



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE AGRONOMÍA

MEMORIA DE TÍTULO

**EFFECTO DE LA RADIACIÓN GAMMA SOBRE BROTES DE CIRUELO
EUROPEO (*Prunus domestica* L.) VAR D'AGEN CULTIVADOS IN VITRO.**

LORENA ANDREA PEÑA PALOMINOS

SANTIAGO – CHILE
2006

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**EFECTO DE LA RADIACIÓN GAMMA SOBRE BROTES DE CIRUELO EUROPEO
(*Prunus domestica* L.) VAR D'AGEN CULTIVADOS IN VITRO.**

Memoria para optar al Título
Profesional de Ingeniero Agrónomo
Mención: Fruticultura.

LORENA ANDREA PEÑA PALOMINOS

PROFESOR GUÍA

Sr. Rodrigo Infante E.
Ingeniero Agrónomo. Dr.

Calificaciones

6,8

PROFESORES CONSEJEROS

Sra. Loreto Cánaves S.
Ingeniero Agrónomo. M.S.

6,2

Sr. Ricardo Pertuzé C.
Ingeniero Agrónomo. Ph. D.

6,7

Santiago, Chile.

A Viviana Palominos

AGRADECIMIENTOS

- A mi profesor guía, Ingeniero Agrónomo Dr. Rodrigo Infante por la confianza y libertad, entregadas durante el desarrollo de esta memoria.
- A los profesores consejeros, Ingeniero Agrónomo Ph D. Ricardo Pertuzé e Ingeniero Agrónomo M.S. Loreto Cánaves.
- Al Laboratorio de Certificación y Mejoramiento Frutal, en especial a Mauricio Estrada por su buena voluntad.
- Al Laboratorio de Genética Vegetal, en especial a Paula Troncoso por su ayuda y buena disposición.
- Al Ingeniero Agrónomo Miguel D'Angelo e Ingeniero Agrónomo Mg. Sc. Gabino Reginato por la ayuda entregada a lo largo de esta memoria.
- A mi madre, Viviana Palominos, por su infinito amor, confianza y apoyo sin límites entregados a lo largo de mi vida.
- A mi novio, Mauricio Domange, por el apoyo, confianza y compañía entregados en cada momento y especialmente por su inmenso amor.
- A mi hermano Felipe por su amor, alegría y apoyo entregados en todo momento.
- A mi amiga Constanza Riquelme por todo el apoyo, compañía y ayuda entregados durante los años de universidad y especialmente durante cada día del desarrollo de esta memoria.
- A mis amigas Graciela Valdés y Nancy Soto por su compañía a lo largo de los años de universidad.

TABLA DE CONTENIDOS

	Páginas
RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIALES Y MÉTODO	6
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8
Tasa de proliferación	8
Reducción del crecimiento total	10
Largo total de brotes	11
Mortalidad de brotes	13
Enraizamiento de los brotes	15
CONCLUSIONES	16
BIBLIOGRAFÍA	17

RESUMEN

La mutagénesis gamma (γ) es un método de mejora genética que ha sido utilizada ampliamente en especies frutales con el objetivo de mejorar algunas características de una variedad consolidada sin alterar la mayoría de los caracteres que son de interés para la industria frutícola. Los caracteres que normalmente se busca mejorar son: el tamaño de la planta, la época de floración y cosecha, el color de la epidermis, la resistencia a patógenos y la auto compatibilidad. El objetivo de esta investigación es determinar el efecto de distintas dosis de radiación γ sobre brotes cultivados in vitro de ciruelo europeo (*Prunus domestica* L.) var. D'Agen.

Brotes de ciruelo europeo (*Prunus domestica* L.) var. D'Agen cultivados in vitro fueron irradiados con rayos γ en dosis de 0, 5, 10, 20, 30 y 40 Gy ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J Kg}^{-1} = 100 \text{ rad}$) con el propósito de evaluar los efectos directos sobre los brotes. A los 14 y 28 días post tratamiento se realizó un subcultivo y se evaluó la tasa de proliferación y la reducción del crecimiento total. A los 14, 28 y 56 días post tratamiento se determinó el largo total de los brotes y la mortalidad. Finalmente el día 98 post tratamiento se evaluó el porcentaje de enraizamiento de los brotes. también se determinó la dosis letal 50.

Todas las dosis de radiación γ causaron muerte sobre los brotes, siendo mayor el número de brotes muertos en las dosis superiores. Lo mismo ocurrió con la reducción del crecimiento, donde la dosis de 40 Gy causó un 50% de disminución del crecimiento, sin embargo, el efecto de la radiación fue mayor en la mortalidad de los brotes, en la cual el 50% de mortalidad ocurrió con una dosis superior a 30 Gy. La tasa de proliferación también disminuyó a mayor intensidad de radiación y a partir del segundo subcultivo se observó una disminución en todos los tratamientos, atribuible al envejecimiento natural de los brotes. Finalmente, el porcentaje de enraizamiento disminuyó con las dosis mayores de radiación.

Palabras clave: Radiosensibilidad, radiación gamma, inducción de mutaciones, mutagénesis, frutales.

SUMMARY

Gamma mutagenesis is breeding method that had being used widely on fruit species in order to change few traits in consolidated cultivars maintaining unchanged most of the traits that are important to the fruit industry. Traits that are usually been improved by this means are: plant size, blooming and harvest time, skin color, pathogen resistance and self-fertility. Our research goal is determine the effect of different γ radiation doses on european plum shoots cultivated in vitro (*Prunus domestica* L.) “D`Agen”.

In vitro cultured shoots were irradiated with 0, 5, 10 20, 30 and 40 Gy (1 Gy = 1 J Kg⁻¹ =100 rad) of γ rays with the purpose of evaluate the direct effects of mutagen on shoot growth. Shoots were subcultured after 14 and 28 days post treatment and proliferation rate and growth reduction were evaluated. The total shoot length and mortality were determined at 14, 28, 56 days post treatment. Finally at 98 days post treatment the shoot rooting percentage was evaluated. The lethal dose 50 was also determined.

All γ radiation doses were lethal to plant tissues, being greater the effect when higher doses were applied. The same effect was observed with the growth reduction, where the dose of 40 Gy caused a 50% growth decrease, however, the radiation effect was greater in shoot mortality, where 50% of the mortality happened with those doses higher than 30 gy. The proliferation rate decreased with higher radiation intensity too and starting from the second subculture a decrease was observed in all the treatments, what was attributed to natural shoot aging. Finally, the rooting percentage decreased with higher radiation doses.

Key words: Radiosensitivity, gamma radiation, mutation induction, mutagenesis, fruit trees.

INTRODUCCIÓN

El ciruelo europeo (*Prunus domestica* L.) var D' Agen presenta un hábito de crecimiento globoso con brotes vigorosos y erectos y alta producción. El fruto es de calibre medio, la pulpa es de color amarillo verdoso, ligeramente adherida al carozo, se utiliza principalmente en agroindustria (Chaney, 1981). A pesar de ser una variedad consolidada, sería valioso mejorar algunos atributos como el excesivo vigor, la susceptibilidad al cáncer bacterial, la producción alternada, la fecha de cosecha y el tamaño del fruto.

La mutagénesis es un método de mejoramiento genético que ha sido usada para alterar el tamaño de la planta, la época de floración y cosecha, el color de la fruta, la resistencia a patógenos y la auto compatibilidad (Quinlan y Tobutt, 1990; Fereol *et al.*, 1996; Predieri, 2001). Las mutaciones inducidas pueden cambiar una o pocas características específicas de una variedad, pudiendo contribuir al mejoramiento genético, sin perturbar ninguno de los requerimientos de la industria frutícola y consumidores (Predieri, 2001).

El éxito de la mutagénesis depende del genotipo, de los métodos que se utilicen para inducirlos, y de las características que se busca alterar (Brunner y Keppl, 1991). La radiación ha sido el método más usado para inducir mutaciones en frutales (Lapins, 1973), con el fin de obtener plantas con características nuevas y útiles (Predieri *et al.*, 1997). Los tipos de radiación potencialmente disponibles para mutagénesis son radiación ultravioleta (UV) y radiación ionizante (rayos X, y γ , partículas alfa y beta, protones y neutrones). Los rayos X y rayos γ han sido los tipos de radiación ionizante más efectivos y más utilizados para el mejoramiento genético frutal porque penetran profundamente en los tejidos e inducen diferentes cambios (Predieri, 2001).

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales puede ayudar a mejorar en forma efectiva la inducción de mutaciones en varios aspectos. Ofrece la posibilidad de elegir el material vegetal para el tratamiento (yemas axilares, órganos, tejidos y células), lo que es más adecuado comparado con un tratamiento *in vivo*, ya que se disminuye el riesgo de obtener quimeras y hay una alta posibilidad de que las células mutadas expresen la mutación en el fenotipo. El cultivo *in vitro* de tejidos también permite el manejo de grandes poblaciones y la selección y clonación de las variantes seleccionadas. Además, ofrece la posibilidad de realizar en forma rápida los ciclos de propagación con el propósito de separar los sectores mutados de los no mutados del tejido tratado, y permite un control de las condiciones fitosanitarias durante todo el proceso (Predieri, 2001; Ahloowalia, 1997).

Uno de los primeros pasos en tratamientos mutágenos es la estimación de la dosis más apropiada a aplicar, medida en Gy (Gray), equivalente a 1 J Kg^{-1} , o bien a 100 rad. El procedimiento para fijar la dosis apropiada está basado en la radiosensibilidad del tejido,

la cual es estimada a través de la respuesta fisiológica del material irradiado. Se debe determinar la dosis que causa un 50% de reducción del crecimiento vegetativo del material tratado (DL_{50}) cuando es comparado al testigo en el primer ciclo vegetativo después del tratamiento (Predieri, 2001).

La respuesta de las plantas a la radiación está dada por factores biológicos y físicos. Los factores biológicos son el número y tamaño de los cromosomas, el volumen nuclear, cantidad de DNA por célula, tasa de crecimiento durante la exposición y edad de la planta o segmento expuesto. Los factores físicos son la tasa de dosificación de la radiación, clase de radiación y la temperatura (Sparrow *et al.*, 1960).

La radiosensibilidad varía con la especie y la variedad, con la condición fisiológica de la planta y órganos y con la manipulación del material irradiado antes y después del tratamiento mutagénico (Briggs y Constantin, 1977). Correlaciones entre el estado fisiológico de las plantas y su radiosensibilidad son, a menudo, determinadas por el contenido de agua del tejido (Predieri, 2001).

Mutagénesis en especies frutales

Actualmente, el número de variedades frutales derivadas de mutaciones inducidas comprende alrededor de 50, pertenecientes a más de 20 especies (Maluszynski *et al.*, 1995; Predieri, 2001).

En manzanos Golden Delicious, yemas irradiadas con 40 y 50 Gy generaron genotipos potencialmente útiles, relacionadas al vigor de los brotes, tipo de crecimiento, tamaño y calidad del fruto. El clon Golden Haidegg fue seleccionado por una mejor capacidad de almacenamiento en frío y fruto sin *russet*, con valores más altos de aroma, azúcar y acidez (Brunner y Keppl, 1991).

En seis variedades de peral, irradiadas con 3,5 Gy de rayos γ , se observaron variantes con mayor porcentaje de *russet*, menor tamaño y cambio de la forma en algunos frutos y un retraso en la floración (Predieri y Zimmerman, 2001).

En paltos sometidos a 25 Gy de radiación γ , se encontró algunas selecciones que presentaron una reducción del crecimiento, aumento en la densidad de floración y en el número promedio de frutos (Rubí *et al.*, 1995).

En el patrón de cerezo Mazzard F12/1, la radiosensibilidad a rayos X en ápices y parte basal de brotes cultivados *in vitro*, se encontró en 22 y 29 Gy respectivamente, indicando que factores fisiológicos pueden inducir diferencias, incluso entre las yemas axilares en un mismo brote (Walter y Sauer, 1985). Estos resultados son similares a los

encontrados en brotes de peral igualmente tratados con rayos X (Predieri *et al.*, 1986. Citado por Predieri y Gatti, 2000).

En ciruelo japonés var. Shiro se evaluó la radiosensibilidad γ de pequeños brotes cultivados in vitro. Las dosis usadas fueron 0; 10; 20; 30 y 40 Gy. La mortalidad y la tasa de proliferación disminuyeron en un 55% con 30 Gy. La capacidad de enraizamiento disminuyó con las dosis más alta de radiación. En campo se observaron variantes para entrenudos cortos y color de la fruta en los árboles irradiados con 30 y 40 Gy (Predieri y Gatti, 2000).

En ciruelo D'Agen (D'Ente), se irradiaron brotes con radiación γ *in vivo* en dosis que variaron entre 4 y 80 Gy. Los brotes irradiados fueron injertados sobre Marianna GF 8-1. Con respecto al crecimiento se observaron mutantes con muy poco vigor. Para el aspecto y tamaño del árbol se observaron mutantes tipo *spur*, mutantes de floración y maduración anticipada, retrasada y mayor contenido de azúcares. (Renaud *et al.*, 1978).

Hipótesis

La radiación γ aplicada a brotes in vitro de ciruelo europeo (*Prunus domestica* L.) var. D'Agen produce efectos sobre el desarrollo y crecimiento, dependiendo de las dosis utilizadas.

Objetivo general

Determinar el efecto de distintas dosis de radiación γ sobre brotes cultivados in vitro de ciruelo europeo (*Prunus domestica* L.) var. D'Agen.

MATERIALES Y MÉTODO

Materiales

Se utilizaron 240 brotes de ciruelo europeo (*Prunus domestica* L.) var. D'Agén cultivados in vitro en fase de proliferación, mantenidos en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con 2,2 μM de bencil amino purina (BAP), 0,9 μM de ácido indol butírico (IBA), 0,3 μM de ácido giberélico (GA_3), 25 g L^{-1} de sacarosa y 6 g L^{-1} de agar. El pH fue ajustado a 5,6. Los brotes fueron irradiados en la Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN) y las mediciones se realizaron en el Laboratorio de Certificación y Mejoramiento Frutal de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Tratamientos y diseño del ensayo

El diseño experimental fue completamente aleatorizado, con 6 tratamientos correspondientes a las dosis: 0; 5; 10; 20; 30 y 40 Gy de radiación γ y cada tratamiento estaba compuesto por 4 repeticiones y cada repetición con 10 brotes.

Método

Los brotes fueron mantenidos en una cámara de crecimiento a 24 °C con un fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad, en frascos de 250 mL de capacidad, con 30 mL de un medio MS (Murashige y Skoog, 1962). Se subcultivaron cada 15 días, hasta obtener el número de brotes necesarios para realizar el tratamiento mutagénico.

Una vez obtenido el número de brotes adecuado para el ensayo, a cada frasco se agregó 5 mL de un medio de cultivo líquido MS (Murashige y Skoog, 1962) con 0,3 μM de GA_3 , manteniéndose por 15 días. Cuando los brotes alcanzaron de 2 a 3 cm de largo, se dispusieron en el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) y fueron irradiados con rayos γ en las dosis anteriormente señaladas. Como fuente de radiación se utilizó Co^{60} .

Luego del tratamiento, los brotes irradiados fueron llevados a la cámara de crecimiento y mantenidos en medio de proliferación MS (Murashige y Skoog, 1962) por 14 días. Se realizaron dos subcultivos, a los 14 y a los 28 días. A los 56 días, los brotes individuales se transfirieron a un medio de cultivo sólido MS (Murashige y Skoog, 1962) con 0,3 μM de GA_3 , 0,04 μM de BAP y 0,07 μM de IBA, con el propósito de elongarlos. A los 77 días post tratamiento los brotes fueron inducidos a enraizar en un medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) enriquecido con 0,5 μM de IBA.

A los 14 y 28 días post tratamiento se evaluó la tasa de proliferación (brotes/brote original); la reducción del crecimiento total (tasa proliferación de brotes irradiados/tasa de proliferación de brotes testigos).

A los 14, 28 y 56 días post tratamiento se evaluó el largo total de brotes (sumatoria del largo de cada brote obtenido a partir de un brote original) y la mortalidad de los brotes, considerando el número de brotes muertos sobre el total de brotes vivos al momento de cada evaluación.

A los 98 días post tratamiento se evaluó el enraizamiento, medido como el número de brotes que desarrollaron raíces adventicias sobre el total de brotes vivos en cada tratamiento.

Análisis estadístico

Los resultados se sometieron a análisis de varianza y la separación de las medias se realizó con la prueba de comparación múltiple SNK al 5 %.

El porcentaje de enraizamiento se transformó previamente a grados Bliss, de acuerdo a la fórmula $\text{arcsen}\sqrt{\%}$.

Se realizaron regresiones entre las dosis de radiación (variable independiente) y las variables que se midieron en el ensayo. También se realizó un análisis de correlación entre las variables.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tasa de proliferación

El día 14 post tratamiento, en el primer subcultivo (Figura 1), la proliferación de los brotes tratados con 5 y 10 Gy no presentaron diferencias con el control no irradiado, mientras que el tratamiento de 20 Gy presentó una reducción significativa intermedia y los tratamientos con 30 y 40 Gy mostraron una disminución significativa respecto del resto de los tratamientos, presentando una disminución de 42% y 50% respectivamente comparado con el testigo (Cuadro 1). Esto coincide con lo señalado por Predieri y Gatti (2000), donde brotes de ciruelo japonés “Shiro” irradiados con 30 y 40 Gy presentaron la mayor disminución en la tasa de proliferación, lo mismo ocurrió en brotes de banano irradiados con 35 y 45 Gy, en los cuales la tasa de proliferación disminuyó en un 46% y 56% con respecto al control (Mak Chai *et al.*, 2001; Novak *et al.*, 1985).



A



B

Figura 1. Proliferación de brotes de *Prunus domestica* var. D'Agén cultivados in vitro el día 14 (A) y 28 (B) post tratamiento con 0; 5; 10; 20; 30 y 40 Gy de radiación γ (de izquierda a derecha).

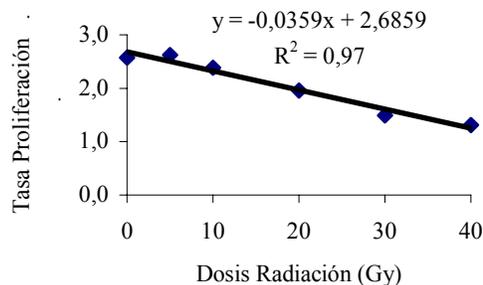
El día 28 post tratamiento, en el segundo subcultivo (Figura 1) no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 1). Sin embargo, entre 0 y 20 Gy se observó una disminución en la tasa de proliferación respecto del subcultivo realizado el día 14, lo que ya había sido observado por Predieri y Gatti (2000), quienes atribuyen este resultado a un envejecimiento natural de los brotes.

Cuadro 1. Tasa de Proliferación (brotes/brote original) de *Prunus domestica* L var. D'Agén cultivado in vitro, luego del tratamiento con rayos γ .

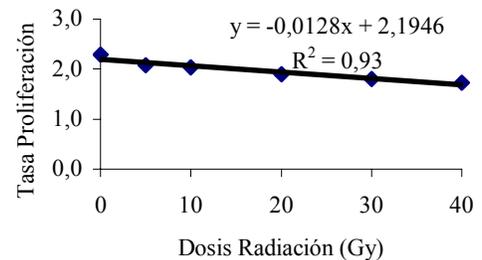
Dosis Radiación (Gy)	Día 14	Día 28
0	2,6 a	2,3 a
5	2,6 a	2,1 a
10	2,4 a	2,0 a
20	2,0 b	1,9 a
30	1,5 c	1,8 a
40	1,3 c	1,7 a

Medias seguidas por letras diferentes en una misma fecha difieren significativamente con $P \leq 0.05$ según la prueba SNK.

A los 14 y 28 días post tratamiento, la tasa de proliferación se presentó muy relacionada a la dosis de radiación γ , con un $R^2 = 0,97$, para el día 14; y 0,93 para el día 28 (Figura 2). El día 28 es posible apreciar una dilución del efecto de la radiación sobre la tasa de proliferación de los brotes con respecto al día 14.



A



B

Figuras 2. Relación entre dosis de radiación γ y tasa de proliferación evaluada el día 14 (A) y 28 (B) post tratamiento.

Reducción del crecimiento total

La reducción del crecimiento evaluada el día 14 (Cuadro 2) post tratamiento no mostró diferencias significativas en los tratamientos de 0, 5 y 10 Gy, observándose un pequeño aumento de crecimiento en los brotes irradiados con 5 Gy, semejante a lo ocurrido en brotes de banano irradiados con 10 Gy (Mak Chai *et al.*, 2001). El tratamiento de 20 Gy mostró diferencia significativa con el testigo y el resto de los tratamientos. Los tratamientos de 30 y 40 Gy no mostraron diferencias significativas entre sí, presentando una reducción del crecimiento de 42 y 50 % respectivamente con respecto al tratamiento testigo. En estudios realizados en ciruelo japonés (Predieri y Gatti, 2000), ya se había observado un comportamiento similar, donde brotes irradiados con 30 Gy, presentaron un 55% de reducción del crecimiento. En banano, dosis de 38 Gy provocaron un 50% de reducción del crecimiento (Mak Chai *et al.*, 2001), mientras que otro estudio en la misma especie, dosis de 50 Gy, causaron una inhibición del crecimiento de los brotes cercano al 100% (Mak Chai *et al.*, 2001). Las diferencias entre la literatura y el presente estudio pueden explicarse porque la radiosensibilidad es genotipo - dependiente (Pinet-Leblay *et al.*, 1992; Xiao-Shan Shen *et al.*, 1990).

La reducción de crecimiento evaluada el día 28 post tratamiento no mostró diferencias significativas entre los tratamientos irradiados y el tratamiento control (Cuadro 2).

En ambas evaluaciones existió un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los brotes que aumentó junto con la magnitud de la dosis aplicada, resultados esperables de acuerdo a Predieri y Gatti (2000), quienes trabajando con ciruelo japonés mencionan una reducción del crecimiento al aumentar la dosis de radiación.

Cuadro 2. Reducción de crecimiento (%) de los brotes (tasa de proliferación de brotes irradiados/tasa de proliferación de brotes no irradiados) de *Prunus domestica* L. var. D' Agen, luego del tratamiento con rayos γ .

Dosis Radiación (Gy)	Día 14	Día 28
0	0 a	0 a
5	-2 a	9 a
10	8 a	11 a
20	24 b	17 a
30	42 c	21 a
40	50 c	25 a

Medias seguidas por letras diferentes en una misma fecha difieren significativamente con $P \leq 0.05$ según la prueba SNK.

El 50% de la reducción del crecimiento se observó en los brotes irradiados con 40 Gy. La DL50 se utiliza en la primera generación post tratamiento radiativo y es usada comúnmente en la determinación de la mejor dosis para producir mutaciones de interés (Predieri y Gatti, 2000), pero algunos autores prefieren aplicar una dosis menor, como el DL30, con el fin de disminuir la frecuencia de características no deseadas, esto se explica ya que dosis muy altas de radiación entregan altas frecuencias de mutaciones, pero la regeneración de las plantas es menor, en cambio, con dosis menores hay una menor cantidad de mutaciones y una mejor regeneración de las plantas (Pinet-Leblay *et al.*, 1992). De acuerdo a lo señalado, para las condiciones del ensayo la dosis más apropiada para producir mutaciones de interés en los brotes de ciruelo europeo var. D'Agén, considerando el porcentaje de reducción del crecimiento, sería inferior a 30 Gy.

En las evaluaciones realizadas los días 14 y 28 post tratamiento, la reducción del crecimiento presentó una alta correlación con la dosis de radiación γ , con un $R^2 = 0,97$ para el día 14; y 0,93 para el día 28 (Figura 3).

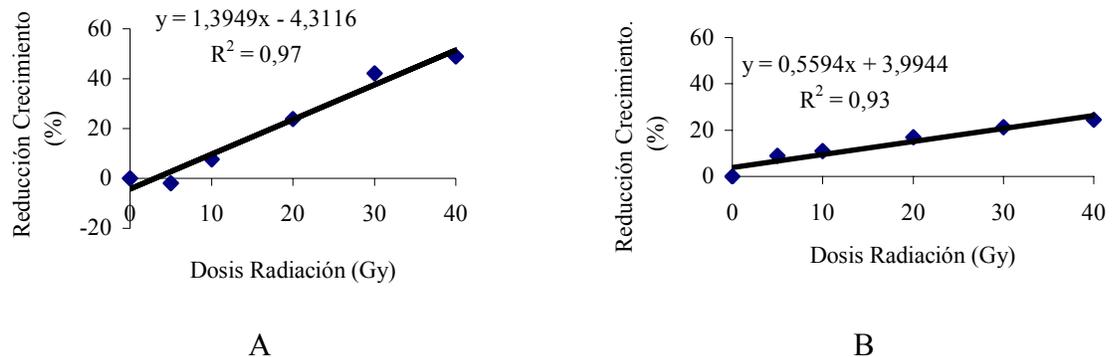


Figura 3 . Relación entre dosis de radiación γ y reducción del crecimiento total (%) evaluada el día 14 (A) y 28 (B) post tratamiento.

Largo total de brotes

El día 14 post tratamiento, los tratamientos irradiados con 20, 30 y 40 Gy resultaron significativamente distintos del tratamiento control, disminuyendo desde un 33% en los brotes irradiados con 20 Gy hasta un 53,5% en los tratados con 40 Gy (Cuadro 3). Estos resultados coinciden con lo encontrado en cerezo (Donini, 1976) y frutilla (Jain, 1997), donde se observó una reducción en el tamaño de los brotes y una disminución en la longitud de los entrenudos a medida que aumenta la dosis de radiación, entregando como una correlación significativa entre la longitud de los brotes y el número de yemas. Los brotes irradiados con 5 Gy no difirieron estadísticamente del testigo, sin embargo, se observó un pequeño aumento de 6,9% con respecto al testigo. Esto ya ha sido

observado en otras especies, en las cuales dosis bajas de radiación producen un leve aumento en el crecimiento (Predieri y Gatti, 2000).

El día 28 post tratamiento ocurrió algo similar a la evaluación anterior, donde los brotes irradiados con 20, 30 y 40 Gy se diferenciaron significativamente del control, mostrando una disminución del largo de 28,3%, 32,9% y 39,8% respectivamente (Cuadro 3).

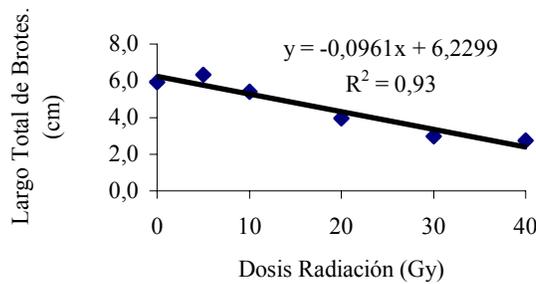
El día 56 post tratamiento, todos los tratamientos, a excepción del de 5 Gy, fueron estadísticamente diferentes al testigo, disminuyendo el tamaño hasta un 65,2% en los brotes irradiados con 40 Gy (Cuadro 3). Estos resultados son similares a los encontrados en olivo después de dos ciclos de propagación, donde se observó una disminución en el largo de los entrenudos; en tanto en el crecimiento de los brotes laterales se observó una pérdida de la dominancia apical y cambios en el hábito de crecimiento y morfología de las hojas (Donini, 1976).

Cuadro 3. Largo total de los brotes (cm) de *Prunus domestica* L. var. D' Agen, luego del tratamiento con rayos γ .

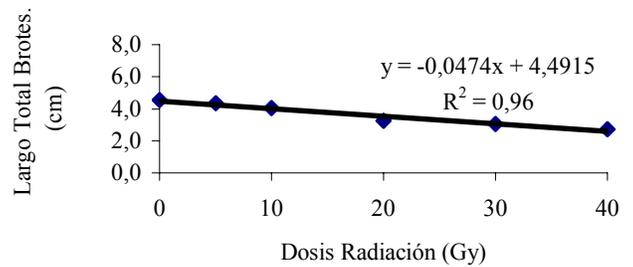
Dosis Radiación (Gy)	Día 14	Día 28	Día 56
0	5,91 ab	4,54 a	5,43 a
5	6,32 b	4,35 a	4,93 ab
10	5,40 a	4,05 ab	4,10 bc
20	3,96 c	3,25 bc	3,70 c
30	2,96 d	3,05 c	3,08 c
40	2,75 d	2,74 c	1,89 d

Medias seguidas por letras diferentes en una misma fecha difieren significativamente con $P \leq 0.05$ según la prueba SNK.

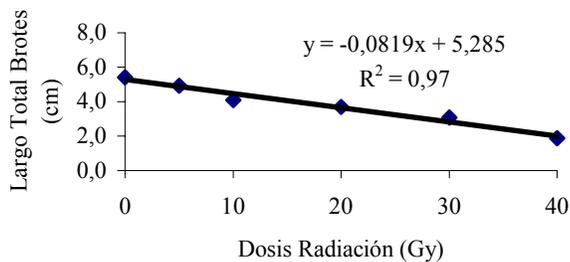
El largo total de los brotes presentó una alta asociación con las dosis de radiación γ , con un $R^2 = 0,93$ para el día 14; 0,96 para el día 28 y 0,97 para el día 56 (Figura 4). Es posible concluir que existe un efecto inhibitorio de la radiación sobre el largo total de los brotes, lo cual ya ha sido observado en cultivos in vitro de banana (Novak *et al.*, 1985). El largo total de brotes evaluado los días 14, 28 y 56 post tratamiento, correlacionó significativamente y en forma positiva con la tasa de proliferación. Además, en el día 14 y 28 post tratamiento existió una correlación negativa y significativa entre el largo total de brotes y el porcentaje de reducción de crecimiento y una correlación positiva entre el largo total de brotes y la tasa de proliferación. El largo total de brotes fue mayor en los testigos que en los tratamientos irradiados. Esto coincide con lo señalado por Duron y Decourtye (1985), quienes mencionan que la elongación celular y la formación de nudos nuevos se ven afectadas por un aumento en la dosis de radiación γ .



A



B



C

Figuras 4. Relación entre dosis de radiación γ y largo total de brotes evaluada el día 14 (A), 28 (B) y 56 (C) post tratamiento.

Mortalidad de brotes

El día 14 post tratamiento, los brotes irradiados con 30 y 40 Gy, presentaron mayores mortalidades, siendo significativamente distintos al testigo, encontrándose un 25% de mortalidad en el último tratamiento (Figura 5). Comparando estos resultados con estudios realizados en ciruelo japonés (Predieri y Gatti, 2000), se puede apreciar una radiosensibilidad menor en los brotes de ciruelo europeo. Estos autores irradiaron brotes de ciruelo japonés *in vitro* y determinaron que la dosis de 40 Gy presentó un 64% de mortalidad, en cambio en el presente estudio ninguna dosis superó el 30% de mortalidad. Estas diferencias pueden explicarse por las diferencias genéticas (Pinet-Leblay *et al.*, 1992; Xiao-Shan Shen *et al.*, 1990), o bien, deberse al tiempo que transcurrió antes de realizar la medición, ya que en el estudio mencionado, la mortalidad se evaluó luego de 30 días de permanencia en un medio de proliferación (Figura 5).

El día 28 post tratamiento, el porcentaje de mortalidad aumentó junto con las dosis de radiación, observándose en este caso una diferencia significativa de todos los tratamientos con respecto al control que presentó mortalidad cercana a 0%. En esta evaluación, los brotes irradiados con 40 Gy presentaron un 55,7% de mortalidad (Figura 5).

El día 56 post tratamiento, todos los tratamientos difirieron estadísticamente del testigo, observándose un 49% de mortalidad en los brotes irradiados con 20 Gy y un 63,8% y 66,5% en los tratamientos con dosis de 30 y 40 Gy (Figura 5).

Todas las dosis de radiación provocaron muerte de brotes, en las tres evaluaciones se observó un aumento en el porcentaje de mortalidad de los brotes de ciruelo con mayores dosis de radiación γ , lo cual ya ha sido mencionado por algunos autores para otras especies (Fereol et al, 1996; Predieri y Gatti, 2000), esto puede explicarse porque el daño que produce la radiación en el núcleo celular es el principal responsable de la muerte de los tejidos (Fereol, 1996), junto con una alta radiosensibilidad de los meristemas (Pinet-Leblay et al., 1992).

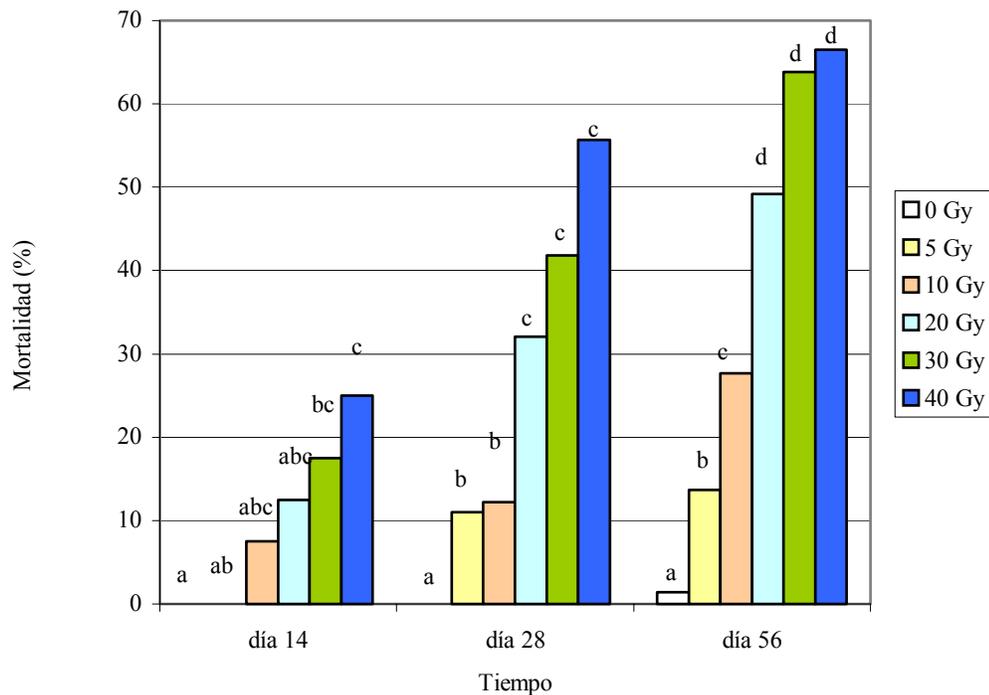
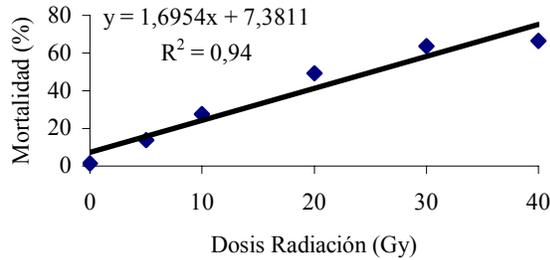


Figura 5. Mortalidad (%) de los brotes de *Prunus domestica* L. var. D'Agen, luego del tratamiento con rayos γ .

Es posible observar que el efecto de la radiación sobre la mortalidad se acentúa en el tiempo, siendo éste efecto mayor en las dosis superiores, lo cual puede deberse a que la radiación γ produce un envejecimiento acelerado de los brotes de ciruelo. A los 56 días post tratamiento se observó una alta asociación entre la mortalidad y las dosis de radiación γ , con un $R^2 = 0,94$ para el día 56 (Figura 6).



Figuras 6. Relación entre dosis de radiación γ y mortalidad (%) evaluada el día 56 post tratamiento.

Enraizamiento de los brotes

El día 98 post tratamiento, se observaron diferencias significativas entre el testigo y los tratamientos con 20, 30 y 40 Gy. El testigo presentó la mayor capacidad para generar raíces, mientras que los brotes irradiados con 30 y 40 Gy no enraizaron (Figura 7). Se observó una clara reducción en la capacidad de enraizamiento de los brotes al aumentar las dosis de radiación γ , coincidiendo con lo observado en otras especies frutales tratadas con rayos γ como ciruelo japonés (Predieri y Gatti, 2000) y frutilla (Jain, 1997), lo que puede indicar la necesidad de que existan brotes vigorosos para que se produzca rizogénesis. Brotes con un adecuado tamaño y hojas expandidas no fueron frecuentes, especialmente cuando la dosis de radiación γ aumentó.

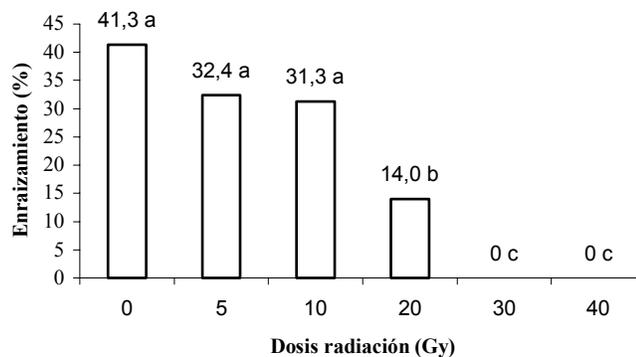


Figura 7. Porcentaje de enraizamiento de los brotes de *Prunus domestica* L. var. D'Agén, 98 días post tratamiento con rayos γ .

CONCLUSIONES

La radiación γ puede producir un efecto letal sobre los brotes de ciruelo D'Agen cultivados in vitro, aumentando su efecto al pasar los días post tratamiento, afectando primero a los brotes sometidos a dosis más altas, produciéndose incluso la muerte inmediata.

La DL50 para los brotes de ciruelo D'Agen tratados con rayos γ sería cercana a 40 Gy cuando se considera el efecto sobre la reducción del crecimiento y superior a 30 Gy cuando se considera la mortalidad.

La capacidad de enraizamiento de los brotes se afecta en las dosis altas, llegando incluso a inhibirla completamente en las dosis de 30 y 40 Gy, lo que dificultaría utilizar dichos niveles de radiación en programas de mejora genética de ciruelo D'Agen.

Teniendo en cuenta estos resultados, el rango de rayos γ más adecuado para inducir mutaciones útiles en el ciruelo europeo variedad D'Agen cultivado in vitro se encontraría en dosis inferiores a 20 Gy.

BIBLIOGRAFÍA

AHLOOWALIA, B. S. 1997. Improvement of horticultural plants through *in vitro* culture and induced mutations. *Acta Horticulturae* 447: 545 – 550.

BRIGGS, R. W. AND CONSTANTIN, CF. 1977. Radiosensitivity and Radiation sources. *Manual on Mutation Breeding*. 2º Ed. p7-21. IAEA, Viena.

BRUNNER, H. AND KEPPL, H. 1991. Radiation induced apple mutants of improved commercial value. IAEA, Vienna. *Plant Mutation Breeding for Crop Improvement* 1: 547 – 552.

CHANEY, D. 1981. The Tree. pp.12-22. *In*: Technical Editor: David E. Ramos. *Prune Orchard Management*. Division of Agricultural Sciences. University of California. United States of America. 156 p

DONINI, B. 1976. The use of radiation to induce mutation in fruit trees. Improvement of vegetatively propagated plants and tree crops through induced mutation, p55 – 61. IAEA, Vienna.

DURON, M AND DECOURTYE, L. 1985. Effets biologiques des rayons gamma appliques a des plantes de *Weigela* cv. “Bristol ruby” cultivees in vitro, pp103-111. *In*: Proceedings of a symposium: Nuclear techniques and in vitro culture for plant improvement, Viena, 19-23 august, 1985. IAEA, Viena 530 p.

FEREOL, L., LOUIS, S. AND LUCE, L. 1996. Effects of gamma radiation on in vitro plantlets of *Alpinia purpurata*. *Journal of Horticultural Science*, 71(2):243 – 247.

JAIN M. 1997. Creation of variability by mutation and tissue for improving plants. *Acta Horticulturae* 447:69 – 77.

LAPINS, K. O. 1973. Induced mutation in Fruit trees. *Induced mutation in vegetatively propagated plant*, p 1-18. IAEA, Vienna.

MAK CHAI, Y.W. HO, K.W. LIEW AND J. M. ASIF. 2001. Biotechnology and in vitro mutagenesis for banana improvement. [en línea] Disponible en el WWW: <http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/007/ae216e/ae216e05htm> (Consulta 6 de junio de 2005).

MALUSZYNSKI, M., AHLOOWALIA, B. AND SIGURBJORNSSON, B. 1995. Application of in vivo and in vitro mutation techniques for crop improvement. *Euphytica* 85: 303 - 315.

- MURASHIGE, T. AND SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cell cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- NOVAK F., AFZA R., PHADVIBULYA V., HERMELIN T. AND BRUNNER H. DONINI B. 1985. Micropropagation and radiation sensitivity in shoot- tip cultures of banana and plantain. pp 167-174. In: IAEA (ed.) Proceedings of a symposium: Nuclear techniques and in vitro culture for plant improvement, Vienna, 19-23 august, 1985. IAEA, Viena. 530 p.
- PINET- LEBLAY, C., TURPIN, F.X. AND CHEVREAU, E. 1992. Effect of gamma and ultraviolet irradiation on adventitious regeneration from *in vitro* cultured per leaves. *Euphytica* 62: 225 - 233.
- PREDIERI, S. 2001. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. *Plant cell, Tissue and Organ Culture* 64:185 - 210.
- PREDIERI, S. AND GATTI E. 2000. Effect og gamma radiation on microcuttings of plum (*Prunus salicina* L.) “Shiro”. *Adv. Hort Science*, 14: 7-11.
- PREDIERI, S. AND ZIMMERMAN R. 2001. Pear mutagenesis: *In vitro* treatment with gamma rays and field selection for productivity and fruit traits. *Euphytica*, 117: 217 - 227.
- PREDIERI, S., MAGLI M. AND ZIMMERMAN R. 1997. Pear mutagenesis: *In vitro* treatment with gamma rays and field selection for vegetative traits. *Euphytica*, 93: 227 - 237.
- QUINLAN, J. AND TOBUTT, K. 1990. Manipulating fruit tree structure chemically and genetically for improved performance. *Hortscience*, 25(1):60 – 63.
- RENAUD R., PERSAIS J. AND CHENNEVIERE E. 1978. Premiers resultats obtenus apres des essais preliminares de mutagenesis artificielle sur la variete “Prune D’Ente”. *Acta Horticulturae*, 74:95 – 103.
- RUBÍ M., DE LA CRUZ E. Y TRUJILLO R. 1995. Mejoramiento genético del aguacate mediante mutagénesis radioinducida. [en línea] Disponible en el WWW:<http://www.avocadosource.com/Journals/CICTAMEX/CICTAMEX_1995/fitos_2_95_pdf> (Consulta 14 de abril de 2004).
- SPARROW, A.H., CUANY, R. L., MIKSCHE, J. P. AND SCHAIRER, L. A. 1960. Some factors affecting the responses of plants to acute and chronic radiation exposure. pp. 289-320. In: IAEA (ed.) Effects of ionizing radiation in seeds. New York, United States of America. 655 p.

WALTER F. AND SAUER A., 1985. Analysis for radiosensitivity. A basic requirement for in vitro somatic mutagenesis. I. *Prunus avium* L. Acta Horticulturae, 169:97-104.

XIAO-SHAN SHEN, JUE-ZHEN WAN, WEI-YI LUO AND XIAO-LING DING. 1990. Preliminary results of using in vitro axillary and adventitious buds in mutation breeding of Chinese gooseberry. Euphytica, 49: 77 – 82.