

INDUCCIÓN DE MUTACIONES EN CRISANTEMO (*Dendranthema grandiflora*) USANDO RADIACIÓN GAMMA Y ETIL METANO SULFONATO

MUTATION INDUCTION IN CHRYSANTHEMUM (*Dendranthema grandiflora*) USING GAMMA RADIATION AND ETHYL METHANESULFONATE

Castillo-Martínez, C.R.¹; De la Cruz-Torrez, E.²; Carrillo-Castañeda, G.³; Avendaño-Arrazate, C.H.^{4*}

¹Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG), Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Progreso # 5 Col. Barrio Santa Catarina Coyoacán D.F. ²Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Carretera México-Toluca s/n, La Marquesa, Ocoyoacac, México. ³Colegio de Postgraduados, carretera federal México-Texcoco km. 36.5. ⁴Campo Experimental Rosario Izapa-INIFAP. Km. 18 Carr. Tapachula-Cacahoatán, Tuxtla Chico, Chiapas.

*Autor responsable: fitogeneticarlos@hotmail.com

RESUMEN

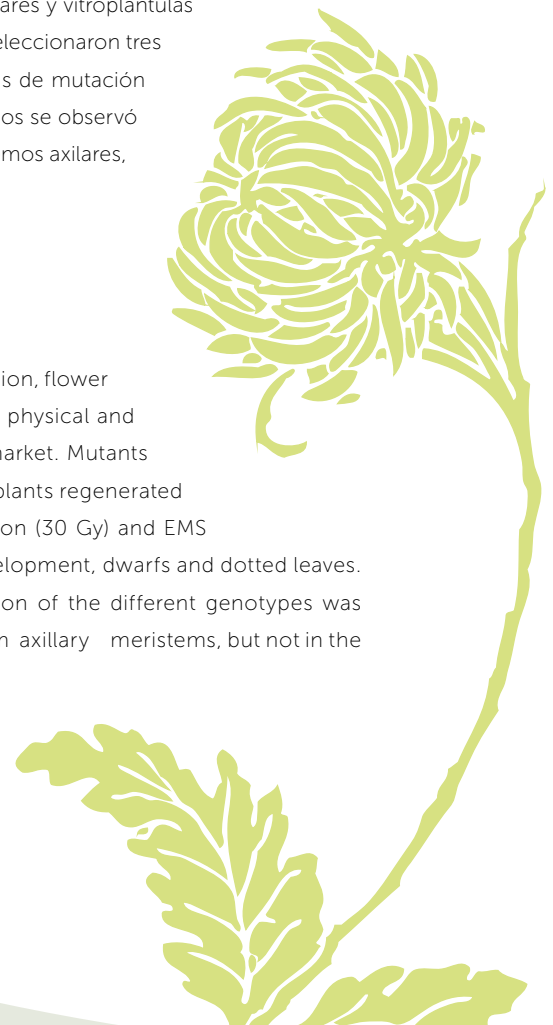
Se realizó una investigación enfocada a modificar características en la pigmentación de follaje, flor y arquitectura en plantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*), a través de agentes mutagénicos físicos y químicos, con el fin de generar nuevas variantes para el mercado. Se detectaron mutantes con estos tipos de cambios en las primeras etapas de propagación de plántulas regeneradas a partir de explantes foliares y vitroplántulas que fueron expuestas a radiación gamma (30 Gy) y EMS (0.2% v/v por 30 min). Se seleccionaron tres mutantes con genotipos de lento desarrollo, enano y moteado en hojas. Las tasas de mutación respectivas fueron 0.0470, 0.0033 y 0.0007. La expresión de los diferentes genotipos se observó en un 95% de plantas obtenidas en tres generaciones vegetativas a partir de meristemos axilares, pero no en aquellas plantas regeneradas de explantes foliares.

Palabras clave: Radiación gamma, flores, nuevas variedades.

ABSTRACT

A study was performed focused on modifying characteristics of foliage pigmentation, flower and architecture of chrysanthemum plants (*Dendranthema grandiflora*), through physical and chemical mutagenic agents, with the aim of generating new varieties for the market. Mutants with these types of changes were detected in the first stages of propagation, in plants regenerated from foliar explants and *in vitro* seedlings that were exposed to gamma radiation (30 Gy) and EMS (0.2 % v/v for 30 min). Three mutants were selected with genotypes of slow development, dwarfs and dotted leaves. The respective mutation rates were 0.0470, 0.0033 and 0.0007. The expression of the different genotypes was observed in 95 % of the plants obtained in three vegetative generations from axillary meristems, but not in the plants regenerated from foliar explants.

Keywords: Gamma radiation, flowers, new varieties.



INTRODUCCIÓN

La actividad florícola en México ha crecido considerablemente, alentada por el incremento en la exportación de flores, destacando la rosa (*Rosa spp.*) y el crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Las exportaciones de esta última especie en 1994 ascendieron a 55.5 millones de pesos (Pizano, 1997). Para 2007 se exportaron 115.85 millones de pesos equivalente a 2,205 kg (SIAP, 2007). Los productores de plantas ornamentales demandan características novedosas tales como, color, forma y aroma de las flores. Por tal motivo, los fitomejoradores han puesto atención a estos aspectos en sus programas de mejoramiento convencional; sin embargo, como la mayoría de las variedades recientes se propagan vegetativamente, es común usar otras técnicas de mejoramiento genético incluyendo las nuevas herramientas biotecnológicas, físicas o químicas (Bowen, 1994).

Mediante la inducción de mutaciones con radiación gamma o agentes químicos se han obtenido numerosas variedades en diversas especies; por ejemplo, tratamientos con etil metanosulfonato (EMS) en anteras de arroz (*Oryza sativa*), produjeron hasta 20.7% de mutantes (Lee y Lee, 2001). En *Vicia faba*, se comparó la eficiencia entre agentes mutagénicos físicos y químicos, encontrándose que el EMS (agente químico) generó una mayor tasa de mutación comparada con la radiación gamma (agente físico), debido a los mayores efectos en la generación irradiada (Kumari, 1996).

Investigaciones realizadas en seis variedades de crisantemo con hojas disectadas y tratadas con 0.5% de EMS, mostraron 42% de disminución en la formación de brotes adventicios (Toaima y Pank, 1996), y mediante la radiación gamma se han logrado generar nuevas variedades de crisantemo (Maluzynski, 1992). Al irradiar esquejes comerciales de crisantemo con dosis de 10, 15 y 25 Gy, se seleccionaron tres mutantes con flores de aspecto atractivo (Talukdar y Paswan, 1997). Tratamientos con 25 Gy en la variedad MOGUI de crisantemo, color rojo brillante, originaron flores con sectores de coloración blanca y amarilla (Debasis *et al.*, 1999). Otros efectos como cambios en altura de planta, tamaño de hojas y forma de la flor (número y forma de pétalos), se obtuvieron con dosis de 30 y 40 Gy (Data y Benerji, 2002).

Al inducir mutaciones con irradiación gamma, es necesario considerar el tipo de tejido seleccionado a tratar, pues de ello depende la frecuencia de quimeras (individuos con cambios morfológicos o anatómicos no heredables). Así, por ejemplo, al irradiar esquejes enraizados de cuatro variedades de crisantemo con rayos gamma a dosis de 15, 20 y 25 Gy se obtuvo una disminución en el tamaño de la planta y hojas; además de la aparición de ramas con efectos quiméricos en la flor, tales como, color y forma (Data y Benerji, 2002).

En el presente estudio se evaluó la eficiencia mutagénica de agentes físicos (radiación gamma) y químicos (EMS) en crisantemo, a través del

número de mutantes con efectos en forma, tamaño y pigmentación de hojas y flor, esperando encontrar mayor número de mutantes al emplear agentes físicos. Además de determinar el mejor tipo de tejido para irradiar: meristemos o segmentos foliares, partiendo de la premisa de que usando segmentos foliares se obtendría menor número de quimeras y mutantes con mayor estabilidad, después de varias generaciones de multiplicación vegetativa.

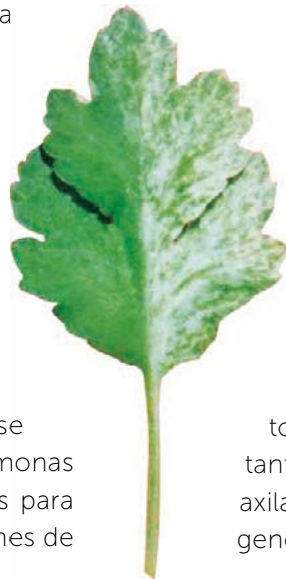
MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon plantas de crisantemo TIKARA, que fueron transferidas a condiciones *in vitro* y propagadas a través de meristemos axilares en tres subcultivos en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con sacarosa (30 g L⁻¹).

Tratamientos con radiación gamma y etil metanosulfonato

Segmentos foliares de aproximadamente 1 cm² provenientes de plántulas micropropagadas se colocaron en cajas petri con medio MS líquido con pH de 5.8 al cual se le agregó 0.2% v/v de etil metanosulfonato (EMS). Los explantes fueron expuestos a este agente químico por tiempos de: 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 150 min. Posterior a este tratamiento los segmentos foliares fueron cultivados en un medio sólido preparado con las sales inorgánicas del medio MS suplementado con agua de coco (*Cocos nucifera*) 200 mL⁻¹ sacarosa, 20 g AIA, 4 mg L⁻¹ Kinetina, 2 mg L⁻¹, ajustando el pH a 5.8. Cuando los brotes se formaron se realizaron subcultivos en medio sólido MS. Las condiciones de cultivo en el cuarto de incubación fueron: temperatura de 28 °C y fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad,

para lo cual se emplearon lámparas fluorescentes de luz blanca de 40 W. El experimento se realizó bajo un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento. El análisis de los resultados se realizó mediante un análisis de varianza y la comparación entre tratamientos se hizo con la prueba de Tukey con un $\alpha=0.05$. La irradiación gamma se aplicó a segmentos foliares con las dimensiones previamente descritas partiendo de plantas micropropagadas, que poseían meristemos de 10 mm de longitud, los cuales antes de ser tratados se mantuvieron en un medio MS sin hormonas durante 72 h., La fuente de rayos gamma fue un Irradiador Gammacell 220 con barras de 60 Co. Las dosis fueron 10, 20, 30, 50, 100, 150, 200 y 300 Gy. Los tejidos irradiados se transfirieron a un medio fresco MS, con hormonas para los segmentos foliares y sin hormonas para las yemas axilares, con las mismas condiciones de cultivo que los tejidos tratados con EMS.



Selección y análisis de los mutantes

Las plantas que mostraron cambios en el tamaño, forma de hojas y flores; tasa de crecimiento (centímetros por semana); pigmentación foliar y floral; fueron seleccionadas después de 60 días de cultivadas. Se separaron las provenientes de meristemos y segmentos foliares para identificar el tejido original irradiado e inferir sobre la influencia del tipo de tejido y la respuesta quimérica de los mutantes.

Evaluación de la persistencia

Para evaluar si los cambios son heredables y no quiméricos se observó el comportamiento de los cambios durante tres generaciones. En este caso se siguió la recomendación de Data y Benerji (2002) seleccionando individuos tanto los regenerados de segmentos foliares, como los de meristemos y fueron sometidos a cinco subcultivos de 25 días cada uno, para determinar la estabilidad de cada fenotipo mutante seleccionado e inferir la persistencia de los caracteres mutados. También se evaluó la capacidad de regeneración y multiplicación de los mutantes mediante el porcentaje de explantes con brotes, así como, el número de brotes por explante y poder inferir si los materiales seleccionados pudieran ser individuos con múltiples mutaciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mutantes obtenidos

De un total de 1620 explantes tratados con EMS se detectaron dos plantas que mostraron cambios fenotípicos comparados con la planta testigo en las primeras etapas de desarrollo de la plántula. Uno de los mutantes mostró patrones de moteado clorótico y el otro un crecimiento y desarrollo lento (Figura 1, 2). De 312 meristemos irradiados a una dosis de 2 Krad solo se detectó un mutante que presentó enanismo (entrenudos muy cortos). Ninguno de los 725 explantes foliares irradiados originaron mutantes. Una vez que los mutantes fueron seleccionados y con el objeto de observar el comportamiento de persistencia de estos cambios, cada mutante fue micropropagado a partir de meristemos axilares y de segmentos foliares hasta una tercera generación.

Todos los explantes tratados con 0.2% v/v de EMS, inclusive el tratamiento con una exposición por 150 minutos, dieron origen a formación de callos y brotes; a partir de 90 minutos de exposición o más se observó un 35% de reducción en la formación de callos y brotes, comparados con dosis menores. En tratamientos con radiación gamma las dosis mayores de 50 Gy en segmentos foliares causaron una falla completa en el desarrollo de callos y brotes. En exposiciones a 20 y 30 Gy, los explantes ocasionaron una reducción del 85% y 95% respectivamente en la formación de callos y brotes. Los meristemos tratados con 100 Gy., no presentaron desarrollo y posteriormente murieron; mientras que la dosis; de 30 Gy., permitió el desarrollo. Todos estos resultados concuerdan con lo reportado por Kumari (1996), quien menciona que los agentes químicos en este caso el etil metanosulfonato dan origen a un mayor número de mutantes y permite el desarrollo de callos y brotes en los explantes tratados.

Cambios detectados en otros parámetros

Al realizar los subcultivos de los mutantes seleccionados se evaluó el porcentaje de los explantes capaces de generar nuevos brotes y a su vez se observó el promedio de brotes por explante regenerados de segmentos foliares y se determinó que el mutante de lento desarrollo y el mutante moteado mostraron una disminución en estos

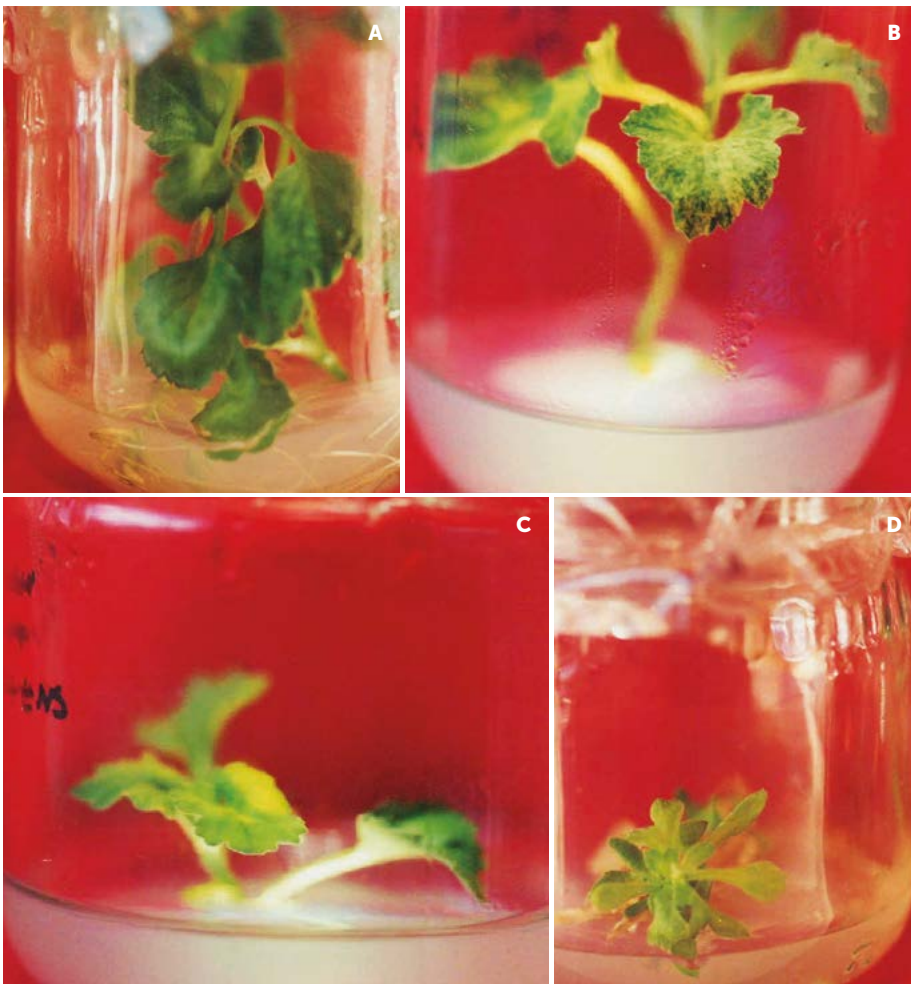


Figura 1. Mutantes obtenidos: A: Testigo; B: Moteado; C: Crecimiento lento; D: Enano

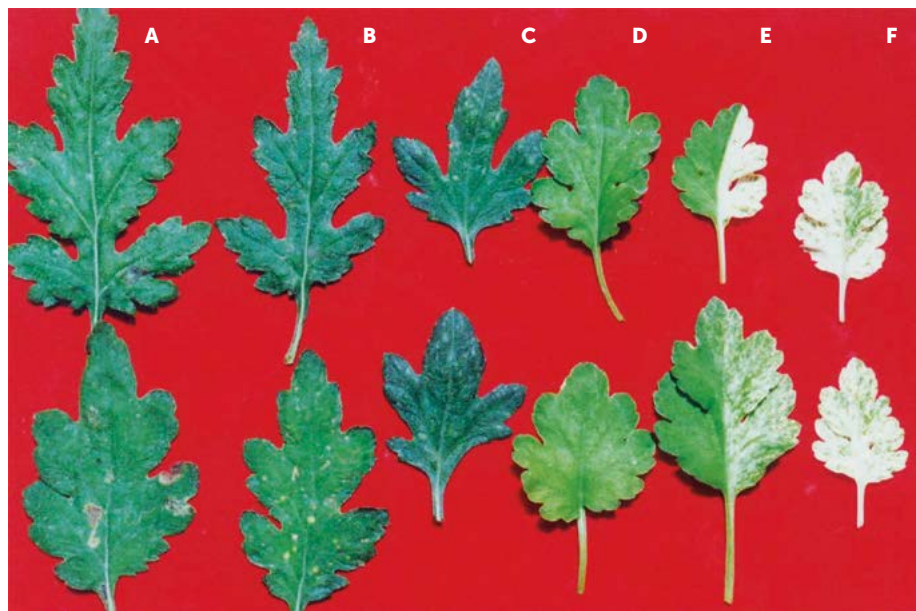


Figura 2. Comparación de hojas de varios tipos de crisantemo y el mutante moteado. A: Indinópolis; B: Hartman; C: Telestar; D: Tikara; E-F: Mutante Moteado.

parámetros de 50% y 60% respectivamente comparado con el genotipo original (Cuadro 1). Este comportamiento puede ser explicado como un efecto colateral causado por el agente mutagénico, o bien, por el hecho de que en estos mutantes pudiera haber ocurrido más de una mutación. Una tendencia parecida se observó con respecto al crecimiento donde se pudo determinar que los tres mutantes presentaron una disminución en este parámetro comparado con el testigo (Cuadro 2). Sin embargo, se detectó diferencia en la tasa de crecimiento del testigo y del mutante de hojas moteadas aún cuando no se observaron diferencias significativas en las medias. Esta pequeña reducción pudo deberse a que este mutante al presentar partes cloróticas tuviera una menor actividad fotosintética. Los mutantes de lento crecimiento y enano presentaron una disminución en el crecimiento del 47.5% y 81.5% respectivamente.

Persistencia de las características fenotípicas

Con el agente químico EMS se obtuvieron dos mutantes con tasas de mutación respectivos de 0.0007 y 0.0470; mientras que, con rayos gamma la tasa fue de 0.0033 (Cuadro 3). Se determinó que más del 90% de los mutantes que fueron propagados vía yemas axilares conservaron sus características, aunque ninguno de los individuos obtenidos de segmentos foliares expresaron sus características (Cuadro 4). Lo que permite asumir que estos últimos mutantes no fueron estables; es decir, se generaron individuos con comportamiento de quimeras como lo comenta Broertjes (1988).

Cuadro 1. Inducción de brotes a partir de explantes foliares derivados de los mutantes después de 30 días de subcultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*).

Fenotipo	Explantos con brotes (%)	Número promedio de brotes por explante
Moteado	51.8	1.8
Crecimiento lento	51.5	1.4
Enano	61.3	1.7
Testigo	100.0	2.8

Cuadro 2. Comparación de medias de altura de tallo de los fenotipos de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*), después de 30 días de cultivo.

Fenotipo	Crecimiento relativo (cm)
Moteado	78.79 ab
Crecimiento lento	52.90 c
Enano	18.41 d
Testigo	100.00 a

Cuadro 3. Tasa de mutación y agente mutagénico en crisantemo (*Dendranthema grandiflora*).

Fenotipo	Agente mutagénico	Minutos o dosis (Krad)	Número de explantes	Número de plantas regeneradas	Tasa de Mutación
Moteado	EMS	90	735	1323	0.0007
Crecimiento lento	EMS	15	15	21	0.0470
Enano	Gamma	2	60	300	0.0033

Cuadro 4. Persistencia fenotípica de los mutantes regenerados de explantes foliares y meristemos axilares después de tres generaciones de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*).

Fenotipo	Plantas que expresaron mutación (%)	
	a partir de hoja	a partir de meristemos
Moteado	0	96.3
Crecimiento lento	0	91.5
Enano	0	100

CONCLUSIONES

El agente químico mutagénico produjo mayor número de mutantes que el físico. Los tres mutantes obtenidos presentaron persistencia no constante lo que indicó que fueron quimeras. Se observó en todos los mutantes una disminución en el crecimiento.

LITERATURA CITADA

- Bowen H. 1964. Mutation in horticultural chrysanthemum. Ed. Pergamon Press 138 p.
- Broertjes C. 1988. Applied mutation breeding for vegetatively propagated crops. Ed. Elsevier Science Publisher 700 p.
- Datta S., Banerji B. 2002. Induction and analysis of gamma ray induced flower head shape mutation in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). Indian Journal of Agricultural Science 72:6-10.
- Debasis R., Banerji B., Datta S. 1999. Improvement of garden chrysanthemum through induced mutation. Flora and Fauna 1:1-4.

- Fu-Runmin R., Andersen Z., Cheng W., Liu Z. 1995. Studies on induced mutation on fruit trees *in vitro*. Acta Horticulturae 403: 111-116.
- Jing-Tian L., Suave R., Gawel N. 1997. Identification of poinsettia cultivars using RAPD markers. Hortscience 32:122-124.
- Kumari R. 1996. Effectiveness and efficiency of physical, chemical, and physico-chemical mutagens in M2 generation of *Vicia Faba L.* var VH82-1. Journal of Nuclear Agriculture and Biology 25:172-175.
- Lee H., Lee J. 2001. Mutagenic effectiveness and efficiency of EMS, gamma rays and their combination in rice. Advances in Plant Sciences 12:203-205.
- Maluszynski M., Van Zaten L., Asir A., Brunner H., Ahloowalia B., Zapata J., Weck E. 1995. Induced mutations and molecular techniques for crop improvement. Plant Cell Reports 12:215-219.
- Murashige T., Skoog. 1962. A revised medium for rapid grow and bio assays with tobacco tissue culture. Plant Physiology 15:473-497.
- Napoli C., Ruehle J. 1996. New mutations affecting meristem growth and potential in *Petunia hybrida* Vilm. Journal of Heredity 87:371-377.
- Pizano M. 1997. Changes in mexican floriculture. Floriculture International 12:27-32.
- Shibata-M., Kishimoto S., Hirai M., Aida R., Ikeda I. 1998. Analysis of the periclinal chimeric structure of chrysanthemum sports by RAPD. Acta Horticulturae 454:347-353.
- Talukdar M., Paswan L. 1997. Gamma ray induced mutation in chrysanthemum. Journal of Nuclear Agriculture and Biology 26:129-131.
- Toaima N., Pank F. 1996. Adventitious bud formation on isolated leaves and its significance for mutation breeding in some ornamental and medicinal plants. In: Proceeding of International Symposium of Breeding Research on Medicinal and aromatic plants. Quedlinburg, Germany. 1:171-176.
- Zalewska M., Jerzy M. 1997. Mutatum spectrum in *Dendranthema grandiflora* Tzelevy after *in vivo* and *in vitro* regeneration of plants from irradiated leaves. Acta Horticulturae 447:615-617.