Centro de Estudios Nucleares La Reina, de la Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN).

### **Material Vegetal**

El material vegetal que se utilizó, corresponde a rizomas y callos embriogénicos de *Alstroemeria* (CORUCH 13B08) provenientes de la cruce interespecífica entre los parentales C3 (madre) y UC05 (padre), ambos del Proyecto de Mejoramiento Genético de *Alstroemeria* de la Universidad de Chile.

### **Dosimetría química**

Se realizó una Dosimetría de Fricke (Fricke and Hart 1966), con el fin de comprobar la uniformidad de distribución y validar las dosis necesarias para la irradiación.

Para esto se utilizó un dosímetro de sulfato de fierro, que al ser expuesto a radiación se oxida pasando de ion férrico a ion ferroso, que, por norma, debe ser medido con un espectrofotómetro de precisión. Para esto, se utilizó un espectrofotómetro Lambda 35 (Perkin Elmer, Estados Unidos) que permite conocer la absorbancia de radiación en agua. Este dosímetro es muy sensible a las impurezas orgánicas, las cuales pueden generar una gran variación, es por esto que se le adiciona cloruro de sodio, que ayuda a evitar interferencias. Esta solución se lleva a ampollas de 10 ml, las cuales se ubican en la misma posición en la que se ubican los explantes al momento de irradiar (Figura 1).



**Figura 1.** Posición de los dosímetros en placas en que posteriormente se ubicaron los explantes irradiados.

El material se irradió por 5 minutos, con 3 repeticiones, donde se midió la absorbancia de cada una de las posiciones y de las repeticiones, para comprobar si la irradiación ocurría de forma uniforme en los 3 dosímetros.

Luego de comprobar la uniformidad, se validaron los tiempos de irradiación. Utilizando los dosímetros en las posiciones correspondientes, se irradió por 4, 8 y 12 minutos, con el fin de determinar la absorbancia en cada uno de los tiempos, lo que se traduce en una intensidad, con lo cual, se puede desarrollar un modelo lineal para estimar los tiempos de irradiación necesarios para obtener las dosis deseadas de radiación gamma. El dosímetro de Fricke solo mide entre 60 y 400 Gy, por lo que para las dosis menores a 60 Gy se debieron extrapolar los tiempos de exposición necesarios.

## Irradiación del material

Tanto los rizomas como callos de alstroemeria fueron irradiados en el irradiador Gammacell 220 R ( $\text{Co}^{60}$ ) (Nordion, Canadá) de la sección de alimentos y salud de la CCHEN. El material se irradió en placas Petri de 15 x 60 mm con 10 mL de un medio agar-agua con 2 explantes por placa. Estos se sometieron a 7 dosis de radiación (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120 Gy) (Cuadro 1) las cuales se estimaron a partir de la dosimetría química, con 3 repeticiones cada tratamiento. Se utilizaron rizomas que tuvieran un tamaño entre 0.5 y 1 cm y callos de 0.05g. En ambos casos se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado (DCA).

**Cuadro 1.** Dosis de radiación (Gy) aplicada a explantes de alstroemeria irradiados con rayos gamma.

Dosis (Gy)	Tratamientos
0	T0
15	T1
30	T2
45	T3
60	T4
75	T5
90	T6
105	T7
120	T8

## Cálculo de DL50

Para el cálculo de DL50, se buscó encontrar la dosis de radiación que lograra una disminución del 50% en la brotación de los rizomas y germinación de callos.

Los explantes ya irradiados se llevaron al Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad de Chile, en donde los rizomas se cambiaron a frascos de vidrio de 200 ml con 40 mL de medio de multiplicación, que consiste en:  $4,43 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de medio MS con vitaminas (Phytotechnology Laboratories) (Murashige and Skoog, 1962),  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 6-Bencilaminopurina (N6-Benciladenina, Phytotechnology Laboratories),  $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de agar (Poder de gelificación:  $1150 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , Phytotechnology Laboratories) y  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarosa (D-Sacarosa, Cristalina.  $\beta$ -D-Fructofuranosil- $\alpha$ -D-glucopiranosido azúcar, Phytotechnology Laboratories), ajustado el pH a 5,8 con NaOH al 1N. Los callos por su parte, fueron cambiado a placas de 15 x 60 con 10 ml de un medio MS60, el cual consta de  $4,43 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  medio MS con vitaminas (Murashige and Skoog, 1962),  $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  Agar y  $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarosa. Ambos explantes fueron llevados a la cámara de germinación, a una temperatura constante de  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  y con un fotoperiodo de 16 horas de luz.

## **Evaluaciones**

### **Rizomas**

Los rizomas se evaluaron durante 8 semanas, ya que los resultados de la investigación realizada por Vasquez (2016) concluyen que es el tiempo óptimo de desarrollo de rizomas *in vitro*, evaluándose la brotación cada 3 días. Una vez finalizado el ensayo, los rizomas que no mostraban ningún brote se consideraron como rizomas muertos.

Solo se consideraron dentro del conteo los brotes que permanecieron hasta el final de las 8 semanas, descartándose los que no perduraron (brotes muertos)

### **Callos embriogénicos**

Al igual que en rizomas, los callos se evaluaron cada 3 días, por un total de 8 semanas, para así, tener un punto de comparación entre ambos explantes, donde se buscó evaluar el número de brotes, a ojo desnudo, por cada callo. Además, se evaluó la ganancia de peso al final de las 8 semanas y la mortalidad de callos. Se consideró como callo muerto aquellos que no sumaron peso dentro de las 8 semanas.

## **Análisis estadístico**

El presente estudio contó con dos experimentos que se analizan de manera independiente, por un lado, está la dosimetría química y por otro la dosimetría física, ambos análisis estadísticos fueron realizados con el software estadístico INFOSTAT.

### **Dosimetría química**

Para determinar si la aplicación fue uniforme, se analizaron las desviaciones estándar de la absorción de radiación gamma en agua y así conocer la diferencia entre repeticiones, para luego, elaborar una regresión lineal con las absorbancias (Gy) en función del tiempo de exposición.

### **Dosimetría física**

### **Rizomas**

Para el cálculo de dosis letal 50 se utilizó un modelo lineal generalizado de respuesta binomial con factor respuesta logit, el cual es el modelo que se recomienda usar por la Universidad de California (UCLA, 2016). Este modelo está definido por  $\text{Logit}(Y) = \text{constant} + \text{coef} * X$ , donde X equivale a la dosis de radiación utilizada y logit equivale al

$\log(P/1-P)$ , siendo P la proporción de brotación en base al potencial de brotación de los rizomas, siendo en este caso nueve brotes el máximo presentado en rizomas. Las diferencias de tamaño de los rizomas no provocaron cambios significativos en la brotación, por lo tanto, no se utilizó como covariable.

Para el tiempo a brotación, se utilizó un ANDEVA y luego se graficó el aumento de brotes en función de la dosis de rayos gamma aplicada en la herramienta de apoyo estadístico EXCEL.

### **Callos embriogénicos**

En callos, solo se analizó estadísticamente el aumento de peso de los callos, para lo cual se utilizó una regresión exponencial que compara el aumento de peso en respuesta a la dosis aplicada en la herramienta de apoyo estadístico EXCEL.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Dosimetría química

La dosimetría química permitió conocer la uniformidad de aplicación, luego de aplicadas la radiación gamma a cada una de las 3 repeticiones. Se estandarizaron las absorbancias por la temperatura que presentan los dosímetros al momento de medirlos. Las desviaciones estándar fluctuaron entre  $\pm 0,488$  para la posición con menor variación y  $\pm 1,621$  para la posición con más variación (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Absorbancia de radiación en cada una de las posiciones en las que se ubicaron los dosímetros de Fricke luego de 5 minutos expuestos a irradiación gamma.

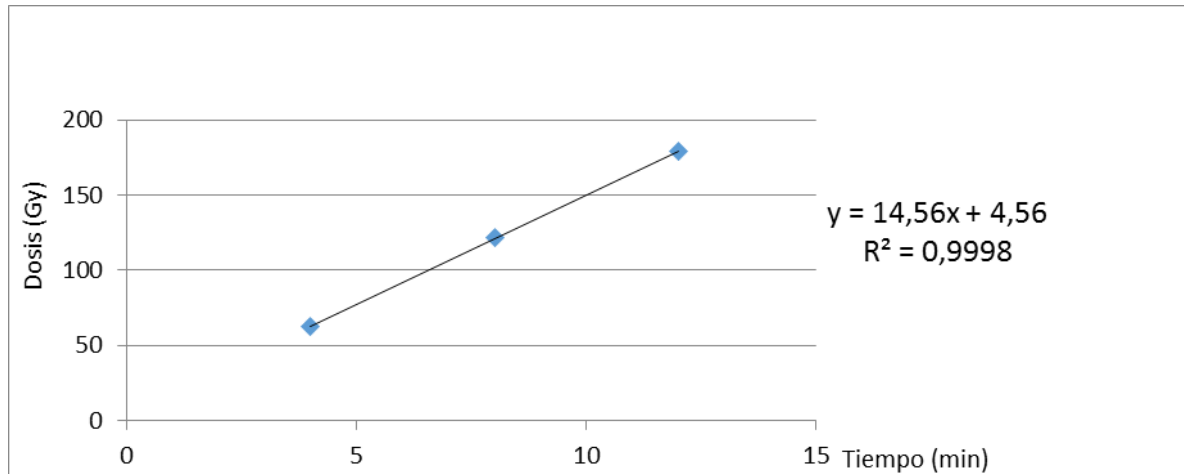
Dosis (Gy)	Unidades de Absorbancia	Gy	Desviación est. de la absorbancia
<b>Posición 1</b>	0,3487	52,75	0,488
	0,3522	53,73	
	0,3502	53,16	
<b>Posición 2</b>	0,3549	54,46	1,326
	0,3454	51,84	
	0,3489	52,86	
<b>Posición 3</b>	0,3594	55,72	1,621
	0,3512	53,45	
	0,3481	52,58	

Para aceptarse que una aplicación es uniforme, esta no debe exceder las 2 unidades de desviación estándar (ASTM, 2013), además, otro indicador de uniformidad de aplicación es el  $R^2$  (Figura 2) que mientras más alto sea el valor menos variación existe entre las absorbancias de un mismo tiempo de irradiación, obteniéndose alta uniformidad de aplicación al ser 0,9998 el valor  $R^2$ .

La uniformidad es una característica difícil de controlar, ya que al utilizar el irradiador, las variables que se pueden manejar son el tiempo en que se expondrá la muestra a la radiación, el recipiente en el cual se irradiará y la posición de los explantes (Tormo, 1977). El recipiente y el tiempo de exposición determinan la dosis absorbida, siendo la posición de los explantes la variable que se debe regular para alcanzar una mayor uniformidad.



Los tiempos de exposición determinados para alcanzar las dosis de radiación necesarias se desprenden a partir de la Figura 2, que nos permite interpolar dosis desde los 77 Gy hasta 179 Gy. Las dosis que sean menores a 77 Gy se extrapola utilizando la ecuación de la recta obtenida:  $Y=14,56X+4,56$ , siendo Y la dosis de radiación absorbida y X el tiempo de exposición. Al ser el  $R^2$  0,99, la dosis de radiación absorbida esta explicado mayormente por el tiempo de exposición, siendo en forma menor, afectado por el error.



**Figura 2.** Regresión lineal de dosis de radiación absorbida v/s tiempo de irradiación

Es importante previo a irradiar material realizar una dosimetría química para validar los tiempos de exposición necesarios para alcanzar una dosis de radiación requerida, ya que, los radioisótopos tienen una vida media, que se refiere al tiempo que tiene que transcurrir para que se desintegren la mitad de sus núcleos radioactivos (Ibarra, 2008). Esto conlleva a una pérdida sucesiva de la potencia del irradiador, lo que hace recomendable validar las dosis previamente a una irradiación.

## Irradiación del material

Una vez realizada la dosimetría química, se estimaron los tiempos necesarios para alcanzar las dosis deseadas (Cuadro 3).

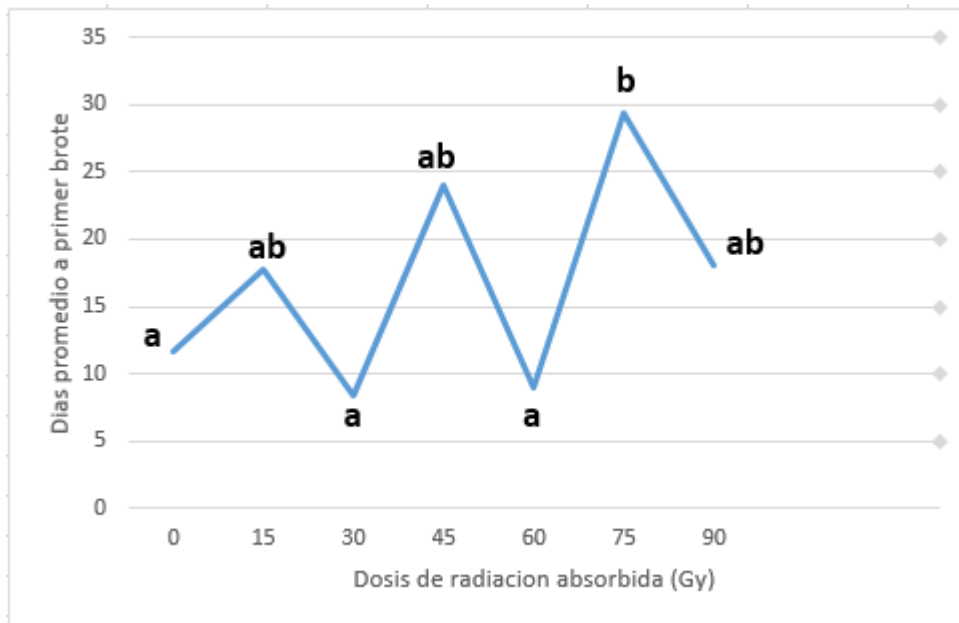
**Cuadro 3.** Tiempos de irradiación estimados.

Dosis (Gy)	Tiempo (min)
0	0,00
15	0,72
30	1,77
45	2,81
60	3,85
75	4,89
90	5,93
105	6,97
120	8,02

## Rizomas

### Tiempo a primer brote

Los rizomas ya irradiados, fueron observados cada 3 días durante 8 semanas registrando el tiempo que demoraron en comenzar a brotar (Figura 3). En general, se detectó una alta irregularidad en el tiempo al primer brote, siendo los tratamientos irradiados con 30 y 60 Gy los primeros en comenzar a brotar, demorando 9 días, pese a esto, solo muestran diferencia significativa con los rizomas irradiados con 75 Gy, los cuales comenzaron a brotar al cabo 30 días. Los tratamientos irradiados con 105 Gy solo lograron brotar un 33%, mientras que a los 120 Gy no se observó brotación.

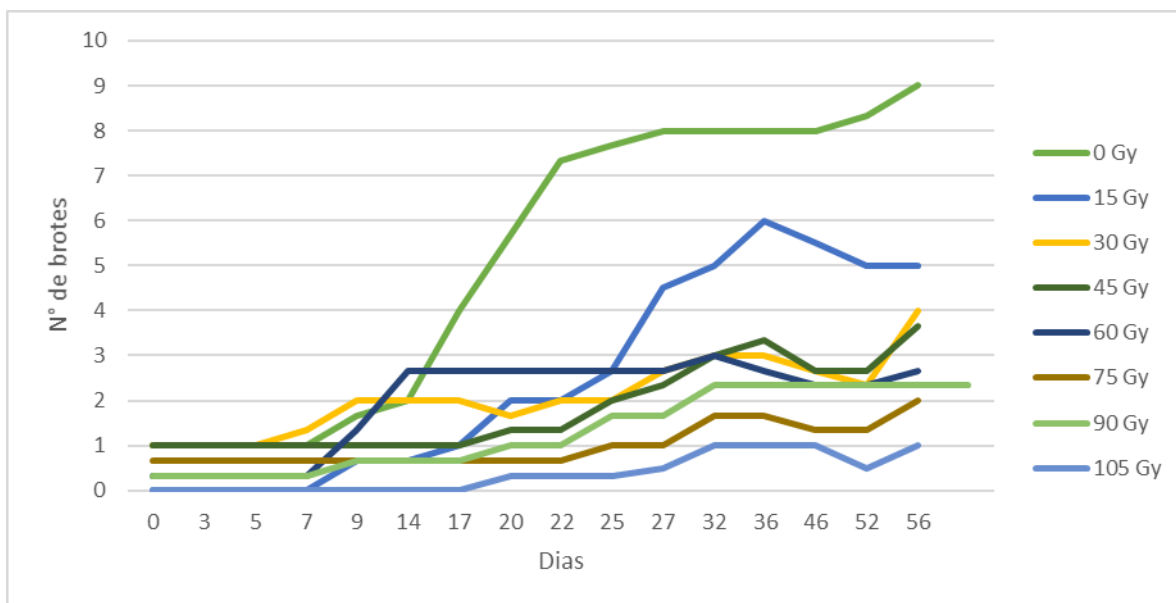


**Figura 3.** Días promedio que tardaron los rizomas en alcanzar el primer brote dependiendo de la dosis de irradiación de rayos gamma. Medias seguidas con la misma letra significa que no son diferentes según prueba de Duncan al 95% de significancia.

Existen antecedentes de que bajas dosis de radiación pueden generar hormesis, que es un aumento en la división celular, crecimiento y desarrollo en diversos organismos, incluidas las plantas (Luckey, 1980; Sagan, 1987), pero no definen lo que es una baja dosis de radiación, presentándose en amplios rangos. Watanabe *et al.* (2000) y Al-Safadi and Simon (1996) trabajando con semillas de *Arabidopsis* y zanahoria respectivamente, señalan que la velocidad de germinación aumenta debido al estrés que genera la radiación. A pesar de esto, no se puede asumir que este efecto ocurre producto de la hormesis o del estrés generado por la radiación, ya que la velocidad de germinación se mostró irregular y sin diferencias significativas entre tratamientos irradiados y no irradiados. A diferencia de esto, Aros *et al.* (2012) si obtuvo diferencias significativas al trabajar con rizomas de *Alstroemeria* irradiados *in vitro*, donde una intensidad hasta los 40 Gy aceleraba la velocidad de brotación de rizomas de *Alstroemeria aurea*.

### **Brotación Diaria**

En los días iniciales luego de la irradiación, no se observan diferencias significativas en la brotación entre tratamientos, sin embargo, a partir del día 14, se observa un aumento en la brotación del tratamiento testigo. El resto de los tratamientos se mantienen constante, hasta el día 25, donde el tratamiento irradiado con 15 Gy comienza a mostrar diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos irradiados (Figura 4).



**Figura 4.** Evolución diaria en la brotación de rizomas de *Alstroemeria* spp *in vitro* durante un periodo de 56 días desde la irradiación con rayos gamma.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Aros *et al.* (2012), en el cual a partir del día 14, observaron diferencias significativas en la brotación de rizomas entre el tratamiento testigo y los tratamientos con aplicación de rayos gamma.

La brotación a lo largo del tiempo aumenta en el tratamiento sin irradiación hasta llegar a un punto en que comienza a estabilizarse, pero no ocurre lo mismo en los tratamientos irradiados, los que sufren una disminución en el número de los brotes, ya que existen brotes los cuales debidos a efectos de la radiación producen especies reactivas de oxígeno (ROS), que, al paso del tiempo, terminan por causar toxicidad en los tejidos (Halliwell, 2006). Esto significa que los tratamientos irradiados son menos estables en el tiempo y pueden aumentar y disminuir el número de brotes constantemente, lo que se traduce en distintas  $DL_{50}$  a través del tiempo. Es por esto que, el tiempo que dure el ensayo debe estar relacionado con el tiempo que demoran los rizomas en alcanzar su óptimo desarrollo.

A pesar de no ser un parámetro que se consideró en las evaluaciones, se observa una mayor elongación de brotes en el tratamiento testigo en comparación a los tratamientos con aplicación de rayos gamma. Duron et Decourtye (1986) concluyeron que en dosis de radiación crecientes afectan la formación de brotes y la elongación de los mismos.

## Muerte de rizomas

Los rizomas que no brotaron en un periodo de 8 semanas se consideraron como muertos. A partir de los 105 Gy ocurrió una muerte parcial de rizomas, mientras que rizomas irradiados con 120 Gy mostraron una mortalidad total del material (Cuadro 4). Otro efecto que se observó es un aumento del tejido necrótico en los tratamientos irradiados en comparación con el testigo, lo cual comienza a hacerse visible a partir del día 7 desde que los rizomas fueron irradiados.

**Cuadro 4.** Porcentaje de mortalidad de los rizomas en base a la dosis absorbida de radiación gamma.

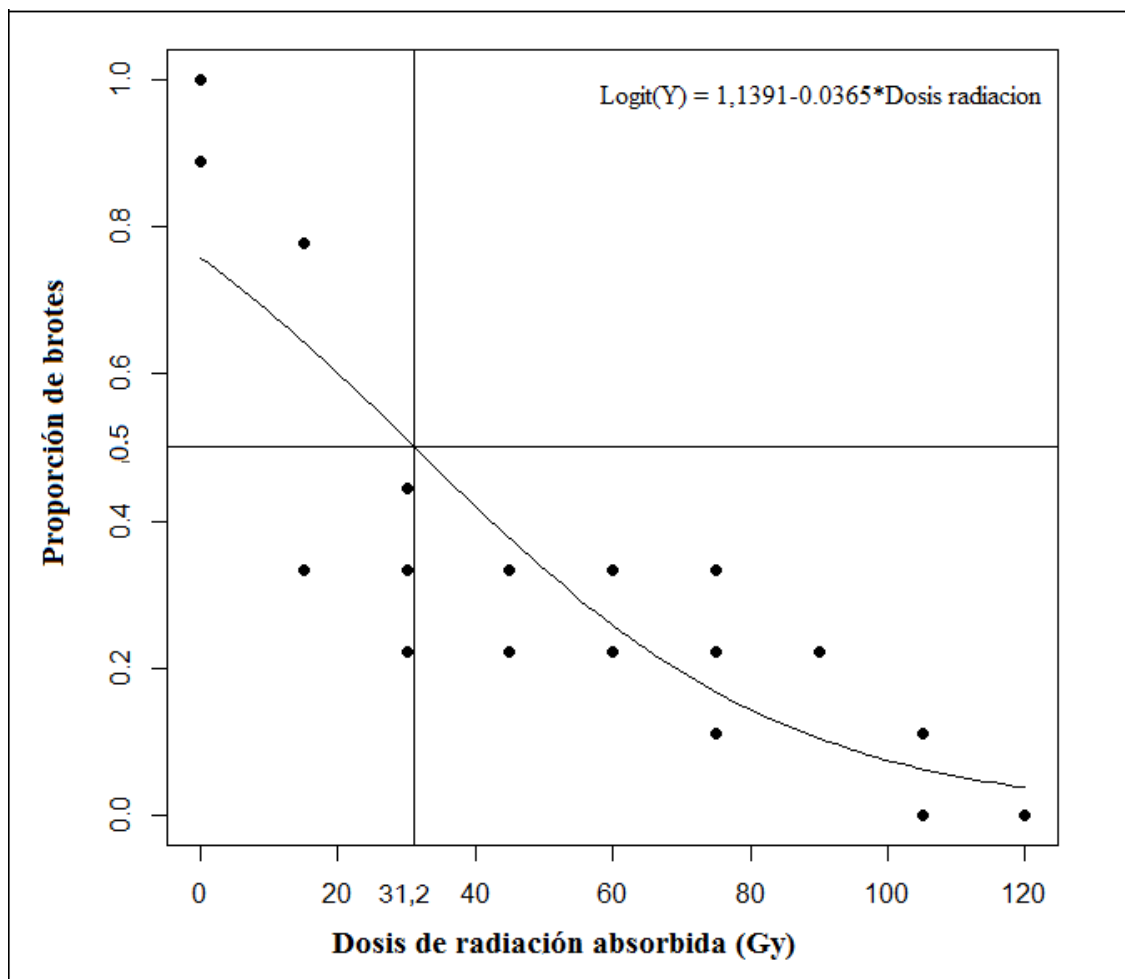
Dosis de radiación absorbida (Gy)	Porcentaje de mortalidad
0	0 a
15	0 a
30	0 a
45	0 a
60	0 a
75	0 a
90	0 a
105	66 b
120	100 c

Porcentaje seguidos con la misma letra significa que no son diferentes según prueba de Duncan al 95% de significancia

Bajos las condiciones en las que se desarrolla la investigación, se alcanzó una resistencia mayor a la radiación que lo señalado por Przybyla (1998) que trabajando con rizomas de híbridos y mutantes de *Alstroemeria* reportó mortalidad parcial de rizomas desde los 10 Gy y a los 50 Gy mortalidad total de los rizomas mientras que Aros *et al.* (2012) con rizomas *in vitro* de *Alstroemeria aurea* observaron que la mortalidad comienza desde los 2,5 Gy y a los 40 Gy alcanzó sobre el 50%. Esto es beneficioso para trabajos de inducción de mutagénesis, ya que permite reducir la mortalidad aplicando mayores dosis de radiación, lo que se traduce en aumentar la probabilidad de obtención de mutaciones (Broertjes and Verboom, 1974).

## Calculo de DL50

Se graficaron los datos obtenidos con el modelo descrito anteriormente, considerando la proporción de brotes de los rizomas de *Alstroemeria* en base a 9 brotes máximos por rizoma, obteniéndose, que una dosis de rayos gamma de 31,2 Gy produce una disminución en la brotación de un 50% en rizomas de *Alstroemeria* spp. (Figura 5). Considerando este resultado, la dosis óptimas de irradiación para trabajos de mejoramiento genético es de 31,2 Gy.



**Figura 5.** Estimación de DL50 utilizando un modelo lineal generalizado con estructura binomial y factor de respuesta logit.

Un aspecto importante a destacar es la utilización de este modelo, ya que, a pesar de ser el modelo recomendado para este tipo de análisis, en estudios anteriores de cálculo de dosis letal 50 para inducción de mutagénesis se ha utilizado comúnmente regresión lineal (Ángeles *et al.*, 2013; Berenschot *et al.*, 2008; Soontornchainaksaeng *et al.*, 2016) y otros autores mencionan rangos de dosis de radiación en los cuales se encuentra la dosis letal 50, sin utilizar modelos (Hernández, 2013; Santos-Perez, 2013; Aros *et al.*, 2012).

Por último, se utilizó este método de estimación de DL<sub>50</sub> para obtener la dosis óptima de aplicación de rayos gamma con fines de mejoramiento genético por sobre la reducción del 50% de peso, debido a que en rizomas *in vitro* cada brote se puede replicar en una planta independiente, por lo que cada yema cumple un rol similar al de una semilla, y la dosis letal 50 es un método que se utiliza principalmente en semillas, mientras el método de la reducción del 50% de crecimiento se utiliza principalmente en plántulas (Ángeles *et al.*, 2013). La dosimetría biológica no se utilizó al ser un método más complejo, que necesita de un nivel tecnológico más alto y mayor tiempo de investigación (Vral *et al.*, 2011).

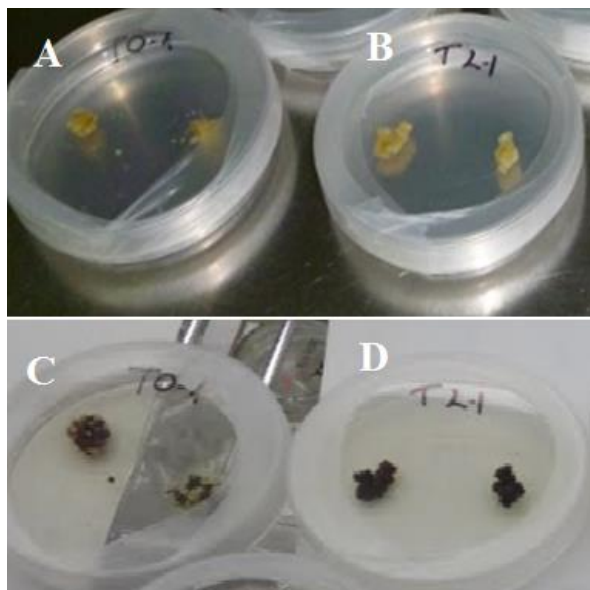
## Callos embriogénicos

A diferencia de los rizomas irradiados, en callos embriogénicos no se puede aceptar la hipótesis, ya que no se observó germinación en ninguno de los tratamientos, incluyendo el testigo.

Esto se debe principalmente a la falta de un medio de cultivo óptimo para la germinación de este genotipo, ya que los utilizados previo a este ensayo y en este ensayo no dieron resultado en la germinación. Aun así, se observan resultados en la oxidación y peso de los callos embriogénicos que se muestran a continuación.

### Oxidación de los explantes

Una semana después de irradiados los callos embriogénicos, se observó oxidación en todos los tratamientos incluido el testigo. Esto varía a las 4 semanas siendo el tratamiento testigo el único que regeneró en callo no oxidado, manteniéndose esta situación hasta el final de las 8 semanas. Las figuras 6.A y 6.B muestran callos embriogénicos sin irradiar e irradiados con 30 Gy respectivamente, previo a la irradiación, donde no se observó oxidación. La figura 6.C muestra callos embriogénicos del tratamiento testigo a las 8 semanas de irradiados en el cual se observó zonas las cuales no están oxidadas, esto difiere a la Figura 6.D donde toda la superficie del explante presentó oxidación.



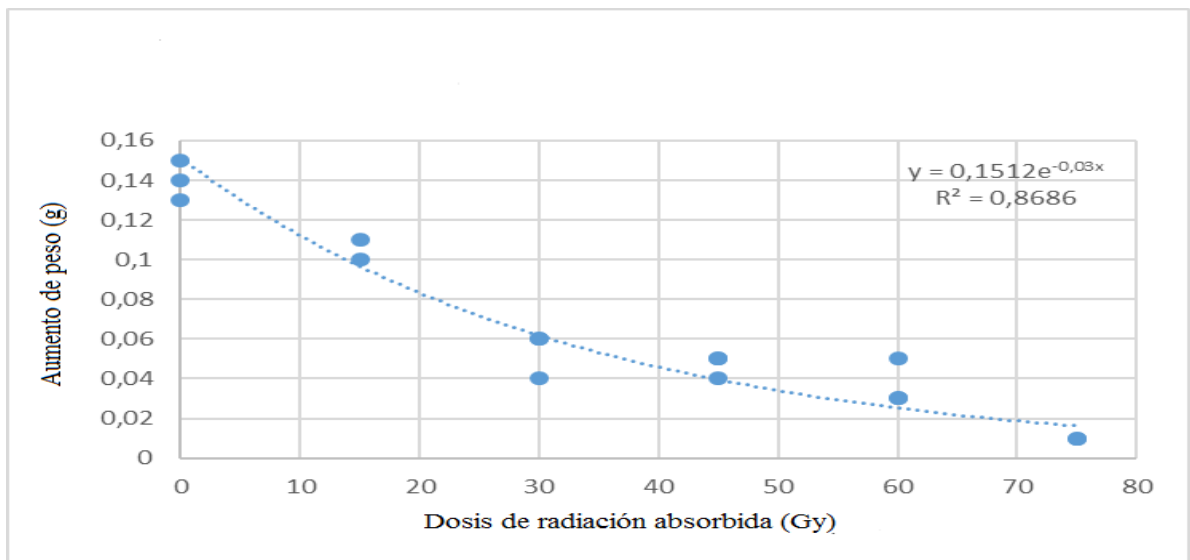
**Figura 6.** Callos embriogénicos de *Alstroemeria* spp sin irradiar (A) e irradiado con 30 Gy (B) previos a la irradiación. Callos embriogénicos sin irradiar (C) e irradiados con 30 Gy (D) pasadas 8 semanas de irradiado el material.

A pesar de que el tratamiento testigo no fue irradiado, este mostro oxidación al igual que los tratamientos irradiados, lo que indicaría la existencia de un factor adicional de la irradiación que genera oxidación. En este sentido, el medio de cultivo utilizado tenía  $60\text{g l}^{-1}$  de sacarosa, lo que es un valor elevado, ya que normalmente se utilizan medio que contienen entre  $20$  a  $30\text{g l}^{-1}$  de sacarosa. La sacarosa es el principal responsable del potencial osmótico en un medio de cultivo (Bhojwani and Razdan, 1986; Lara y Monter, 2002), este aumento del potencial osmótico es el que puede producir estrés oxidativo por la menor disposición de nutrientes presentes en el medio de cultivo para la planta (Jenks and Hasegawa 2008). Esto explicaría la oxidación a los pocos días de irradiados los callos en todos los tratamientos incluido el tratamiento sin irradiar.

Sin embargo, pasadas las 8 semanas, solo el tratamiento sin irradiar regenero en zonas que no presentan oxidación (Figura 6.C), mientras que todos los tratamientos irradiados, a pesar de presentar aumento de peso, regeneraron en callo oxidado (Figura 6.D), lo cual se puede explicar por lo expuesto por EL-Beltagi *et al* quienes concluyen en que un aumento en dosis de radiación aplicada en explantes, aumentan la producción de agentes oxidantes.

### Aumento de peso y muerte de callos embriogénicos

Pese a que todos los tratamientos aumentaron de peso, a medida que las dosis de radiación gamma aumentaron, el aumento de peso disminuyó de forma exponencial, hasta los 75 Gy, donde el aumento de peso no varía más de 0,01 g, por lo que se asume que a partir de esta dosis se presenta una mortalidad total en callos embriogénicos de este genotipo de alstroemeria. (Figura 7)



**Figura 7.** Aumento de peso de callos embriogénicos en función de la dosis de radiación gamma absorbida.



Algo similar observaron Bajaj (1970) y Lajonchere *et al.* (1995) trabajando con aplicaciones crecientes de rayos gamma sobre callos embriogénicos de poroto y pasto guinea, observaron una disminución en el aumento de peso hasta llegar a un punto que se produce la mortalidad de los callos. A pesar de ser especies que difieren de alstroemeria, se puede deducir de un efecto inhibitor de cualquier dosis de aplicación de rayos gamma sobre el aumento de peso en callos embriogénicos.

Por otro lado, si comparamos ambos explantes irradiados y la dosis de mortalidad, los rizomas presentan mayor resistencia a la radiación. Esto puede deberse en parte a la estructura de los callos, ya que son agrupaciones de células que se encuentran más expuestas en comparación a los meristemas de rizomas de alstroemeria (UNAD, 2016). Aun así, existe antecedentes que demuestran que la inducción de mutaciones con rayos gamma en callos embriogénicos responde de mejor manera que otros explantes (Broertjes & Van Harten, 1978).

Sin embargo, es necesario determinar el tipo de callo con el que se trabaja, debido a que, en una misma especie, pueden existir callos embriogénicos con distintas consistencias., como por ejemplo Ramirez *et al*, quienes describen 4 tipos de callos diferentes en banano. Esto puede variar la radio sensibilidad de callos embriogénicos, por lo que, en trabajos futuros, se debe conocer cuál es el tipo de callo que se utiliza.

## CONCLUSIONES

A partir de los datos obtenidos en la presente investigación, se puede concluir lo siguiente:

La hipótesis se acepta de forma parcial, ya que bajo las condiciones en las que se desarrolló la investigación, la radiación produce efectos en la brotación de rizomas de *Alstroemeria* spp. Sin embargo, no se puede aceptar o rechazar si existe efecto de la radiación en el número de brotes de callos embriogénicos en este genotipo.

La radiación gamma en cualquier dosis aplicada produce un efecto inhibitorio en el número de brotes de rizomas y en el peso de callos embriogénicos de *Alstroemeria* spp cultivados *in vitro*.

La radiación gamma provoca, dependiendo de la intensidad, mortalidad en los explantes de *Alstroemeria* spp. En rizomas, la mortalidad es total a partir de los 120 Gy, mientras que, en callos embriogénicos, a partir de los 75 Gy. Por lo tanto, los callos embriogénicos tienen mayor sensibilidad a la radiación gamma que los rizomas de *Alstroemeria* spp bajo estas condiciones experimentales.

La dosis letal 50 para futuras irradiaciones de rizomas de *Alstroemeria* spp con fines de mejoramiento genético es de 31,2 Gy. En callos embriogénicos no se obtuvo respuesta al no existir germinación en ninguno de sus tratamientos, incluido el testigo.

El mejor explante para trabajos de mejoramiento genético de *Alstroemeria* spp vía inducción de mutagénesis son los rizomas. Es necesario a futuro determinar un medio de germinación óptimo para callos embriogénicos, ya que es un explante promisorio y del que se pueden obtener resultados más eficientes mediante inducción de mutagénesis.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahloowalia, B. S., 1997. Improvement of horticultural plants through in vitro culture and induced mutations. *Acta Horticulturae*, 447: 545 – 550.
- Ahloowalia, B. S.; and Maluszynski, M. 2001. Induced mutations–A new paradigm in plant breeding. *Euphytica*, 118(2): 167-173.
- Akutsu M.; Ishizaki T. and Sato H. 2004. Transformation of the monocotyledonous *Alstroemeria* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* 22:8.
- Al-Safadi, B.; and Simon, P. 1996. Gamma irradiation-induced variation in carrots (*Daucus carota* L.). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121(4): 599-603.
- Ángeles, A.; Valencia, A.; Virgen, G; Ramírez, C.; Paredes, L. y Hurtado, S. 2013. Determinación de la dosis letal (DL50) con Co<sup>60</sup> en vitroplántulas de *Agave tequilana* var. Azul. *Rev. fitotec. Mex.* 36(4): 381-386
- Aros, D.; Olate, E.; Valdés, S. and Infante, R. 2012. Gamma irradiation on *Alstroemeria aurea* G. in vitro rhizomes: an approach to the appropriate dosage for breeding purposes. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo*, 44(1): 191-197.
- ASTM, E. 2013. Practice for using the fricke reference standard dosimetry system. Annual Book of ASTM Standards. ASTM International, West Conshohocken, PA, 1026-13.
- Bayer, E. 1987. Die gattung *Alstroemeria* in Chile. *Mitt. Bot. Staatssamml. Munchen* 24:1-326
- Bajaj, Y. 1970. Effect of gamma-irradiation on growth, RNA, protein, and nitrogen contents of bean callus cultures. *Annals of Botany*, 34(5): 1089-1096.
- Bhojwani, S. and Razdan, M. 1986. Plant tissue culture: theory and practice (Vol. 5). Springer. 309pp
- Berenschot, A.; Zucchi, M.; Tulmann-Neto, A. and Quecini, V. 2008. Mutagenesis in *Petunia x hybrida* Vilm. and isolation of a novel morphological mutant. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 20(2): 95-103.
- Bond, S. 1991. Control of rhizome growth in *Alstroemeria*. Thesis Doctor of Philosophy. University of Nottingham, Department of Agriculture and Horticulture. 145 pp

Broertjes, C. and Verboom, H. 1974. Mutation breeding of Alstroemeria. *Euphytica*, 23: 39-44.

Broertjes, C., 1977. Mutagen treatment and handling of treated material. In: Manual on Mutation Breeding. Second Edition, International Atomic Energy Agency, Tech Rep Ser No 119. Vienna, pp. 160–168

Broertjes, C and Van Harten, AM. 1978. Application of mutation breeding methods on the improvement of vegetatively propagated crops. Developments in crop science. The Netherlands Elsevier Publ 325p

Cheema, A. and Atta, B. M., 2003. Radiosensitivity studies in basmati rice. *Pakistan Journal of Botany* 35(2): 197-207.

CPVO (Community Plant Variety Office). Angers, Francia. 2015. CPVO Annual Statistics. 6p.

Cruz, I. G.; Angarita, A., y Mosquera, T. (2003). Inducción de embriogénesis somática en Alstroemeria spp. *Agronomía Colombiana*, 21(3), 121-128.

Datta SK (1997) Ornamental plants: role of mutation. Daya Publishing House, Delhi, India. 220p

Deng, Y.; Chen, S. and Chen, F. 2011. The embryo rescue derived intergeneric hybrid between chrysanthemum and Ajanía Przewalskii shows enhanced cold tolerance. *Plant Cell Report* 30: 2177-2186.

Dribnenki, J. C. P.; Green, A. G. and Atlin, G. N., 1996. Linola™ 989 low linolenic flax. *Canadian journal of plant science*, 76(2): 329-331.

Dubner, D.; Gisone, P.; Jaitovich, I., and Perez, M. 1995. Free radicals production and estimation of oxidative stress related to  $\gamma$  irradiation. *Biological trace element research*, 47(1-3): 265-270.

Duron, M. et Decourtye, L. 1986. Effets biologiques des rayons gamma appliqués à des plantes de Weigela co.«Bristol Ruby» cultivées in vitro. In *Nuclear techniques and in vitro culture for plant improvement. International symposium* pp. 103-111.

El-Beltagi, H.; Ahmed, O.; and El-Desouky, W. 2011. Effect of low doses  $\gamma$ -irradiation on oxidative stress and secondary metabolites production of rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) callus culture. *Radiation Physics and Chemistry*, 80(9): 968-976.

Fricke, H. and Hart, E. J. 1966. Chemical dosimetry. *Radiation dosimetry*, 2: 167-239.

Frydenberg, O. and J. Sandfaer. 1965. The vitality, productivity and radiosensitivity of recurrently irradiated barley populations. In: The use of induced mutations in plant breeding (Report of the FAO/IAEA. Technical Meeting. Roma, 1964). Pergamon Press, Oxford, pp. 175 - 183

Gepts, P. 2001. Origins of plant agriculture and major crop plants. Our fragile world: Challenges and opportunities for sustainable development. *Oxford: EOLSS Publishers*, 629-637.

Green, A., 1986. A mutant genotype of flax (*Linum usitatissimum*) containing very low levels of linolenic acid in its seed oil. *Can J Plant Sci* 66: 499–503.

González G.; Alemán M.; Garriga R. and De la Fe, C. 2007. Radio sensitivity to gamma rays ( $^{60}\text{Co}$ ) in shoot tips of henequen. *Biotec. Veg.* 7:115–117.

Halliwell, B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*, 141(2): 312-322.

Hao, Q.; Aoki, N., Katayama, J.; Kako, T.; Cheon, K.S.; Akazawa, Y. and Kobayashi, N. 2013. Crossability of American tree peony ‘High Noon’ as seed parent with Japanese cultivars to breed superior cultivars. *Euphytica* 191: 35-44.

Hernández, S. 2013. Inducción de mutaciones en heliconias por radiación recurrente con cobalto<sup>60</sup>. Tesis maestra en ciencias. Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas, Campus Montecillo, Montecillo, México. 77p

Hutabarat, D. 1986. Gamma-ray-induced effects on plant regeneration from callus in *Echinocereus* species (Cactaceae). In Nuclear techniques and in vitro culture for plant improvement.

Ibarra, J. R. M. 2008. La medición del tiempo. *Ingenierías*, 11(41):3.

Jain, S. and Maluszynski, M. 2004. Induced mutations and biotechnology in improving crops. *In vitro*, 170-202.

Jain, S.; Spencer, M. and Teixeira da Silva, J. 2006. Biotechnology and mutagenesis in improving ornamental plants. *Floriculture, ornamental and plant biotechnology*, 589-600.

Jenks, M. and Hasegawa, P. 2008. Plant abiotic stress. Blacwell Publishing. 270pp

Kamminga, H. 2008. Alstroemeria may be the new eye catcher. *FlowerTECH*, 11(4): 7-8.

Kim, J.; Baek, M.; Chung, B.; Wi, S.; and Kim, J. S. 2004. Alterations in the photosynthetic pigments and antioxidant machineries of red pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings from gamma-irradiated seeds. *Journal of Plant Biology*, 47(4): 314-321.

- Kovacs, E. and Keresztes, A. 2002. Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells. *Micron*, 33(2): 199-210.
- Lajonchere, G.; Mesa, A. and Prieto, M. 1995. Radiosensitivity curve with <sup>60</sup>Co in guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.) cv.'K-249'. *Pastos y Forrajes*. 18(1): 35-42.
- Lara, M., y Monter, A. 2002. Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación in vitro. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 25(2): 213-217.
- Larkin, A. and Scowcroft, w. 1981. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor. Appl. Gen.* 60:197-214
- Lee, Y.; Lee, I. and Lim, Y. 2002. Variations in sweetpotato regenerates from gamma-ray irradiated embryogenic callus. *J Plant Biotechnol*, 4: 163-170.
- Lin, H.; Van der Toorn, C.; Raemakers, K.; Visser, R.; De Jeu, M. and Jacobsen, E. 2000. Development of a plant regeneration system based on friable embryogenic callus in the ornamental *Alstroemeria*. *Plant Cell Reports*, 19(5):529-534.
- Lu, C. and Bridgen, M. 1997. Chromosome doubling and fertility study of *Alstroemeria aurea* x *A. caryophyllaea*. *Euphytica* 94: 75–81.
- Luckey, T. 1980. Hormesis with ionizing radiation. Boca Raton, FL: CRC press.,p. 122
- Maluszynski, M.; Ahloowalia B. and Sigurbjörnsson B., 1995. Application of in vivo and in vitro mutation techniques for crop improvement. *Euphytica*, 85: 303–315.
- Medina, F.; Amano, F. and dan Tano, S. (2005). Mutation Breeding Manual. Forum for Nuclear Cooperation in Asia (FNCA). 178p
- Miller, M. and Miller, W. 1987. Radiation hormesis in plants. *Health physics*, 52(5): 607-616.
- Moallem, S.; Behbahani, M. and Mousavi, E. S. 2013. Effect of gamma radiation on callus induction and regeneration of *Rosa canina* through in vitro. *Trakia Journal of Sciences*, 11(2): 158.
- Moustafa, R.; Duncan, D. and Widholm, J. 1989. The effect of gamma radiation and N-ethyl-N-nitrosourea on cultured maize callus growth and plant regeneration. *Plant cell, tissue and organ culture*, 17(2-3): 121-132.
- MohanJain, S. 2001. Major mutation-assisted plant breeding programs supported by FAO/IAEA. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82: 113-123.

- Mostafa, H.; Wang, H.; Shen, D.; Qiu, Y. and Li, X. 2015. Sprout differentiation and mutation induction of garlic (*Allium sativum* L.) callus exposed to gamma radiation. *Plant Growth Regulation*, 75(2): 465-471.
- Muñoz M. y A. Moreira. 2003. Alstroemerias de Chile: Diversidad, distribución y conservación. Santiago, Chile. Taller La Era. 140p.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cell cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Oates, K.; Touchell, D. and Ranney, T. 2013. Induced Variation in Tetraploid *Rudbeckia subtomentosa* ‘Henry Eilers’ Regenerated from Gamma-irradiated Callus. *HortScience*, 48(7): 831-834.
- Omar, M.; Yousif, D.; Al-Jlibouri, A.; Al-Rawi, M. and Hameed, M. 1993. Effects of gamma rays and sodium chloride on growth and cellular constituents of sunflower (*Helianthus annuus* L.) callus cultures. *Journal of Islamic Academic of Science*, 6(1): 69-72.
- Predieri, S. 2001. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 64: 185 - 210.
- Przybyla, A. (1992, May). Mutation breeding of Alstroemeria in Poland. In *VI International Symposium on Flower Bulbs* 325 (pp. 561-566).
- Przybyla, A. 1998. Mutation breeding of Alstroemeria in Poland. *Acta Horticulturae*, 325: 561-566.
- Przybyla, A. 2000. Mutagenesis in creation of new Alstroemeria genotypes. *Acta Horticulturae*, 508: 351-356
- Quintiliani, M. 1986. The oxygen effect in radiation inactivation of DNA and enzymes. *International Journal of Radiation Biology*, 50(4): 573-594.
- Ramírez, M.; de García, E., y Finol, H. 2006. Ultraestructura de callos embriogénicos y no embriogénicos de banano Williams. *Agronomía Trop*, 56(4): 615-620.
- Rosenberg, S.; DePinho, R. and Weinberg, R. 2008. Devita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: principles and practice of oncology. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 7817p.
- Sagan L. 1987. What is hormesis and why haven't we heard it before? *Health Phys* ,52:521–525.

Sanso, A. and Xifreda, C. 2001. Generic delimitation between *Alstroemeria* and *Bomarea* (Alstroemeriaceae). *Annals of Botany*, 88(6): 1057-1069.

Santos-Perez, U. 2013. Inducción de mutaciones foliares en *lisianthus (Eustoma grandiflorum)* utilizando agentes mutagénicos físicos y químicos. Tesis maestra en ciencias. Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas, Campus Montecillo, Montecillo, México. 90p

Schimpl, S.; Fauser, F. and Puchta, H. 2016. CRISPR/Cas-Mediated Site-Specific Mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* Using Cas9 Nucleases and Paired Nickases. *Chromosome and Genomic Engineering in Plants: Methods and Protocols*, 111-122.

Schum, A. 2003. Mutation breeding in ornamentals: an efficient breeding method, *Acta Horticulturae* (ISHS) 612: 47-60.

Smartt J. and Simmonds N. 1995 *Evolution of Crop Plants*, Longman Scientific and Technical, Harlow, UK; Wiley, New York, NY, USA, 2nd edition,.

Soontornchainaksaeng, P.; Jenjittikul, T.; Thammasiri, K. and Chuenboonngarm, N. 2016. In vitro mutagenesis using gamma irradiation in *Kaempferia rotunda* L. *Thai Journal of Botany* 8(1): 101-110

Sparrow, A.; Cuany, R.; Miksche, J. and Schairer, L. 1960. Some factors affecting the responses of plants to acute and chronic radiation exposures. In: IAEA (ed.) *Effects of ionizing radiation in seeds*. New York, United States of America. p. 289-320.

Suprasanna, P.; Rupali, C.; Desai, N. and Bapat, V. 2008. Partial desiccation augments plant regeneration from irradiated embryogenic cultures of sugarcane. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 92(1): 101-105.

Tapia, G. y Monroy, M. 2007. La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales in vitro. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, 32(10), 669-674.

Tormo, M. 1977. *Dosimetría química de la radiación: aplicación del sistema nitrato-nitrito*. Madrid, España. Madrid: Junta de Energía Nuclear.

UCLA, 2016, Statistical Consulting Group. Introduction to SAS. [En línea]. California, USA. Recuperado en <[http://www.ats.ucla.edu/stat/mult\\_pkg/faq/general/ld50.htm](http://www.ats.ucla.edu/stat/mult_pkg/faq/general/ld50.htm)> Consultado el: 22 de noviembre de 2016

UNAD, 2016, Lección 5.1.1 Callogénesis. [En línea]. Bogotá D.C, Colombia. Recuperado en <[http://datateca.unad.edu.co/contenidos/203024/2013/203024/leccin\\_511\\_callognesis.html](http://datateca.unad.edu.co/contenidos/203024/2013/203024/leccin_511_callognesis.html)> Consultado el: 29 de enero de 2017



Vásquez, M. 2016. Micropropagación de *Alstroemeria pallida Graham* a través de rizomas *in vitro*. Memoria Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronomicas, Santiago, Chile. 26p

Van Tuyl, J. and Lim, K. 2003. Interespecific hybridization and polyploidisation as tools in ornamental breeding. *Acta Horticulturae* 612: 13-22.

Vega, M. 1994. Evaluación de la radiación recurrente con gammas de  $^{60}\text{Co}$  sobre variables agronómicas de cebada maltera (*Hordeum vulgare* L.) en la generación  $R_2 M_1$ . Tesis Ingeniero Agrónomo Fitotecnista. Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Ciencias Agrícolas, México. 78p

Vral, A.; Fenech, M. and Thierens, H. 2011. The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure. *Mutagenesis*, 26(1), 11-17.

Wang, J.; Huang, L. and Bao, M. 2009. Production of interspecific hybrids between *Lilium longiflorum* and *L. loophorum* var. *linearifolium* via ovule culture at early stage. *Euphytica* 167: 45-55.

Watanabe Y; Yukawa M; Kim HS. and Nishimura Y. 2000. Radiation effects on growth and seed germination of arabidopsis. Annual Report 1999–2000. National Institute of Radiological Sciences, Anagawa, Chiba-shi, Japan

Wi, S. G.; Chung, B.; Kim, J.; Baek, M.; Yang, D.; Lee, J.; and Kim, J. 2005. Ultrastructural changes of cell organelles in *Arabidopsis* stems after gamma irradiation. *Journal of Plant Biology*, 48(2): 195-200.

Wi, S.; Chung, B.; Kim, J.; Kim, J.; Baek, M.; Lee, J. and Kim, Y. S. 2007. Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants. *Micron*, 38(6): 553-564.