



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

MUTAGÉNESIS EN *Anthurium andreanum* L. INDUCIDA POR RAYOS GAMMA COBALTO⁶⁰ Y COLCHICINA

MARÍA ISABEL LÓPEZ MARTÍNEZ

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2019



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, la que suscribe, **María Isabel López Martínez**, Alumna de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección de la Profesora **Dra. Alejandrina Robledo Paz**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Mutagénesis en *Anthurium andreanum* L. inducida por rayos gamma Cobalto⁶⁰ y colchicina**, y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y la que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Texcoco, Estado de México, a 23 de julio de 2019

María Isabel López Martínez

Vo. Bo. de la Dra. Alejandrina Robledo Paz

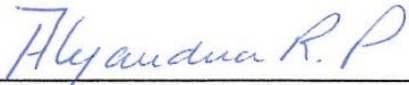
La presente tesis titulada: **Mutagénesis en *Anthurium andreanum* L. inducida por rayos gamma Cobalto⁶⁰ y colchicina**, realizada por el (la) alumno (a): **María Isabel López Martínez** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO (A)



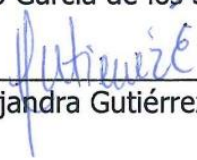
Dra. Alejandrina Robledo Paz

ASESOR (A)



Dr. Gabino García de los Santos

ASESOR (A)



Dra. María Alejandra Gutiérrez Espinosa

Montecillo, Texcoco, Estado de México, agosto 2019

MUTAGÉNESIS EN *Anthurium andreanum* L. INDUCIDA POR RAYOS GAMMA

COBALTO⁶⁰ Y COLCHICINA

María Isabel López Martínez, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2019

RESUMEN

La inducción de mutaciones es uno de los métodos más utilizados para generar nuevos genotipos. Los anturios son plantas exóticas con alta demanda, debido a que producen flores muy vistosas todo el año y tienen larga vida postcosecha. Desarrollar nuevas variedades de anturio por hibridación puede llevar de 8-10 años. El objetivo de la presente investigación fue generar mutantes de *Anthurium andreanum* mediante radiación gamma Co⁶⁰ y colchicina. Explantes de hoja, nudos y raíces obtenidos de vitroplantas se expusieron a distintas dosis de radiación gamma Cobalto⁶⁰ (0, 3, 6, 9, 12 y 15 Grays) y colchicina al 0.01 % (0, 2, 3 y 4 h). Los explantes de hoja mostraron alta sensibilidad a la radiación gamma y a la colchicina, mostrando la supervivencia más baja (2-6 %). La supervivencia de los explantes de raíz expuestos a colchicina fue de 100 % después de 12 semanas. Sólo 4 % de los explantes expuestos durante 2 y 3 h formaron brotes adventicios (120 brotes). Para los nudos la supervivencia más baja se registró en aquellos expuestos durante 4 h a la colchicina; la dosis letal media (DL50) para éstos se encontró a las 3.98 h. Setenta y seis y 56 % de los nudos cultivados durante 2 y 3 h con este mutágeno formaron brotes (4.4 y 3.2 brotes). La supervivencia de los explantes de raíz disminuyó conforme incrementó la dosis de radiación (98 a 60 %); la DL50 para éstos explantes fue de 12 Grays. Sólo los explantes expuestos con 3 Grays (8 %) regeneraron 75 brotes por explante. La mayor parte de los nudos irradiados sobrevivieron (90-100 %) en todas las dosis utilizadas. El porcentaje máximo de nudos que formaron brotes se registró en aquellos irradiados con 3 Grays (74 %), mismos que regeneraron 1.9 brotes por explante. Las plantas de los presuntos mutantes mostraron cambios en longitud, tamaño y color de hoja, tamaño de raíz y vigor.

Palabras clave: *A. andreanum*, mutagénesis, colchicina, radiación gamma, vitroplantas

MUTAGENESIS IN *Anthurium andreanum* L. INDUCED BY GAMMA COBALTO⁶⁰

RADIATION AND COLCHICINA

María Isabel López Martínez, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2019

ABSTRACT

Mutation induction is one of the most used methods to generate new genotypes. The anthuriums are exotic plants with high demand, because they produce very colorful flowers all year round and have a long post-harvest life. Developing new varieties of anthurium by hybridization can take up to 8-10 years. The objective of the present investigation was to generate *Anthurium andreanum* mutants using Co⁶⁰ gamma radiation and colchicine. Explants of leaves, nodes and roots obtained from vitroplants were exposed to different doses of Co⁶⁰ gamma radiation (0, 3, 6, 9, 12, 15 Grays) and 0.01 % colchicine (0, 2, 3 and 4 h). Leaf explants showed high sensitivity to gamma radiation and colchicine, showing the lowest survival (2-6 %). The survival of root explants exposed to colchicine was 100 % after 12 weeks. Only 4 % of the explants exposed for 2 and 3 hours formed adventitious shoots (120 shoots). For the nodes the lowest survival was recorded in those exposed for 4 hours to colchicine; the mean lethal dose (LD50) for these explants was found at 3.98 h. Seventy-six and 56 % of the nodes cultivated for 2 and 3 hours with this mutagen formed shoots (4.4 and 3.2 shoots). The survival of the root explants decreased as the radiation dose increased (98 to 60 %); the LD50 for these explants was 12 Grays. Only the explants exposed to 3 Grays regenerated shoots (8 %) in low quantity. Most of the irradiated nodes survived (90-100 %) in all doses used. The maximum percentage of nodes that formed shoots was recorded in those irradiated with 3 Grays (74 %), which regenerated 75 shoots per explant. The plants of the putative mutants showed changes in length, size and leaf color, root size and vigor.

Keywords: *A. andreanum*, mutagenesis, colchicine, gamma radiation, vitroplants

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), al Colegio de Postgraduados y al Programa de Posgrado en Producción de Semillas – Campus Montecillo.

A los integrantes de mi consejo particular Dra. Alejandrina Robledo Paz, Dr. Gabino García de los Santos, Dra. María Alejandra Gutiérrez Espinosa.

Al Dr. Serafín Cruz Izquierdo por su participación como sinodal.

A mi Dios supremo por permitirme tener salud, fortaleza y la dicha de tener a mi padre y hermanas por todo su amor y apoyo incondicional.

A mi madre por darme la vida y su amor eterno.

A todos los que contribuyeron con el desarrollo de este trabajo.

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT.....	v
AGRADECIMIENTOS	vi
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE CUADROS.....	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 Generalidades del cultivo y taxonomía de <i>Anthurium andreanum</i>	4
2.1.1 Ubicación taxonómica.....	4
2.1.2 Propagación de anturio.....	5
2.2 Técnicas de mejoramiento genético	5
2.3 Mejoramiento en ornamentales	6
2.4 Mutagénesis	7
2.5 Mutaciones.....	8
2.6 Agentes mutagénicos físicos	8
2.6.1 Radiación ionizante.....	8
2.6.2 Radiación gamma.....	9
2.7 Agentes mutagénicos químicos	10
2.7.1 Colchicina	10
2.8 Tipos de mutaciones	12
2.8.1 Mutantes fisiológicos	13
2.9 Detección de mutantes fisiológicos: marcadores morfológicos	14
2.10 Detección de mutantes genéticos: marcadores moleculares.....	15
2.10.1 Microsatélites	15
2.11 Identificación de tejidos u órganos poliploides	16
2.11.1 Citometría de flujo	17
2.12 Mutantes en ornamentales	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1 Regeneración de vitroplantas: Organogénesis indirecta.....	20
3.1.1 Desinfestación.....	20

3.1.2 Siembra	20
3.1.3 Regeneración de brotes adventicios	21
3.1.4 Regeneración de vitroplantas	21
3.2 Exposición de explantes a colchicina y radiación gamma cobalto ⁶⁰	21
3.2.1 Colchicina	21
3.2.2 Radicación gamma Cobalto ⁶⁰	22
3.2.3 Regeneración de brotes a partir de explantes expuestos a colchicina y radiación gamma cobalto ⁶⁰	22
3.2.4 Variables evaluadas	22
3.3 Diseño experimental	23
IV. RESULTADOS	24
4.1 Regeneración de vitroplantas: Organogénesis indirecta	24
4.2 Efecto de la exposición de explantes a colchicina	24
4.2.1 Explantes de hoja	24
4.2.2 Explantes de raíz	25
4.2.3 Nudos	27
4.2.4 Interacción entre tipo el tipo de explante y el tiempo de exposición a la colchicina. ...	30
4.3 Efecto de la exposición de explantes a radiación gamma Co ⁶⁰	31
4.3.1 Explantes de hojas	31
4.3.2 Explantes de raíz	32
4.3.3 Nudos	35
4.3.4 Interacción entre el tipo de explante y dosis de radiación gamma Co ⁶⁰	36
4.4 Características morfológicas de presuntos mutantes generados por colchicina	38
4.4.1 Plántulas regeneradas a partir de nudos	38
4.4.2 Plántulas regeneradas a partir de raíces	39
4.5 Características morfológicas de presuntos mutantes obtenidos por radiación gamma Cobalto ⁶⁰	39
4.5.1 Plántulas regeneradas a partir de nudos	39
V. DISCUSIÓN	41
5.1 Respuesta de los explantes de hoja, raíz y nudos a la colchicina	41
5.1.1 Explantes de hoja	41

5.1.2 Explantes de raíz	42
5.1.3 Nudos	44
5.1.4 Interacción entre el tipo de explante y el tiempo de exposición a la colchicina	44
5.2 Respuesta de los explantes de hoja, raíz y nudos a la radiación gamma	45
5.2.1 Explantes de hoja	45
5.2.2 Explantes de raíz	45
5.2.3 Nudos	47
5.2.4 Interacción entre el tipo de explante y la dosis de irradiación con rayos gamma Co ⁶⁰	48
5.3 Características morfológicas de los presuntos mutantes generados con colchicina	49
5.3.1 Plántulas obtenidas a partir de nudos	49
5.4 Características morfológicas de los presuntos mutantes generados mediante radiación gamma Cobalto ⁶⁰	50
5.4.1 Plantas obtenidas de nudos.....	50
VI. CONCLUSIONES	52
VII. LITERATURA CITADA.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de acción de la colchicina (Cristina-Pereira <i>et al.</i> , 2012).....	11
Figura 2. Procedimiento de análisis por citometría de flujo (Kron <i>et al.</i> , 2007).....	17
Figura 3. Etapas que se llevaron a cabo en la presente investigación para inducir e identificar presuntos mutantes de <i>Anthurium andreanum</i>	19
Figura 4. Daño en explantes de hoja tratados con colchicina durante 4 horas durante 60 días de cultivo. a) 20 días, b) 28 días, clorosis, c) 36 días oxidación, d) daño severo, e) 60 días, muerte del explante.....	25
Figura 5. Supervivencia de explantes de hoja de <i>A. andreanum</i> después de 12 semanas de exposición a colchicina.	25
Figura 6. Efecto de la colchicina en el porcentaje de supervivencia y formación de callo de explantes de raíz después de 12 semanas.....	26
Figura 7. Formación de callo en raíces de <i>A. andreanum</i> expuestas a colchicina. a) testigo, b) 2 horas, c) 3 horas, d) 4 horas, después de 12 semanas.	27
Figura 8. Formación de brotes adventicios en explantes de raíz de <i>A. andreanum</i> expuestos a colchicina durante 2 (a) y 3 horas (b).	27
Figura 9. Supervivencia y porcentaje de explantes de nudo de <i>A. andreanum</i> que formaron brotes adventicios al exponerse a colchicina después de 12-20 semanas.	28
Figura 10. Número promedio de brotes adventicios por explante regenerados a partir de nudos de <i>A. andreanum</i> expuestos en colchicina evaluados a las 20 semanas.	28
Figura 11. Diagrama logarítmico de probabilidad de respuesta tiempo-mortalidad en función del tiempo, para determinar la DL ₅₀ en nudos de <i>A. andreanum</i> expuestos a colchicina.	29
Figura 12. Nudos de <i>A. andreanum</i> expuestos en colchicina cultivados en medio de inducción. a) 0 horas (testigo); b) 2 horas; c) 3 horas; d) 4 horas.	30
Figura 13. Nudos de <i>A. andreanum</i> expuestos en colchicina regenerando brotes adventicios. a) 0 horas; b) 2 horas; c) 3 horas; d) 4 horas.....	30
Figura 14. Efecto de la radiación gama Cobalto ⁶⁰ en el porcentaje de supervivencia de los explantes de hoja de <i>A. andreanum</i> después de 12 semanas.	32

Figura 15. Efecto de la irradiación con rayos gamma Cobalto ⁶⁰ en la supervivencia y formación de callo de explantes de raíz de <i>A. andreanum</i> después 12 semanas.	33
Figura 16. Diagrama logarítmico de probabilidad de respuesta dosis-mortalidad en función a la dosis para determinar la DL ₅₀ de los explantes de raíz de <i>A. andreanum</i> expuestos a rayos gamma Cobalto ⁶⁰	34
Figura 17. Respuesta de los explantes de raíz de <i>A. andreanum</i> expuestos a distintas dosis de radiación gamma Cobalto ⁶⁰	34
Figura 18. Efecto de la radiación con gamma Cobalto ⁶⁰ en la supervivencia y capacidad de regeneración de brotes adventicios de nudos de <i>A. andreanum</i> después de 12-20 semanas.	35
Figura 19. Formación de brotes en nudos de <i>A. andreanum</i> expuestos a distintas dosis de radiación gamma Cobalto ⁶⁰	36
Figura 20. Número promedio de brotes adventicios por explante regenerados a partir de nudos <i>A. andreanum</i> expuestos a distintas dosis de radiación gamma Cobalto ⁶⁰ evaluados a las 12-20 semanas.....	36
Figura 21. Plántulas de <i>A. andreanum</i> regeneradas a partir de nudos expuestos a distintos tiempos en colchicina evaluadas a las 24 semanas.	38
Figura 22. Plántulas de <i>A. andreanum</i> regeneradas a partir de raíz expuesta a 2 h en colchicina evaluadas a las 28 semanas.	39
Figura 23. Plántulas de <i>A. andreanum</i> regeneradas a partir de nudos expuestos distintas dosis de radiación gamma Cobalto ⁶⁰ evaluadas a las 28 semanas.	40

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1** Análisis de varianza en la interacción entre tipo de explante de *A. andreanum* y tiempo de exposición en colchicina sobre las variables evaluadas **31**
- Cuadro 2** Análisis de varianza en la interacción entre tipo de explante de *A. andreanum* y dosis de radiación gamma Co^{60} sobre el efecto en las variables evaluadas **37**

I. INTRODUCCIÓN

La inducción de mutaciones ha sido en los últimos años, uno de los métodos más utilizados para generar variabilidad genética, la estrategia principal en el mejoramiento basado en mutaciones, es la alteración de unos o dos rasgos principales, mejoran su calidad o sus características morfológicas (Ahloowalia *et al.*, 2004). Las mutaciones son cambios de tipo puntual muy diversos que afectan caracteres fisiológicos y morfológicos y que permiten adquirir o resaltar caracteres ocultos de interés (González-Jiménez, 2004). La mutagénesis es una técnica de bajo costo, que requiere poca infraestructura y se adapta fácilmente a distintos cultivos y objetivos de mejoramiento (Prina *et al.*, 2011). Aplicando técnicas de inducción de mutaciones, los principales mutágenos usados pueden ser categorizados como físicos o químicos (Maluszynski, 2017).

Dentro de los agentes mutagénicos químicos, la colchicina es de los más utilizados; este químico es antimitótico que puede inducir poliploidía la cual se considera un mecanismo importante de adaptación y especiación, y es reconocida como un recurso para producir plantas con rasgos de mayor valor económico (Van de Peer *et al.*, 2017; Eng y Ho, 2018). Otro agente mutagénico es la irradiación, la cual ha permitido mejorar genéticamente más de mil 300 nuevas variedades de cereales (559), leguminosas (136), cultivos industriales (67), ornamentales (397) (González-Jiménez, 2004).

Las plantas ornamentales representan un área de la agricultura cuyo mercado se caracteriza por ser muy exigente ávido de novedades que responden a modas y gustos del momento, razón del mejoramiento de ornamentales (Schum y Preil, 1998). En el área florícola se han obtenido variedades de orquídeas, rosa y margaritas mediante mutagénesis inducida (González-Jiménez, 2004).

Los anturios son plantas exóticas que se encuentran en la lista de especies ornamentales con alta demanda, debido a que producen flores muy vistosas todo el año y tienen larga vida poscosecha, características que le confieren gran aceptación en el mercado nacional e internacional (Castillo-Diego, 2012; SAGARPA, 2015; FAO, 2003; Azadi *et al.* 2016). El género *Anthurium* es nativo de América Central y del Sur, pero a nivel comercial se cultivan en Estados Unidos y Holanda. Las principales variedades de anturio utilizadas en el mundo son de origen holandés y han sido formadas por hibridación (Hernández, 2004; Mireles-Ordaz *et al.*, 2015); así como por métodos de transformación genética mediante los cuales se le ha conferido rasgos como nuevo color, resistencia a plagas y enfermedades y aumento de la longevidad de las flores; sin embargo la producción de anturio en México es baja; actualmente se cultiva en Veracruz, Chiapas, Morelos y Estado de México (López-Puc *et al.* 2013). México no cuenta con estadísticas oficiales sobre la producción de germoplasma de anturio que se comercializa (Castillo-Diego, 2012). El hecho de que todo el material genético de las principales especies de anturio que se comercializan en México provenga de las importaciones de Estados Unidos y Holanda, crea una dependencia completa del germoplasma. Asimismo, dicho material proviene de generaciones avanzadas de propagación vegetativa y en ocasiones no tiene garantía de calidad y sanidad (Escandon *et al.*, 2010). Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue:

Objetivo general

Generar mutantes de *Anthurium andreanum* mediante el uso de radiación gamma Co^{60} y colchicina.

Objetivos específicos

- Estudiar el efecto de distintas dosis y tiempos de exposición a la radiación gamma Cobalto 60 y colchicina en la supervivencia y capacidad de regeneración de explantes de hoja, nudos y raíz de *A. andreanum*.
- Generar genotipos mutantes mediante la exposición de explantes de hoja, raíz y nudos distintas dosis de radiación gamma y colchicina.

Hipótesis General

La inducción de mutaciones a través de rayos gamma Cobalto⁶⁰ y colchicina permitirá generar variabilidad genética en *A. andreanum*.

Hipótesis específicas

- Los nudos mostrarán la mayor tasa de supervivencia y capacidad de regeneración a la exposición de rayos gamma y colchicina.
- La probabilidad de encontrar presuntos mutantes aumentará conforme se incremente la dosis y el tiempo de exposición a los mutágenos

II REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades del cultivo y taxonomía de *Anthurium andreanum*

Con aproximadamente 1500 especies florecientes, el género *Anthurium* es el más grande de la familia Araceae. Debido a que su inflorescencia es atractiva y de larga duración y de alto valor económico se ha hecho popular como flor de corte y maceta. Los anturios representan la mayor proporción del mercado de flores tropicales; son plantas perennes, herbáceas, epífitas y monocotiledóneas, tiene un ciclo de vida y producción largos (Hernández, 2004). Son plantas nativas de Colombia que fueron llevadas a Inglaterra y de ahí a Hawai en 1889. En estas islas después de más de 100 años de hibridación y comercialización se exportaron a varios países; más de 700 especies están distribuidas desde el norte de México y las Grandes Antillas hasta el sur de Brasil, norte de Argentina y Paraguay (Espinosa-Flores *et al.*, 2011).

El endemismo del género *Anthurium* en México es alto, con un total de 41 especies, de las cuales 26 son endémicas. Las principales especies que se cultivan y comercializan en México son: *Anthurium andreanum* Lind, *Anthurium scherzerianum*, *A. crystallinum*, *Anthurium cubense* y *A. recusatum* (*A. crassinervium*); las tres primeras son exóticas y las últimas dos nativas (Hernández, 2004). *A. andreanum* es la especie más importante desde el punto de vista económico (Gantait y Mandal, 2010).

2.1.1 Ubicación taxonómica

Filo: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Arales

Familia: Araceae

Sub-familia: Pothoideae

Género: *Anthurium*

2.1.2 Propagación de anturio

La propagación se puede realizar por semilla; sin embargo, su germinación es lenta (15 a 25 días) y poco eficiente, ya que se pierde rápidamente. Asimismo, las plantas generadas presentan alta variabilidad genética que afecta negativamente su comercialización (López-Puc, 2013). Los anturios también pueden propagarse por estacas o acodos, por división (hijuelos), por esquejes de punta o cabeza (corte generalmente de la yema terminal, punta) y por micropropagación *in vitro* (Hernández, 2004; SIAP, 2017). Actualmente, la mejor alternativa para la propagación de anturios es por cultivo *in vitro*, ya que constituye un método rápido y efectivo, al permitir obtener grandes cantidades de plantas utilizando poco material; además, las plantas presentan las mismas características del progenitor (López-Puc, 2013; SIAP, 2017).

2.2 Técnicas de mejoramiento genético

La búsqueda de nuevos genes, el aprovechamiento de la diversidad genética disponible y resultados puntuales en la mejora para caracteres específicos, han sido objeto de estudio para el mejoramiento genético (Cornide, 2001).

Existen dos técnicas principales para las manipulaciones genéticas: por ingeniería genética y por métodos convencionales. La ingeniería genética implica el cambio dirigido de una secuencia de genes para producir un resultado específico, a un huésped apropiado mediante procesos complejos conocidos como tecnología de ADN recombinante. A este respecto, los genes que codifican proteínas de interés, se identifican, se aíslan, se insertan en un sistema vector para que se transfiera

a través de un sistema biológico (generalmente *Agrobacterium tumefaciens*) o biobalística y así obtener plantas genéticamente modificadas. Los métodos convencionales, se basan en la selección de poblaciones que cumplan con ciertas características deseables, lo que permite posteriormente realizar cruces para obtener híbridos de dos individuos sexualmente compatibles. Sin embargo, este es un método laborioso ya que la recombinación es aleatoria y requiere que se produzca un gran número de híbridos intermedios antes de que se obtengan aquellos con las características deseadas (Bleotu *et al.* 2018).

En los últimos años, la tecnología de mutagénesis *in vitro* se ha aplicado con más frecuencia al incremento de la calidad y al mejoramiento de los rasgos de resistencia, lo que ha acelerado el mejoramiento de los cultivos y la innovación de germoplasma (Xu *et al.*, 2012). Hasta la fecha, hay al menos 3,281 variedades mutantes registradas de los principales productos agrícolas, entre ellos 46 son poliploides inducidos por colchicina (Eng y Ho, 2018). Respecto al impacto actual de la mutagénesis, la Sociedad Mexicana de Fitogenética (SOMEFI) menciona que existen variedades mutantes de cultivos como arroz, trigo, algodón, colza y girasol, ajonjolí y toronja, y 552 variedades de plantas ornamentales, en Asia, Europa y Norteamérica (Cruz-Izquierdo, 2012). En México esta técnica se ha aplicado a cultivos de amaranto, huauzontle, frijol, aguacate, limón mexicano, mango frijol chino, maíz, jatropha, y algunas ornamentales como heliconia, nochebuena y nardo.

2.3 Mejoramiento en ornamentales

Las plantas ornamentales son económicamente importantes en todo el mundo. Se han empleado diversas estrategias para incrementar la variación de color, la vida útil y resistencia a

enfermedades. El mejoramiento genético de estas especies se ha basado principalmente en métodos de cruzamiento, reproducción de mutaciones, e ingeniería genética (Kishi-Kaboshi *et al.*, 2018).

2.4 Mutagénesis

El trabajo pionero de Herman Muller en 1927 inicio el campo de la mutagénesis y muchos laboratorios comenzaron a explorar el potencial de la radiación ionizante y la luz ultravioleta para causar mutaciones. La mutagénesis química comenzó globalmente después de la segunda guerra mundial y ha ganado popularidad en la investigación genética de plantas en el último siglo, como una herramienta poderosa para inducir la variación genética (Zambelli *et al.*, 2015; Takahashi, 2018).

Forster y Shu, (2011) han descrito a la mutagénesis como el proceso por el cual la información genética de un organismo se modifica de manera estable en la naturaleza como resultado de errores en la reparación del ADN, proceso por el cual se generan las mutaciones.

El uso de técnicas de mutación en combinación con tecnología de cultivo *in vitro* puede considerarse como un “sistema ideal” para el mejoramiento de cultivos debido a las siguientes razones: las plantas producidas mediante técnicas de cultivo, ya sean haploides o haploides duplicadas, pueden expresar todas las mutaciones, recesiva o dominante, por lo tanto, la detección de mutantes recesivos también es posible en la primera generación, y los mutantes pueden fijarse rápidamente. Proporciona una gran población disponible para los procesos de mutación y, por lo tanto, aumenta la probabilidad de identificar los mutantes beneficiosos; además, es una técnica utilizada para mejorar los rasgos cualitativos y cuantitativos en las plantas contra diversos tipos de estrés (Xu *et al.*, 2012).

2.5 Mutaciones

Las mutaciones son cambios en la secuencia de los genes o la estructura de los cromosomas (González-Jiménez, 2004) que generan nuevas variantes (alelos) (Kharkwal, 2012). Son una fuente importante de variabilidad genética y pueden ocurrir de forma espontánea o inducida mediante estímulos físicos o sustancias químicas (mutágenos) (González-Jiménez, 2004; Messmer *et al.*, 2015). Las mutaciones espontáneas son cambios hereditarios en la secuencia del material genético que se producen en ausencia de causas exógenas (Foster, 2013), mientras que las mutaciones inducidas se deben a factores mutagénicos extrínsecos (Shibai *et al.*, 2017). Los fitomejoradores principalmente utilizan la técnica de mutagénesis inducida (Xu *et al.*, 2012). Una mutación inducida se lleva a cabo a través de un mutágeno que es un agente que causa cambios irreversibles hereditarios (mutaciones) en el material genético, el ácido desoxirribonucleico (ADN) (Schrader, 2016).

2.6 Agentes mutagénicos físicos

Los mutágenos físicos incluyen radiación electromagnética, como rayos gamma, rayos X y luz UV, y radiación de partículas, como neutrones rápidos y térmicos, partículas beta y alfa (Kodym y Afza, 2003), el poder de penetración varía entre ellos (Gutiérrez *et al.*, 2002).

2.6.1 Radiación ionizante

La radiación ionizante puede ser corpuscular (partículas subatómicas, alfa, beta y neutrones) con mayor capacidad de ionización, pero con penetración en la materia limitado, o electromagnética (rayos X y rayos gamma). Los rayos gamma son la forma más energética de radiación electromagnética poseen un nivel de energía de 10 a varios cientos de kiloelectrones voltio (keV),

tienen un poder de penetración más alto que los rayos alfa y beta; dicho poder radica en su capacidad para depositar energía en los átomos o moléculas que atraviesan. Lo anterior ocasiona que produzcan gran cantidad de alteraciones de manera azarosa en moléculas tan importantes como el ADN, por lo que incrementa la posibilidad de que se induzcan mutaciones (González-Jiménez, 2004).

Los efectos radiobiológicos son el resultado de exponer las plantas a dosis cortas e intensas (agudas) durante una etapa particular de desarrollo ya sea a rayos γ , β , o a neutrones térmicos o a niveles variables de irradiación continua (crónica) (Gunckel, 1956). RI (radiación ionizante) induce daños en el ADN directa e indirectamente; los tipos de daño en el ADN incluyen rompimiento de la hebra, sitios abásicos (pérdida de bases), bases oxidadas y enlaces cruzados de proteínas del ADN (roturas de doble cadena que pueden provocar reordenaciones cromosómicas o muerte celular). Las respuestas generales a los daños en el ADN en las células incluyen la detención del ciclo celular o la activación del punto de control (que son mecanismos moleculares o cascada de señalización que garantiza una sucesión ordenada de eventos del ciclo celular), (Goodman, 2008), la activación transcripcional, reparación del ADN o muerte celular programada (Kim *et al.*, 2018).

2.6.2 Radiación gamma

La radiación gama es un tipo importante de radiación ionizante debido a su alta capacidad de penetración y alta energía. Cuando los organismos se exponen a radiación gamma, el daño al ADN y a los tejidos se puede infligir de manera directa o indirecta. La radiación gamma puede causar daño al interactuar directamente con las macromoléculas, lo que posiblemente lleve a oxidaciones de lípidos, inactivación de enzimas, lesiones de ADN y rompimiento de la doble cadena de ADN.

Además, la radiación gamma, a través de la radiólisis del agua puede dar lugar a la formación de especies de oxígeno (H_2O^+ , $\text{H}\cdot$, $\cdot\text{OH}$) que, a su vez, pueden causar daño celular. El radical hidroxilo es una molécula reactiva y de vida corta que puede causar numerosas formas de daño celular y muerte celular (Van de Walle *et al.*, 2016; Gonzáles-Jiménez, 2004).

Durante la mutagénesis inducida por radiación ionizante los cambios en el ADN pueden ser de tres tipos: 1) intragénicos (mutaciones puntuales dentro de una secuencia de gen), 2) intergénicos (inversiones, deleciones, duplicaciones, translocaciones de ADN) y 3) cambios en el número de cromosomas (Caplin y Willey, 2018).

2.7 Agentes mutagénicos químicos

A diferencia de las radiaciones ionizantes donde las moléculas son afectadas indiscriminadamente, los mutágenos químicos suelen ser más específicos (Prina *et al.*, 2010). Los agentes químicos causan principalmente mutaciones puntuales (Henikoff y Comai, 2003). Los agentes alquilantes son los compuestos químicos más utilizados en la mutagénesis de plantas; algunos agentes alquilantes particulares son: etilmetasulfonato (EMS), dietilsulfato (DES), etilenimina (EI), N-metil-N¹-nitro-N-nitrosoguanadina (MNNG) y N-etil-N-nitrosourea (ENU), colchicina, entre otros (Maluszynski *et al.*, 2017; Gutiérrez *et al.*, 2002; Prina *et al.*, 2010).

2.7.1 Colchicina

Es un alcaloide natural que se extrae de las plantas de *Colchicum autumnale* L. comunmente conocida como planta azafrán de la pradera (Planchais *et al.*, 2000). La colchicina se une a las tubulinas (subunidades de los microtúbulos), lo que evitará la orientación y la agregación de las subunidades de las tubulinas en el microtúbulo. Los microtúbulos se componen de dos unidades

diferentes que son α -tubulina y β -tubulina. Estas unidades hetero son responsables de la estabilidad y disposición de la estructura de los microtúbulos (polimerización de las tubulinas) durante el ciclo celular y la movilidad intracelular, especialmente de los cromosomas.

La colchicina desestabiliza y despolimeriza los microtúbulos cuando se co-polimeriza con β -tubulina dentro de los microtúbulos, evitando el ensamblaje de las subunidades que conforman el microtúbulo. El fracaso de la formación de microtúbulos durante la mitosis detendrá el ciclo celular en la metafase, lo cual evitará que los pares de cromosomas se separen y se muevan hacia el polo opuesto durante la anafase. La falla en la citocinesis al final del ciclo celular hará que dos conjuntos de cromosomas permanezcan en un solo núcleo dando lugar a células poliploides (Figura 1) (Eng y Ho, 2018; Alberts *et al.*, 2006; Toctaguano, 2018).

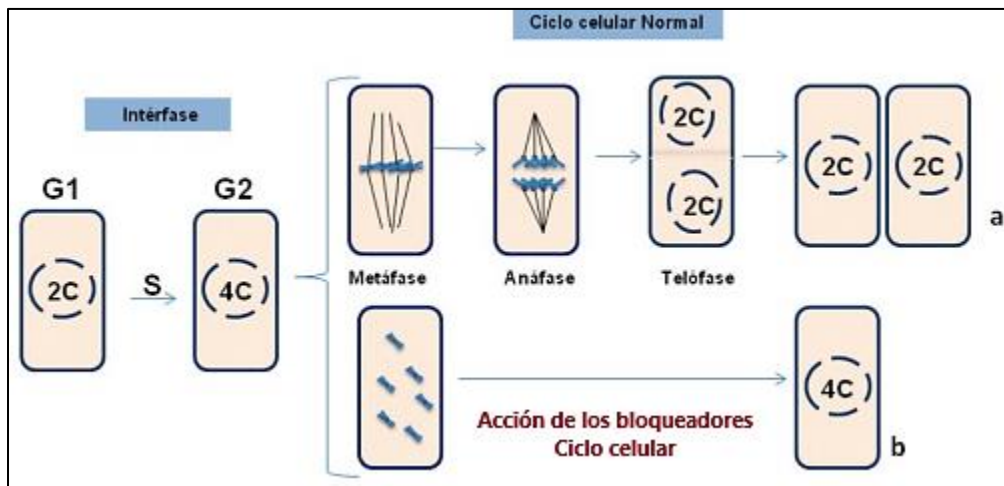


Figura 1. Mecanismo de acción de la colchicina (Cristina-Pereira *et al.*, 2012).

La ventaja más importante de la poliploidía es que las plantas suelen tener mejor rendimiento y mayor altura, tamaño de los órganos vegetales y aumento de la biomasa en general. En algunas especies, los autopoliploides (organismo que contiene tres o más juegos de cromosomas homólogos derivados del mismo individuo o bien de un individuo perteneciente a la misma

especie) han demostrado más vigor de crecimiento y mayor tolerancia a ciertas enfermedades (Imery y Cequea, 2001; Alcantar, 2014; Salazar *et al.*, 2018).

La técnica de la colchicina como agente antimitótico, puede generar variaciones genéticas mediante la duplicación de cromosomas (Wu *et al.*, 2012), esto debido a su efecto en una etapa temprana de la anafase que altera la mitosis deteniendo la división celular; de esta forma los cromosomas se duplican pero no se produce mitosis, aumentando así la base del genoma (Mustafa *et al.*, 2017); la colchicina también puede ocasionar pérdida de cromosomas, reorganización o mutación genética (Luckett, 1988).

2.8 Tipos de mutaciones

A nivel de gen (mutación de gen): cambios en la estructura molecular del gen.

a) Mutación del número de copias de un gen: pueden ocurrir en cualquier sitio en el genoma, pueden reducir o aumentar la expresión de estos genes.

b) Mutaciones no estructurales: cambios en la secuenciación de ADN, implica cambios en la secuencia de genes de los pares de bases. Incluyen: 1) Mutaciones puntuales: implican cambio de una sola base y dan como resultado codones sin sentido (codones para un aminoácido diferente), silenciosos (sin cambios en la codificación de aminoácidos) y sin sentido erróneo (el codón de aminoácidos se cambia a un codón de fin de la traducción.); 2) Inserción y delección de uno o más nucleótidos conocidos como indeles; 3) Mutaciones en regiones específicas de los genes como promotores, intrones y regiones 3' no traducidas; 4) Inserción de transposones (secuencias de ADN que pueden transponerse, moverse dentro y fuera de los cromosomas), también conocida como mutagénesis insercional. Los transposones a menudo se activan por el estrés ambiental y su

actividad puede bloquearse o activar genes mediante la inserción o la salida de genes (Lundqvist *et al.*, 2012).

A nivel cromosómico: cambios en la estructura cromosómica (Donini y Sonnino, 1998), como la ruptura transversa del cromosoma, inversiones, traslocaciones y deleciones etc., así como la posible formación de nuevos tipos de cromosomas (Cubero-Salmerón, 2013).

A nivel de genoma (mutación genómica) (Donini y Sonnino, 1998): cambios en el nivel de ploidía pueden ser haploide, diploide, triploide, tetraploide, etc., los cambios en ploidía pueden ser por: a) reducción o b) duplicación del genoma (autoploide), cuando un organismo contiene tres o más juegos de cromosomas homólogos derivados del mismo individuo o bien de un individuo perteneciente a la misma especie; o adición del genoma (aloploide), aquellos organismos que contienen juegos de cromosomas no-homólogos debido a la hibridación entre diferentes especies (Alcántar, 2015; Lundqvist *et al.* 2012).

2.8.1 Mutantes fisiológicos

Diversos trastornos fisiológicos pueden dar como resultado lo que parece ser “mutantes fenotípicos”; sin embargo, éstos no son mutantes genéticos, sino epigenéticos, los cuales generalmente, no heredan la mutación a su progeñe. Muchos efectos epigenéticos son poco conocidos y el término incluye muchas aberraciones fisiológicas que son causadas por factores distintos a los genéticos, como la metilación. La metilación del ADN es un evento común en las plantas generadas por cultivo de tejidos (Lundqvist, 2012). Está vinculada generalmente con el silenciamiento de transposones y elementos repetitivos (Gutiérrez-Velázquez, 2015). La condición puede ser transitoria, en cuyo caso las plantas regeneradas pueden volver al fenotipo normal o el fenotipo anormal puede persistir durante toda la vida de un individuo. Algunos cambios

epigenéticos pueden ser hereditarios cuando los patrones de metilación no se reinician completamente en los gametos después de la fertilización (Lundqvist, 2012).

En los últimos años, el rápido progreso de la tecnología ha conducido a la revelación de la regulación epigenética. Dos métodos de metilación global que se usan comúnmente son los polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados sensibles a la metilación (meAFLP), cortan ADN con enzimas de restricción. Otros métodos de detección de grupos de metilo incluyen: HPLC-MS/MS, detección de grupos de metilo en muestras de ADN hidrolizado, Ensayo 5 mC ELISA (inmunosorbente ligado a enzimas), MeDIP seq (inmunoprecipitación de ADN metilado junto con la secuenciación de la próxima regeneración), WGBS (secuenciación de bisulfito de genoma completo), RRBS (secuenciación de bisulfito de representación reducida (Horemans *et al.* 2019). Recientemente, en la investigación de la epigenética de plantas se han adoptado tecnologías emergentes de secuenciación, que incluyen la secuenciación real de una sola molécula y la tecnología Oxford Nanopore (Kapazoglou *et al.* 2018).

2.9 Detección de mutantes fisiológicos: marcadores morfológicos

Se basan en caracteres morfológicos que se monitorean visualmente (Andersen y Lübberstedt, 2003; Tomas *et al.*, 2013). Establecen las bases para identificar y diferenciar variedades, pero presentan las siguientes limitantes: su determinación es tardada, pueden ser complejos, limitados, subjetivos, influenciados por el ambiente, caros e involucran estados de desarrollo específicos del cultivo (Onamu, 2012). El examen visual y la utilización de un analizador de imágenes posibilitan la diferencia entre fenotipos normales y mutantes.

2.10 Detección de mutantes genéticos: marcadores moleculares

Con el advenimiento de las técnicas modernas de la biología molecular, surgieron diversos métodos de detección de polimorfismo genético directamente a nivel ADN. Los marcadores moleculares permiten detectar mutaciones en diferentes tipos de secuencias y, además, no son influenciados por el ambiente, ni por los estados fenológicos de la planta. Proveen gran cantidad de información, son altamente polimórficos, cubren todo el genoma y su evaluación es posible en estadios muy tempranos de desarrollo, utilizando pequeñas porciones de material biológico que no destruyen el individuo. Además, no presentan interacciones intergénicas, tienen mayor reproducibilidad y presentan herencia simple y a menudo codominancia (Caruso *et al.*, 2015).

Los enfoques que se han usado para entender la variación genética incluyen polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismo de ADN amplificados aleatoriamente en mayor a menor grado (RAPD y AFLP), repetidos de secuencias internas (ISSR), microsatélites y secuencias de ADN. La elección de los marcadores depende del modelo de mutación al que se ajustan y por ello a los algoritmos de inferencia de los parámetros genéticos, características como tipo de herencia, y de manera secundaria la facilidad en su uso y costo (Piñero *et al.*, 2008).

2.10.1 Microsatélites

Los microsatélites o secuencias simples repetidas (*Simple Sequence Length Polymorphism SSRs*) son secuencias de ADN formadas de 1 a 4 pares de bases o más que se repiten entre 10 y 100 veces en el genoma (Rentaria-Alcántara, 2007; Martínez *et al.*, 2012). Estos loci se encuentran en regiones codificantes y no codificantes del ADN y es probable que se formen por eventos de rompimiento que generan polimorfismos (Rentaria-Alcántara, 2007). Se detectan mediante la amplificación por PCR, usando iniciadores específicos de 20 a 30 pb de longitud que hibridan con

la región que flanquea al tandem (secuencias repetidas de 9 a 100 pares de bases) de repeticiones (microsatélites). La base genética del polimorfismo detectado en microsatélites se basa en la variabilidad del número de repeticiones en tandem y, consecuentemente en el tamaño del microsatélite amplificado en individuos de una especie (Martínez *et al.*, 2012).

Los microsatélites presentan ventajas sobre otros marcadores genéticos como los AFLPs, RAPDs, RFLP, debido a que tienen el grado más alto de polimorfismo, segregan de manera mendeliana, son codominantes, la presencia de un solo locus genético por microsatélite es clara y fácil de interpretar y son selectivamente neutros (Rentarúa-Alcántara, 2007).

2.11 Identificación de tejidos u órganos poliploides

Por su morfología y desarrollo: características morfológicas identificadas a simple vista, el poliploide puede presentar gigantismo, aunque no siempre; existe un nivel de ploidía por encima del cual ya no hay un aumento de tamaño. Asimismo, suelen desarrollarse a menor velocidad que los diploides (Cubero-Salmeron, 2013; Eng y Ho, 2018).

Por caracteres citológicos: sus células suelen ser de mayor tamaño o diferentes en forma, cuanto mayor sea el nivel de ploidía mayor será el tamaño, densidad de los estomas y el número de cloroplastos de la célula (Eng y Ho, 2018) y de los granos de polen.

Por el conteo de cromosómico: consiste en un recuento de cromosomas mediante una técnica citológica. Asimismo, la técnica de citometría de flujo evalúa un gran número de núcleos (100-10000 células por segundo) determinando la homogeneidad del conjunto del genoma en todos los núcleos de toda la muestra. (Cubero-Salmeron, 2013; Eng y Ho, 2018).

2.11.1 Citometría de flujo

La citometría de flujo es una herramienta analítica de alto rendimiento que detecta y cuantifica células o núcleos marcados con sondas fluorescentes a medida que se mueven en una estrecha corriente de líquido a través de un haz de luz (Kron *et al.*, 2007). El método implica la preparación de núcleos intactos aislados en suspensión, cuyo ADN se tiñe usando un fluorocromo específico de ADN y se cuantifica la cantidad de luz emitida por cada núcleo. El resultado del análisis generalmente se muestra en forma de un histograma de intensidad de fluorescencia relativa, que representa el contenido relativo del ADN. La ploidía se correlaciona con el contenido del ADN, se puede determinar solo después de una comparación con los núcleos de un estándar de referencia, cuyo tamaño de genoma es conocido (Eng y Ho, 2018).

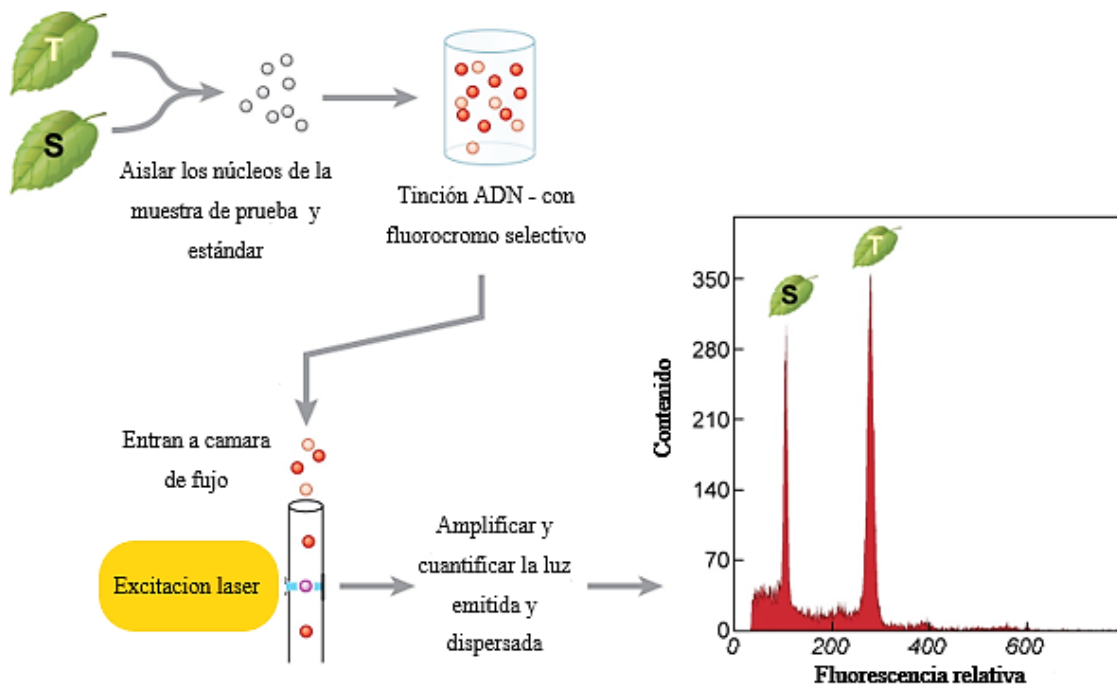


Figura 2. Procedimiento de análisis por citometría de flujo (Kron *et al.*, 2007).

2.12 Mutantes en ornamentales

De acuerdo a la base de datos de variedades mutantes FAO/IAEA, los cultivares mutantes de plantas ornamentales inducidas con haces de iones en la actualidad se han desarrollado en Japón (Yamaguchi, 2018), así como también sobresale la India, los países Bajos y Alemania en generar nuevas variedades mutantes (Mba, 2013). Algunos mutantes de plantas ornamentales generadas por mutagénesis inducida son: margarita africana (*Osteospermum* L.) cuyo color de la flor se alteró naranja oscuro, así como en Ciclamen (*Cyclamen* L.) color alterado, rosa salmón (Yamaguchi, 2018), *Prunus* L., con características del diámetro de la flor más grande. Otras especies ornamentales que han sido sometidas a la mutagénesis inducida son: *Chrysanthemum* coloración de la flor, *Lilium* sp., con anteras torcidas que producen menos polen, entre otras como orquídeas, rosa, pelargonio, canna y clavel en características de color de la flor (Mehdi, 2018; Yamaguchi, 2018).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología y Patología de Semillas del Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo localizado en Texcoco, Estado de México, así como en las instalaciones del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) ubicado en la Carretera Toluca-La Marquesa s/n Ocoyoacac, Estado de México.

El trabajo consistió en cuatro etapas: a) obtención de vitroplantas a través de organogénesis indirecta de *Anthurium andreaanum*, b) tratamientos mediante colchicina y radiación con cobalto 60 en explantes obtenidos de las vitroplantas de *A. andreaanum*, c) regeneración de brotes adventicios y d) evaluación y análisis de presuntos mutantes mediante citometría de flujo para detectar poliploidía (Figura 3).

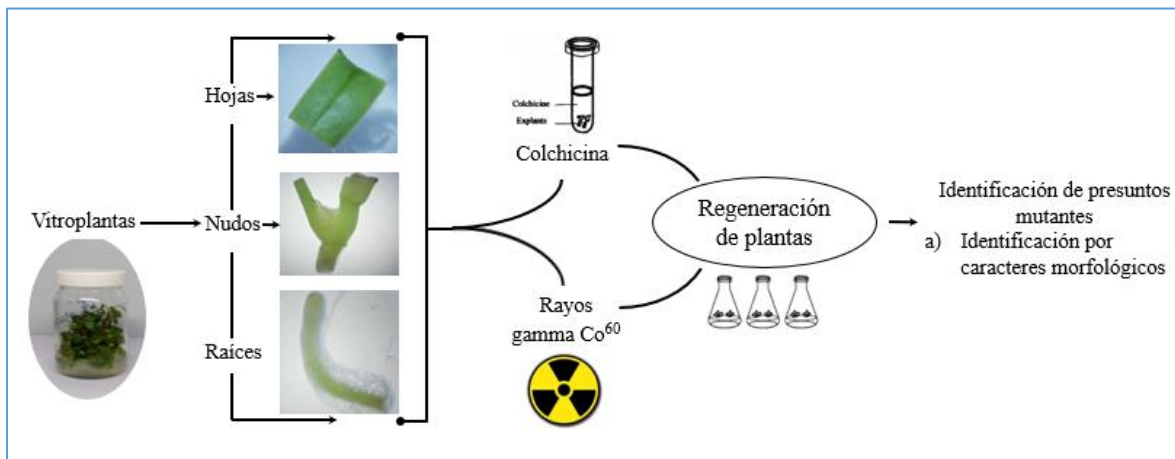


Figura 3. Etapas que se llevaron a cabo en la presente investigación para inducir e identificar presuntos mutantes de *Anthurium andreaanum*.

3.1 Regeneración de vitroplantas: Organogénesis indirecta

3.1.1 Desinfestación

Se seleccionaron hojas de plantas de aproximadamente 1 año de edad, las cuales fueron desinfestadas en una solución fungicida que contenía una mezcla de 0.2 % de Prozycar® (carbendazim) y 0.2 % de Promyl® (benomilo) durante 30 min; posteriormente, las hojas se colocaron en una solución con hipoclorito de sodio al 1.2 % de ingrediente activo más 90 mL de tween ®, y 45 mL de nanopartículas de plata (Agrovit®) durante 30 min. Finalmente, las hojas fueron lavadas con agua destilada esterilizada tres veces, se atomizaron por ambos lados con alcohol al 70 % y se lavaron con agua destilada estéril.

3.1.2 Siembra

De las hojas previamente desinfestadas se obtuvieron segmentos de aproximadamente de 1 cm², mismos que fueron colocados en cajas Petri con 30 mL de medio de inducción (MI) elaborado con las sales de Murashige y Skoog (1962) (MS), 1 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 1 mg L⁻¹ de bencilaminopurina (BAP), 30 g L⁻¹ de sacarosa y 7 g L⁻¹ de agar. El pH del medio se ajustó a 5.8 y se esterilizó durante 20 min en una autoclave a 121°C, antes de vaciarse (30 mL) en cajas Petri de 90 X 15 mm estériles.

Los cultivos se incubaron en una cámara de ambiente controlado en oscuridad total a 26 ± 2 °C durante cinco meses.

3.1.3 Regeneración de brotes adventicios

Los explantes se transfirieron a un medio de regeneración (MR) de brotes elaborado con las sales MS, 1 mg L⁻¹ de 6-furfurilaminopurina (cinetina), 0.3 mg L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA), 0.3 mg L⁻¹ de ácido giberélico (AG₃), 30 g L⁻¹ de sacarosa y 7 g L⁻¹ de agar.

3.1.4 Regeneración de vitroplantas

Los explantes que formaron brotes fueron cultivados durante 4 semanas en un medio que contenía sales MS, 0.5 mg L⁻¹ de cinetina y 0.3 mg L⁻¹ de nitrato de plata (AgNO₃). Posteriormente, los explantes se dividieron y se subcultivaron (cada cuatro semanas) en el mismo medio antes descrito hasta que alcanzaron 6-8 cm de longitud. Los cultivos fueron incubados a 26 ± 2 °C y 16 h de luz blanca fría fluorescente (60 μmol m⁻² s⁻¹).

3.2 Exposición de explantes a colchicina y radiación gamma cobalto⁶⁰

Cuando las vitroplantas tenían 7 meses de edad (6 a 8 cm de longitud), de éstas se obtuvieron los explantes de hoja (0.5 cm²), nudo (0.5 cm) y puntas de raíz (0.5 cm), para luego exponerlos a los tratamientos con colchicina y radiación gamma cobalto⁶⁰.

3.2.1 Colchicina

Se preparó una solución de colchicina (Sigma Aldrich) al 0.01 % y se esterilizó a través de un filtro milipore (poro 40 μM). Posteriormente, los explantes de hoja, nudo y raíz se sumergieron en la solución de colchicina durante 0 (testigo), 2, 3 o 4 horas. Transcurrido este tiempo, los explantes se retiraron de la solución, se lavaron con agua destilada esterilizada y se dejaron secar durante 3 minutos sobre papel absorbente esterilizado. Finalmente, los explantes fueron colocados en cajas

Petri de 90 x 15 mm con 30 mL del medio de inducción (MI) antes descrito, en el que permanecieron durante 12 semanas en oscuridad a $26 \pm ^\circ\text{C}$.

3.2.2 Radicación gamma Cobalto⁶⁰

Los explantes de hoja, nudo y raíz se colocaron en cajas Petri de 90 x 15 mm las cuales contenían 30 mL medio de inducción (MI). Las cajas se introdujeron en un irradiador LG-01 transelectro y se expusieron a 0, 3, 6, 9, 12 o 15 Gray (Gy) de radiación gamma. Posteriormente, los explantes fueron transferidos al mismo medio de inducción fresco en que se cultivaron durante 12 semanas en oscuridad total y $26 \pm 2^\circ\text{C}$.

3.2.3 Regeneración de brotes a partir de explantes expuestos a colchicina y radiación gamma cobalto⁶⁰

Los explantes se retiraron del medio de inducción y se colocaron cajas Petri de 90 x 15 mm que contenían 30 mL del medio de regeneración (MR) antes descrito; los cultivos se incubaron a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ y 16 horas de luz blanca fría fluorescente ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

3.2.4 Variables evaluadas

Después de 12 semanas de que los explantes se expusieron a la colchicina o la radiación gamma se evaluaron las siguientes variables: dosis letal media (DL_{50}), que corresponde a la dosis en la que 50 % de los explantes muere, supervivencia de los explantes, el número de explantes que formó callo y el número de explantes que formó brotes. Asimismo, después de 20 semanas de exposición a los mutágenos se cuantificó el número de brotes por explante.

3.3 Diseño experimental

Para probar el efecto de la colchicina y rayos gamma se utilizó un diseño factorial completamente al azar con 12 y 18 tratamientos, respectivamente. Cada tratamiento consistió de 10 repeticiones, siendo una caja Petri con cinco explantes una repetición. Para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey ($p < 0.05$). La DL_{50} se determinó a través de un Modelo de Regresión Logística.

IV. RESULTADOS

4.1 Regeneración de vitroplantas: Organogénesis indirecta

La formación de callo en los explantes de hojas se empezó a observar después de doce semanas de cultivo en el medio de inducción. Después de 28 semanas de cultivo en el medio de inducción, el callo se colocó en el medio de regeneración, en el cual las masas de callo comenzaron a formar múltiples primordios de brote. Cuando los primordios se subcultivaron en el medio de desarrollo, se convirtieron en brotes adventicios (después de 12 semanas); los brotes alcanzaron 6-8 cm de longitud y regeneraron raíces 12 semanas más tarde.

4.2 Efecto de la exposición de explantes a colchicina

4.2.1 Explantes de hoja

La colchicina afectó de manera diferencial a los explantes de hoja, nudos y raíces. Los explantes de hoja fueron los más afectados negativamente, el daño y mortandad de los mismos fue directamente proporcional al tiempo de exposición. De esta forma los explantes expuestos durante 4 h a la colchicina murieron más rápidamente; estos explantes mostraron clorosis y pequeñas áreas de color café oscuro, que más tarde causaron la muerte del explante (Figura 4). Sólo 2 % de los explantes expuestos a la colchicina sobrevivieron después de 12 semanas; sin embargo, posteriormente éstos murieron (Figura 5).

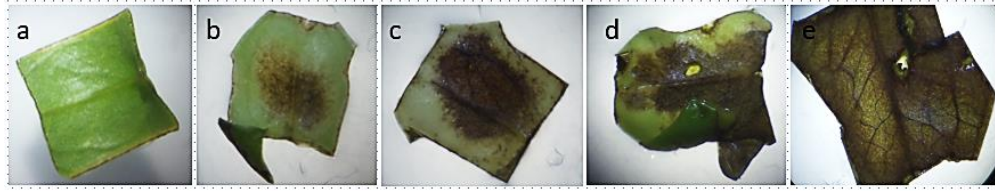


Figura 4. Daño en explantes de hoja tratados con colchicina durante 4 horas. a) 20 días, b) 28 días, clorosis, c) 36 días oxidación, d) daño severo, e) 60 días, muerte del explante.

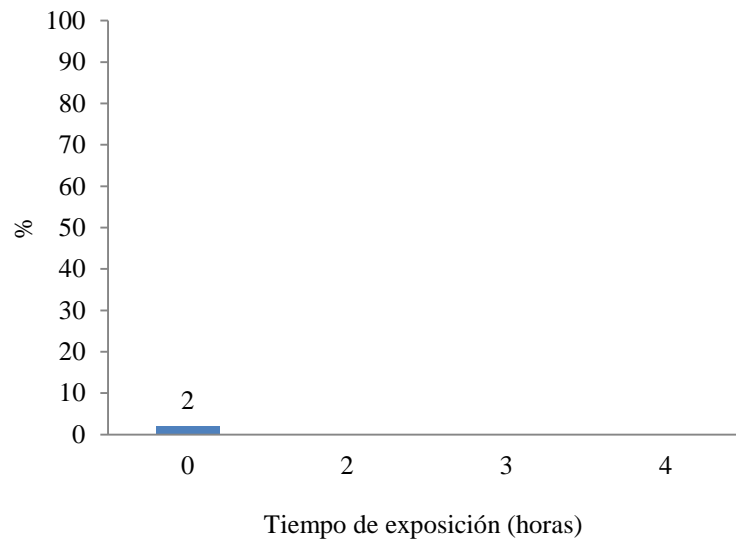


Figura 5. Supervivencia de explantes de hoja de *A. andreaenum* después de 12 semanas de exposición a colchicina.

4.2.2 Explantes de raíz

No se observaron diferencias significativas en la supervivencia de los explantes de raíz expuestos durante 2, 3 y 4 horas a la colchicina, pero si con respecto al tratamiento testigo. La supervivencia de los explantes a las 12 semanas de exposición fue superior al 60 % (Figura 6). La primera respuesta de los explantes fue la formación de callo, principalmente en la zona meristemática y en el extremo opuesto; dicho callo fue friable y de color beige (Figura 7); sin embargo, conforme se

incrementó el tiempo de exposición a la colchicina el tamaño de la masa celular se redujo. Las raíces expuestas a colchicina durante 4 h mostraron el daño más evidente, pequeñas áreas oscuras (especialmente en la zona meristemática) se presentaron al inicio, pero más tarde cubrieron todo el explante. Cuando los explantes fueron colocados en el medio de regeneración y en presencia de la luz, la tasa de supervivencia disminuyó drásticamente, las masas de callo comenzaron a tomar coloración café oscuro y murieron (Figuras 7). Las raíces expuestas a colchicina por 2 y 3 h permanecieron vivas después de 16 semanas. Solo 4 % (1 explante) de los explantes expuestos durante 2 y 3 horas a la colchicina lograron sobrevivir y formaron brotes adventicios (120 y 100 brotes, respectivamente) (Figura 8).

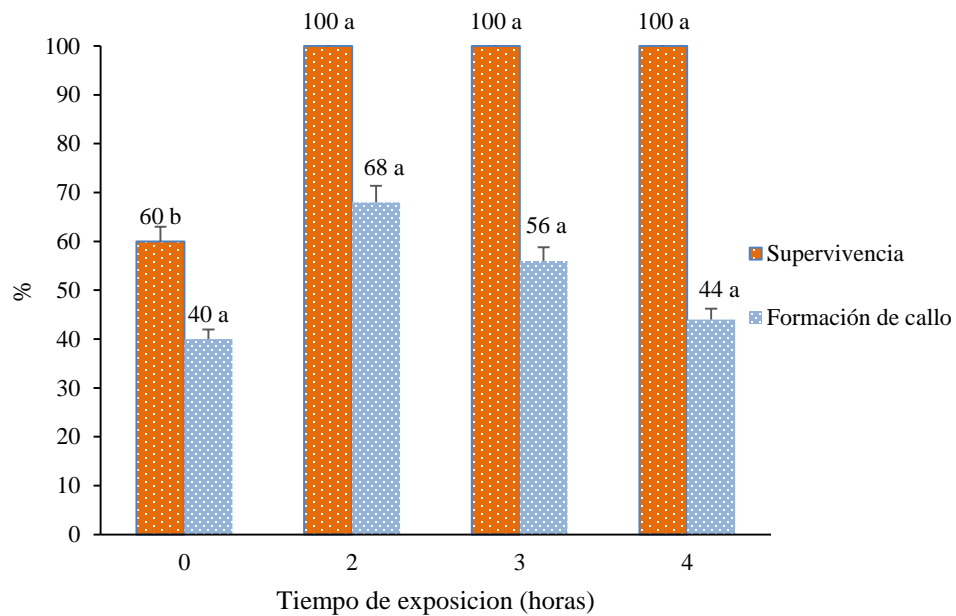


Figura 6. Efecto de la colchicina en el porcentaje de supervivencia y formación de callo de explantes de raíz después de 12 semanas.

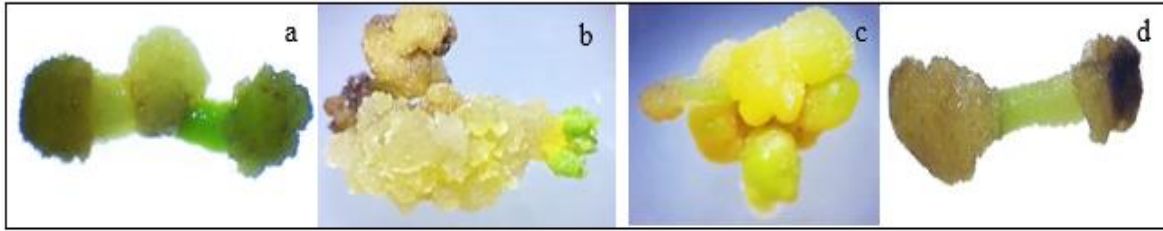


Figura 7. Formación de callo en raíces de *A. andreanum* expuestas a colchicina. a) testigo, b) 2 horas, c) 3 horas, d) 4 horas, después de 12 semanas.

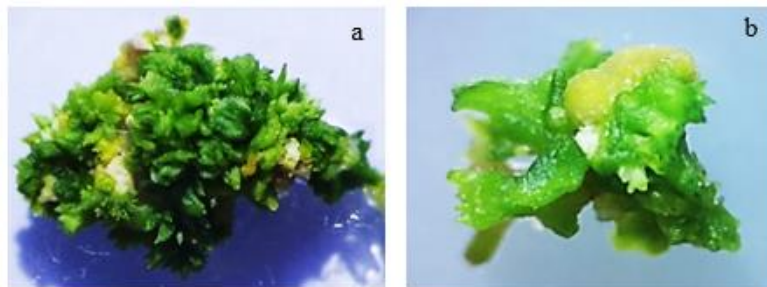


Figura 8. Formación de brotes adventicios en explantes de raíz de *A. andreanum* expuestos a colchicina durante 2 (a) y 3 horas (b).

4.2.3 Nudos

Por otro lado, la supervivencia, el porcentaje de nudos que formó callos y brotes decreció conforme aumentó el tiempo de exposición a la colchicina; sin embargo, sólo se observaron diferencias significativas para estas dos variables entre los nudos expuestos durante 4 horas a la colchicina (46 y 46 %, respectivamente) y el tratamiento testigo (86 y 86 %, respectivamente) (Figura 9). El número de brotes formados por explante fue significativamente más alto (4.4 y 3.6, respectivamente) en los que se expusieron por 2 y 3 horas que los del testigo y 4 horas de exposición (Figura 10).

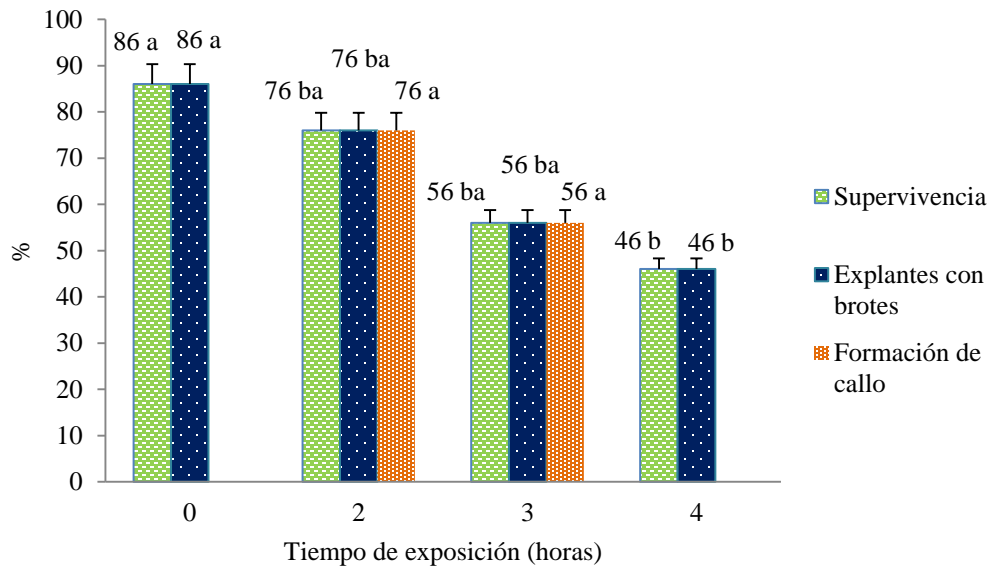


Figura 9. Supervivencia y porcentaje de explantes de nudo de *A. andreanum* que formaron brotes adventicios al exponerse a colchicina después de 12-20 semanas.

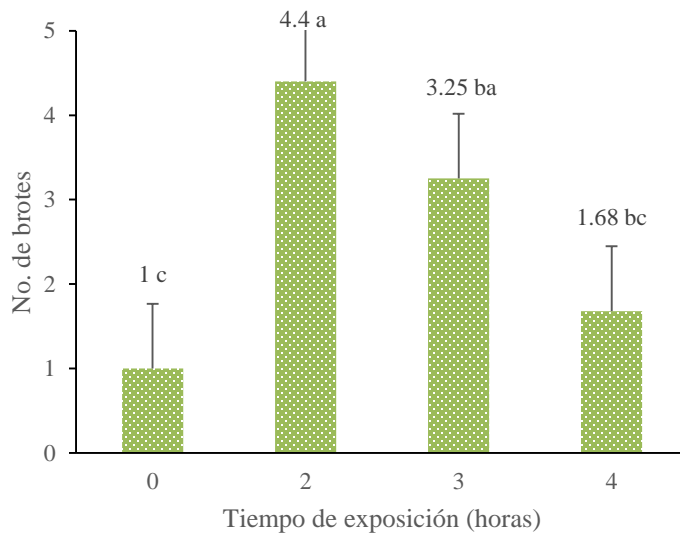


Figura 10. Número promedio de brotes adventicios por explante regenerados a partir de nudos de *A. andreanum* expuestos en colchicina, después de 20 semanas.

El modelo de regresión logística mostró que la DL₅₀ para los nudos fue de 3.89 horas (Figura 11).

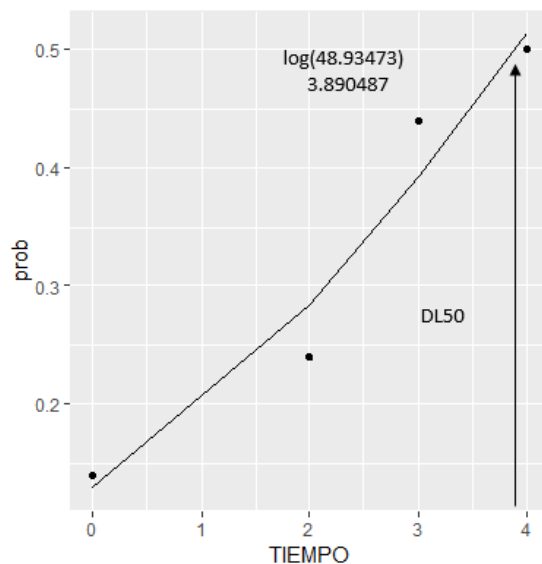


Figura 11. Diagrama logarítmico de probabilidad de respuesta tiempo-mortandad en función del tiempo, para determinar la DL₅₀ en nudos de *A. andreanum* expuestos a colchicina.

Cuando los nudos se cultivaron en el medio de regeneración de brotes, fue posible observar que particularmente la parte basal de los nudos expuestos a la colchicina durante 2 y 3 horas se engrosó considerablemente y aparencia arrosada debido a la formación de primordios de brote (Figura 12 y 13). Después de cinco meses de cultivo en el medio de regeneración, a partir de los primordios de brote se comenzaron a diferenciar los brotes adventicios (Figura 13).

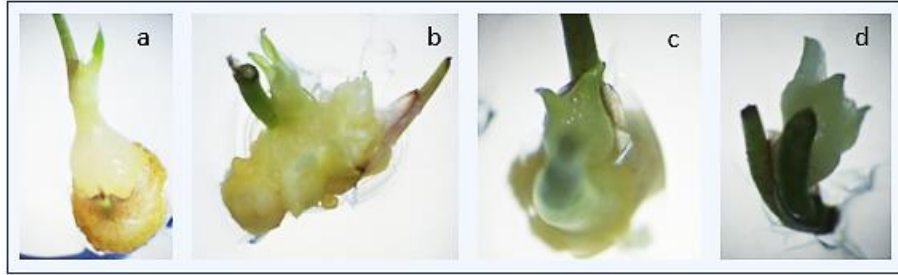


Figura 12. Nudos de *A. andreaeanum* expuestos en colchicina cultivados en medio de inducción. a) 0 horas (testigo); b) 2 horas; c) 3 horas; d) 4 horas.

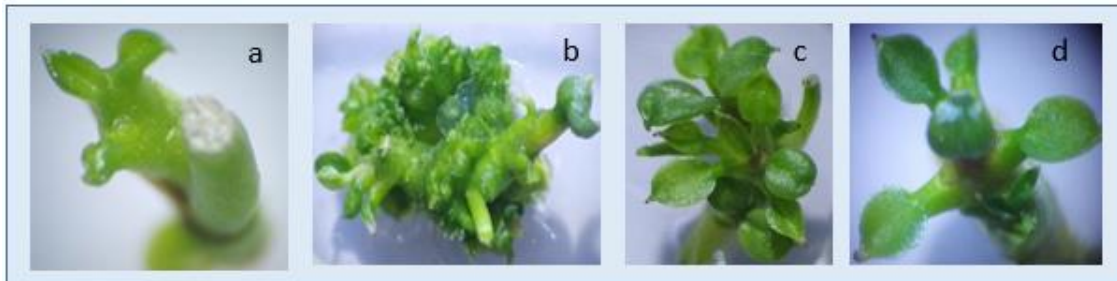


Figura 13. Nudos de *A. andreaeanum* expuestos en colchicina regenerando brotes adventicios. a) 0 horas; b) 2 horas; c) 3 horas; d) 4 horas.

4.2.4 Interacción entre tipo el tipo de explante y el tiempo de exposición a la colchicina.

La supervivencia en hojas fue nula en todos los tiempos de exposición a la colchicina. La supervivencia de los explantes de raíz expuestos a 2, 3 y 4 horas a la colchicina no fue significativamente diferente de la observada en las raíces del testigo y los nudos expuestos durante 3 y 4 horas a la colchicina (Cuadro1). Sólo lo nudos testigo y los expuestos por 4 horas no formaron; en tanto que el porcentaje de los nudos que formaron brotes del testigo solo fue significativamente diferente del de aquellos expuestos a 4 horas a la colchicina (Cuadro 1). Asimismo, el número de brotes formado por los nudos cultivados durante 2 horas en colchicina fue estadísticamente superior que el de los expuestos durante 0 y 4 horas (Cuadro 1).. Solo el 4 %

(1 explante) de las raíces expuestas a 2 y 3 horas formaron brotes adventicios (120 y 100, respectivamente).

Cuadro 1. Interacción entre tipo de explante de *A. andreanum* y tiempo de exposición a la colchicina en la supervivencia, formación de callo, porcentaje de explantes con brotes y número de brotes por explante.

Explante	Tiempo	Variables			
		Supervivencia (%)	Formación de callo (%)	Explantes con brotes (%)	No. de brotes por explante
Nudos	0	86.0 ab	0.0 b	86.0 a	1.0 c
Nudos	2	76.0 abc	76.0 a	76.0 ab	4.47 a
Nudos	3	56.0 bc	56.0 a	56.0 ab	3.25 ab
Nudos	4	46.0 c	0.0b	46.0 b	1.68 bc
Raíz	0	60.0 bc	40.0 a	ND	ND
Raíz	2	100.0 a	68.0 a	ND	ND
Raíz	3	100.0 a	56.0 a	ND	ND
Raíz	4	100.0 a	44.0 a	ND	ND

ND: no determinado. Medias con letras desiguales difieren significativamente, Tukey ($p < 0.05$)

4.3 Efecto de la exposición de explantes a radiación gamma Co^{60}

4.3.1 Explantes de hojas

Conforme aumentó la dosis de rayos gamma la supervivencia de los explantes disminuyó; el efecto de la radiación fue diferente para cada tipo de explante. Cien por ciento de los explantes de hoja expuestos a 9, 12 y 15 Gray murieron después de ocho semanas; en tanto que menos del 10 % de los explantes de los tratamientos de 3 y 6 Gy sobrevivieron después de 12 semanas; sin embargo, éstos no formaron callo ni formaron brotes adventicios (Figura 14).

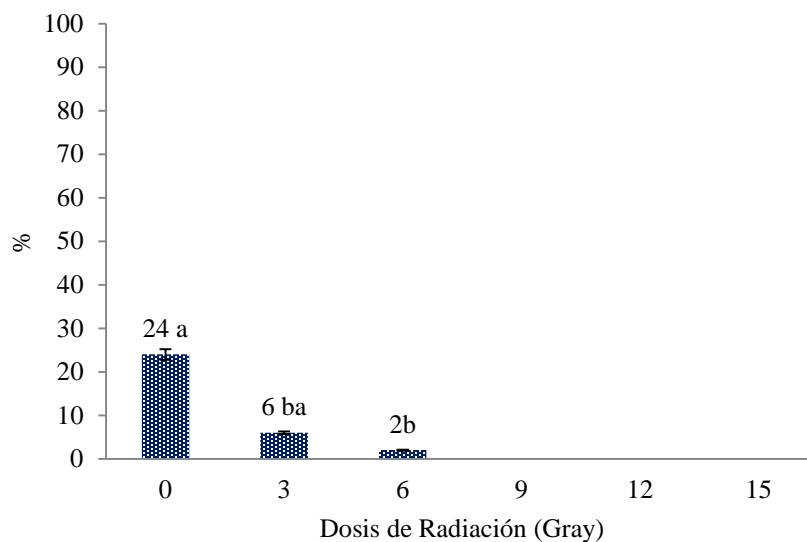


Figura 14. Efecto de la radiación gama Cobalto⁶⁰ en el porcentaje de supervivencia de los explantes de hoja de *A. andreaeanum* después de 12 semanas.

4.3.2 Explantes de raíz

Por otro lado, al igual que para los explantes de hoja, la supervivencia de los explantes de raíz fue decreciendo conforme aumentó la dosis de radiación. Sólo la supervivencia de los explantes irradiados con 12 y 15 Gy fue significativamente menor (40 y 56 %, respectivamente) que la del testigo (88.0 %) (Figura 15). La formación de callo en los explantes irradiados fue más lenta y en menor cantidad que en los explantes no irradiados. El porcentaje de explantes que formaron callos cuando se expusieron a 9, 12 y 15 Gy fue significativamente menor que el de aquellos irradiados con 3 Gy. Sólo los explantes expuestos a 3 Gy formaron brotes adventicios (8 %) (1 brote por explante) (Figura 15). Las raíces irradiadas con 9 Gy se engrosaron ligeramente, mientras que las expuestas a 12 y 15 Gy presentaron daño severo, clorosis en la zona meristemática con pequeñas áreas oscuras (Figura 17).

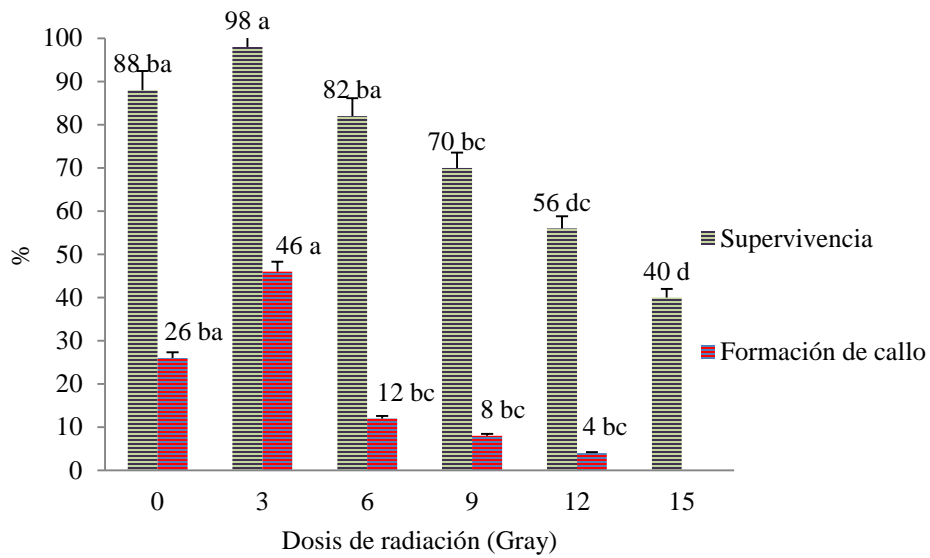


Figura 15. Efecto de la irradiación con rayos gamma Cobalto⁶⁰ en la supervivencia y formación de callo de explantes de raíz de *A. andreaeanum* después 12 semanas.

Para los explantes de raíz conforme aumento la dosis, la mortandad se incrementó. El análisis de regresión logística mostró que la DL₅₀ para los explantes de raíz fue de 12.10 Gy; en tanto que 15 Gy fue letal. (Figura 16).

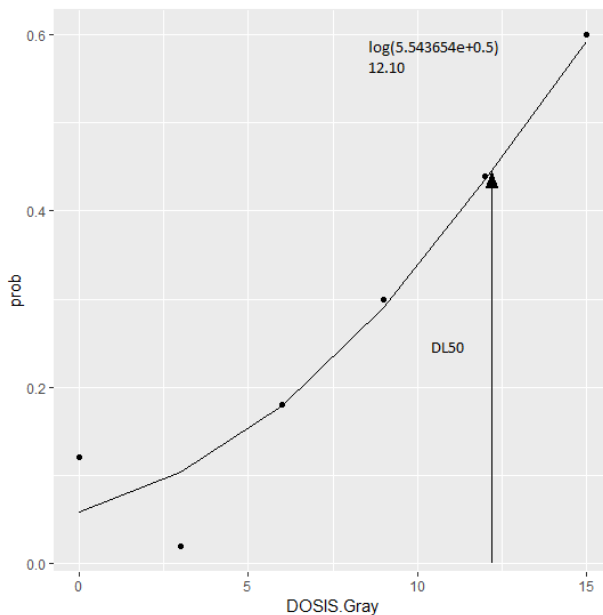


Figura 16. Diagrama logarítmico de probabilidad de respuesta dosis-mortandad en función a la dosis para determinar la DL₅₀ de los explantes de raíz de *A. andreaenum* expuestos a rayos gamma Cobalto⁶⁰.

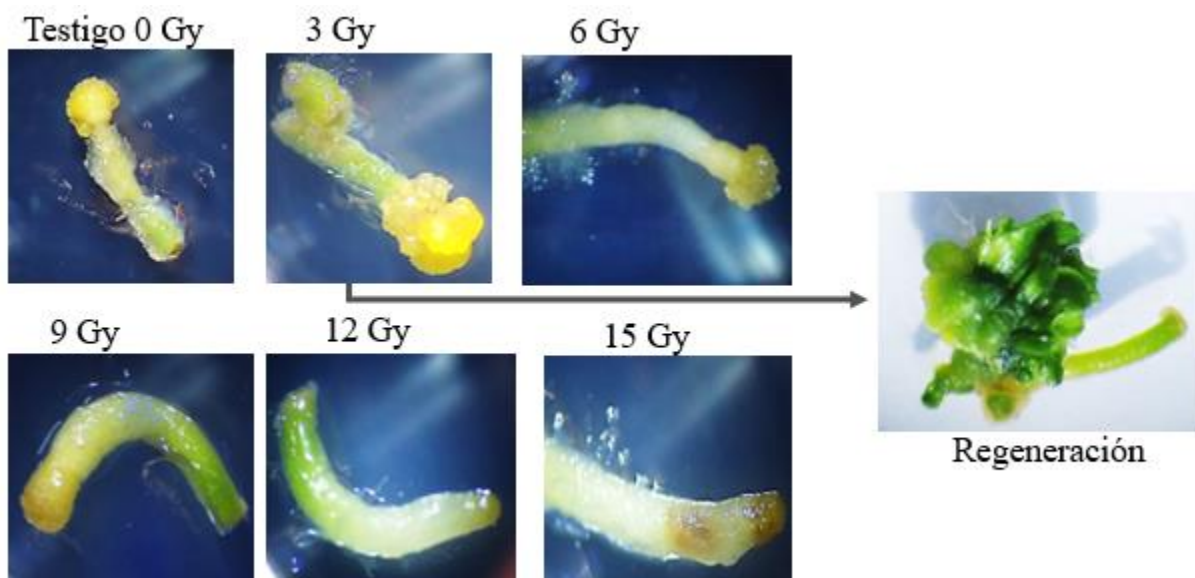


Figura 17. Respuesta de los explantes de raíz de *A. andreaenum* expuestos a distintas dosis de radiación gamma Cobalto⁶⁰.

4.3.3 Nudos

Al irradiar los nudos con rayos gamma Co^{60} , más de 90 % de éstos sobrevivieron en todos los tratamientos, sin que hubiera diferencias significativas entre ellos (Figura 18). Asimismo, al aumentar la dosis, el porcentaje de explantes que formaron brotes fue significativamente mayor en aquellos expuestos a 3 Gy y el testigo (68-74 %) que en los irradiados con 6, 9, 12 y 15 Gy (8-32 %); sólo se formó en promedio de 0.6 a 1.9 brotes por explante, excepto en los nudos expuestos a 15 Gy, los cuales perdieron su capacidad para formar nuevos brotes (Figura 20); de igual forma, el tamaño de los brotes regenerados fue disminuyendo conforme aumentó la dosis (Figura 19).

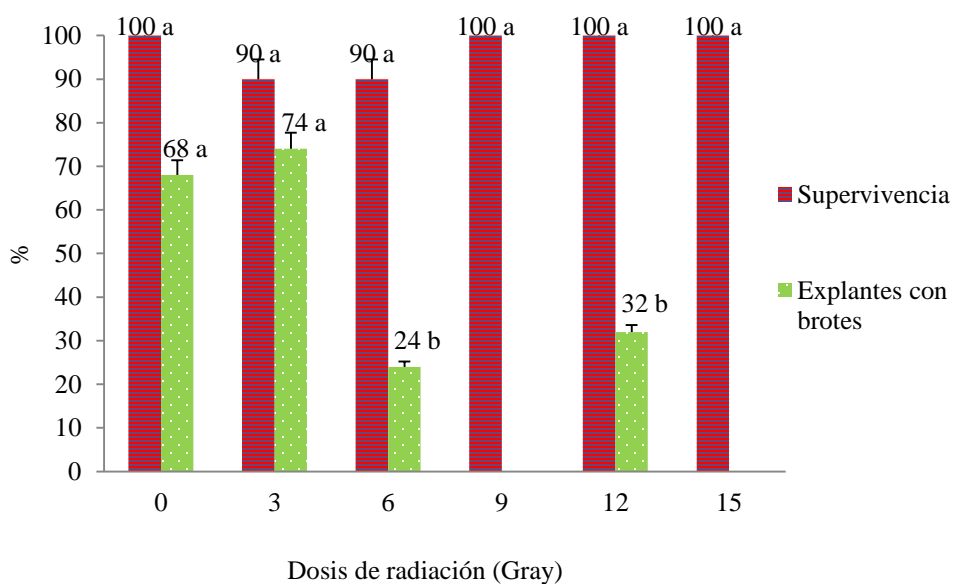


Figura 18. Efecto de la radiación con gamma Cobalto⁶⁰ en la supervivencia y capacidad de regeneración de brotes adventicios de nudos de *A. andreanum* después de 12-20 semanas.

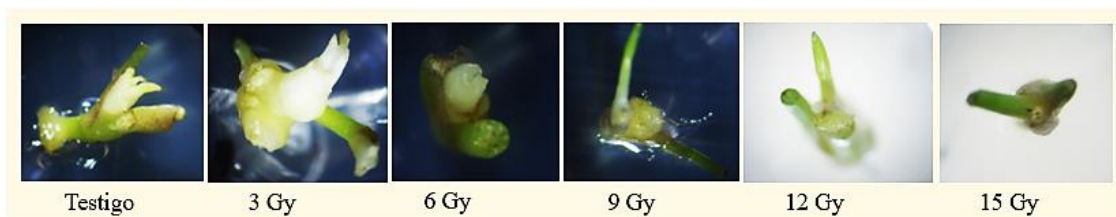


Figura 19. Formación de brotes en nudos de *A. andreaenum* expuestos a distintas dosis de radiación gamma Cobalto⁶⁰.

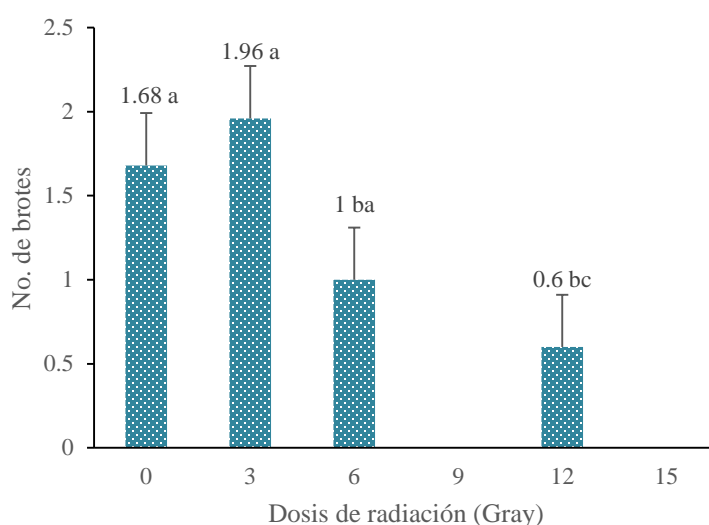


Figura 20. Número promedio de brotes adventicios por explante regenerados a partir de nudos *A. andreaenum* expuestos a distintas dosis de radiación gamma Cobalto⁶⁰ evaluados a las 12-20 semanas.

4.3.4 Interacción entre el tipo de explante y dosis de radiación gamma Co⁶⁰.

El análisis de los resultados mostró que la supervivencia de los explantes de raíz expuestos a 6, 9, 12 y 15 Gy fue significativamente menor que la de los nudos sometidos a 0, 9, 12 y 15 Gy. Por su parte, sólo los explantes de raíz formaron callo; el porcentaje de raíces expuesta a 3 Gy que formaron callo fue significativamente mayor que el de aquellas que se sometieron a 6, 9 y 12 Gy.

El porcentaje de nudos expuestos a 0 y 3 Gy fue mayor que el de aquellos irradiados con 6, 9, 12, 15 Gy (Cuadro 2). Por otro lado, el número de brotes formados en los nudos irradiados con 12 Gy fue significativamente menor que el de los expuestos a 0 y 3 Gy (Cuadro 2). El porcentaje de explantes de raíz expuestos a 3 Gy que formó callo fue significativamente mayor que el de los irradiados con 6, 9, 12 y 15 Gy y el de los nudos expuestos a cualquiera de las dosis probadas (Cuadro 2). Sólo 8 % (2 explantes) de los explantes de raíz regeneraron brotes (75 brotes).

Cuadro 2. Análisis de varianza en la interacción entre tipo de explante de *A. andreanum* y dosis de radiación gamma Co⁶⁰ sobre el efecto en las variables evaluadas

Explante	Dosis	Variables			
		Supervivencia (%)	Formación de callo (%)	Explantes con brotes (%)	No. de brotes por explante
Nudos	0	100.0 a	0.0 d	68.0 a	1.68 a
Nudos	3	90.0 ab	0.0 d	74.0 a	1.96 a
Nudos	6	90.0 ab	0.0 d	24.0 b	1.0 ab
Nudos	9	100.0 a	0.0 d	0.0 c	ND
Nudos	12	100.0 a	0.0 d	32.0 b	0.6 bc
Nudos	15	100.0 a	0.0 d	0.0 c	ND
Raíz	0	88.0 a	26.0 ab	ND	ND
Raíz	3	98.0 ab	46.0 a	ND	ND
Raíz	6	82.0 bc	12.0 bc	ND	ND
Raíz	9	70.0 dc	8.0 bc	ND	ND
Raíz	12	56.0 de	4.0 c	ND	ND
Raíz	15	40.0 e	0.0 d	ND	ND

Medias con letras desiguales difieren significativamente, Tukey ($p < 0.05$)

4.4 Características morfológicas de presuntos mutantes generados por colchicina

4.4.1 Plántulas regeneradas a partir de nudos

Se obtuvieron 43 plántulas en el testigo, mientras que para los tratamientos a 2, 3 y 4 h se generaron 161, 86 y 30 plántulas respectivamente; a partir de los nudos se seleccionaron plantas representativas de cada uno de los tratamientos. Las diferencias más notorias en las características morfológicas de las plantas se observaron entre las del testigo, 2 y 3 h de exposición a colchicina y aquellas regeneradas por los explantes expuestos durante 4 h a la colchicina; las cuales mostraban hojas más grandes con coloración verde más intensa, así como el tallo un café oscuro y el aumento de mayor tamaño de las hojas comparadas al testigo, 2 y 3 horas. Una característica en común entre los presuntos mutantes fue su lento crecimiento en todos los tratamientos, así como uniformidad en el tamaño de raíz (Figura 21).



Figura 21. Plántulas de *A. andreaum* regeneradas a partir de nudos expuestas a distintos tiempos en colchicina evaluadas a las 24 semanas.

4.4.2 Plántulas regeneradas a partir de raíces

Las plántulas obtenidas a partir de raíces expuestas 2 y 3 h a la colchicina presentaban menor área foliar y longitud de las hojas, pero raíces más largas y delgadas que la de las plantas testigo y las regeneradas a partir de los nudos (Figura 22).



Figura 22. Plántulas de *A. andreaum* regeneradas a partir de raíz expuesta a 2 h en colchicina evaluadas a las 28 semanas.

4.5 Características morfológicas de presuntos mutantes obtenidos por radiación gamma

Cobalto⁶⁰.

4.5.1 Plántulas regeneradas a partir de nudos

El daño fue más severo para los nudos tratados con rayos gamma Cobalto⁶⁰, 25 plántulas obtenidas en el testigo, mientras que a 3, 6 y 12 Gy un total de 20, 10 y 5 plántulas respectivamente; el índice de plántulas obtenidas fue menor. La longitud de las plantas y el tamaño y número de las hojas y la longitud de las raíces disminuyó conforme se incrementó la dosis de radiación (Figura 23). Dichas características fueron más evidentes en las plantas regeneradas en a partir de los nudos irradiados con 12 Gy, las cuales eran menos vigorosas, sus entrenudos se acortaron considerablemente, presentaban hojas muy pequeñas, que se plegaban entre sí y mostraban signos

de clorosis. Asimismo, los peciolo de las hojas mostraban coloración rojiza más intensa que en los presuntos mutantes obtenidos con colchicina.

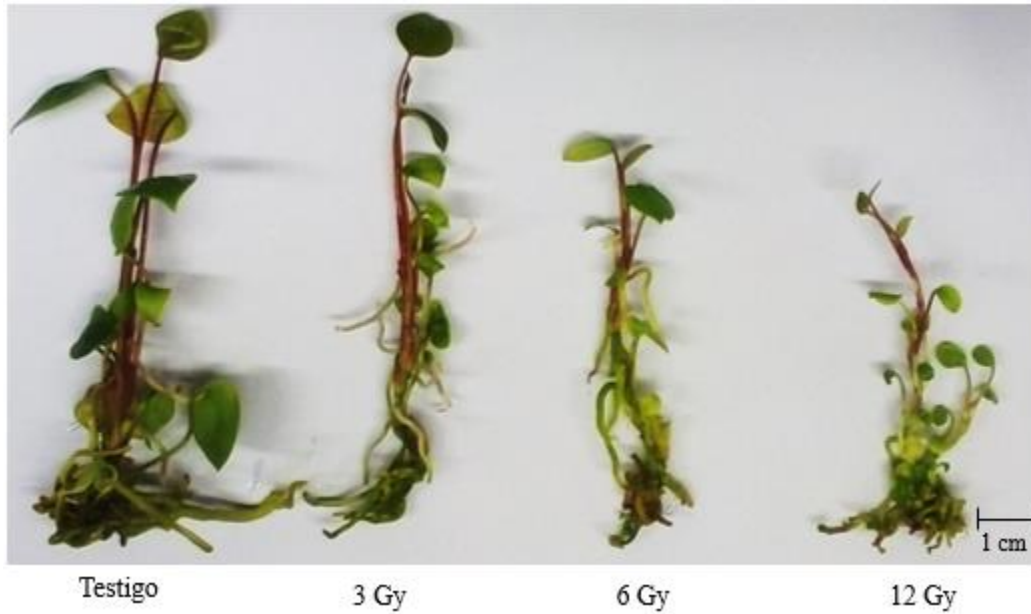


Figura 23. Plántulas de *A. thaliana* regeneradas a partir de nudos expuestos distintas dosis de radiación gamma Cobalto⁶⁰ evaluadas a las 28 semanas.

V. DISCUSIÓN

5.1 Respuesta de los explantes de hoja, raíz y nudos a la colchicina

5.1.1 Explantes de hoja

La baja supervivencia de los explantes de hoja y la nula respuesta en cuanto a la formación de callo y brotes adventicios pudo deberse al estado fisiológico y de desarrollo de las vitroplantas y de las hojas mismas (Valle–Sandoval *et al.*, 2008). Al respecto, Martín *et al.* (2003) reportaron que las hojas jóvenes en *Anthurium andreanum* de color verde claro regeneraron menor número de brotes que las de color verde – marrón. La decisión de utilizar hojas como explante se basó en el hecho de que es un órgano que ha permitido regenerar plantas *in vitro* en distintas especies (Ikeuchi *et al.*, 2016; Ullah *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2013). De hecho, se han reportado resultados exitosos de organogénesis directa e indirecta en *Anthurium andreanum* a partir de hojas provenientes de plántulas establecidas bajo invernadero (Atac y Çelik, 2012; Tamania-Saptari *et al.*, 2016).

Es probable que las hojas utilizadas en la presente investigación eran demasiado jóvenes o que sus requerimientos nutrimentales y hormonales no hayan podido ser cubiertos con los componentes del medio de cultivo (Styler y Chin, 1983; Ikeuchi *et al.*, 2016). Asimismo, las hojas obtenidas de las vitroplantas de anturio no tenían cutícula gruesa y ceras como las hojas provenientes de plantas crecidas en el invernadero o campo. Dichas características, pudieron haber ocasionado que al manipular las hojas de las vitroplantas para obtener los explantes, hayan sufrido estrés (por deshidratación) y daño mecánico (por corte) severos que comprometieron su supervivencia. Al respecto, Torres y Sanabria (2011) mencionan que las hojas de las plantas regeneradas *in vitro* pueden presentar anomalías tanto a nivel anatómico como funcional, como reducción en el número de células en el mesófilo, sistema vascular débil, menor espesor de su lámina, epidermis y cutícula.

Por otra parte, aunado al daño causado a las hojas de la vitroplantas al momento de obtener los explantes, su exposición a los mutágenos incrementó dichos daños, por lo que las hojas de vitroplantas de *A. andreanum* no se consideran una buena fuente de explantes para los trabajos de mutagénesis.

Por otro lado, cabe señalar que Castillo–Martínez *et al.* (2015) observaron que la capacidad de formación de callo de los explantes foliares de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) se redujo en 35 % cuando se expusieron durante 2.5 horas a etilmetano sulfonato. Lo anterior podría indicar que la dosis de colchicina a la que se expusieron los explantes de hoja de anturio pudo haber superado su tolerancia al daño provocado por el compuesto.

5.1.2 Explantes de raíz

En la presente investigación la supervivencia de los explantes de raíz expuestos a colchicina fue alta después de las 12 semanas. Por otro lado, la dosis letal media (DL_{50}) es un parámetro que nos permite predecir el nivel de sensibilidad de las plantas, nos indica la dosis a la cual 50 % de los explantes muere por efecto del mutágeno. Su importancia radica en que la mayor probabilidad de producir mutaciones útiles en un programa de mejoramiento genético es aquella en la que muere el 50 % de los individuos expuestos a un mutágeno (Álvarez-Holguín *et al.*, 2018). Debido a que, a las 12 semanas, los explantes de raíz de *A. andreanum* tratadas con colchicina mostraban 100 % de supervivencia, no fue posible determinar la DL_{50} ; no obstante, después de las 16 semanas el índice de mortandad fue mayor hasta un 96 % a 2 y 3 h, mientras que para el testigo y 4 h, todos los explantes murieron. Lo anterior indica que, aunque la colchicina aparentemente no comprometió la supervivencia de los explantes de raíz, si causó daño interno en los mismos, el cual se vio reflejado en su capacidad para regenerar brotes adventicios. Con base en nuestros

resultados, la supervivencia (DL50) de los explantes puede no ser el único parámetro a considerar para seleccionar la dosis que permita obtener mutantes, sino también la capacidad para regenerar brotes adventicios.

Macleod (1971) estudió el efecto de la colchicina en los meristemos apicales de las raíces primarias de *Vicia faba*. Este autor observó que los meristemos que tenían pocas células en el centro quiescente o no tenían, no se recuperaron del tratamiento con colchicina; mientras que los meristemos que contienen muchas células en dicho centro se recuperan más rápido. Además, se ha descrito que las células meristemáticas de la raíz al parecer muestran una respuesta rápida a los fármacos (Hart y Sabnis, 1976). Heyman *et al.* (2016) llegaron a la conclusión de que la exposición de raíces a fármacos, causan daño al ADN, lo que induce la muerte celular en el meristemo y una acumulación de las proteínas ERF115 relacionadas con la producción de etileno (hormona del estrés).

Cabe señalar que aun cuando los explantes expuestos a colchicina por 2, 3 y 4 horas lograr regenerar callo, la cantidad de callo se redujo con el tiempo de exposición. Estos resultados coinciden con los de Chen *et al.* (2011) quienes observaron que el tamaño de la masa de callo generada en explantes de raíz de *A. andreanum* “Arizona” expuestos a colchicina se redujo gradualmente al aumentar el tiempo de exposición; asimismo, durante la etapa de diferenciación la masas se volvieron de color marrón y murieron. Al respecto, se ha descrito que algunos químicos influyen en la capacidad de formación de callo, su impacto es principalmente en la cromatina y las histonas (Lee y Seo, 2018).

No obstante, que el porcentaje de explantes de raíz que formaron brotes fue muy bajo (1 explante) el número de brotes regenerados fue muy alto (120 brotes). Lo anterior indica que las raíces de *A. andreanum* al igual que las de otras especies (Robledo-Paz *et al.*, 2000; Xu y Huang, 2014), tienen

capacidad para regenerar plantas, hecho que no había sido reportado anteriormente. La regeneración a partir de ápices radiculares tiene la ventaja de que su región meristemática tiene gran número de células en división activa, la cual se mantiene por mucho tiempo; además es capaz de responder a señales de desarrollo y continuar creciendo y formar un nuevo meristemo (Drubovsky y Shishkova, 2008).

5.1.3 Nudos

Aunque la supervivencia de los nudos después de 12 semanas de exposición a la colchicina fue menor que la de los explantes de raíz, el porcentaje de explantes que formaron brotes fue muy superior al de los explantes de raíz. La mayor capacidad morfogénica de los nudos con respecto a los explantes de hoja y raíz pudo deberse a que el meristemo en los nudos está cubierto con primordios foliares, haciéndolos menos susceptibles al daño causado por la colchicina; mientras que el meristemo de raíz estuvo más expuesto al compuesto. El modelo regresión logística mostró que la exposición de los nudos a la colchicina durante 4 h (DL₅₀) podría considerarse el tiempo óptimo para generar mutantes; no obstante, cabe señalar los explantes que sobrevivieron a este tiempo de exposición regeneraron un número más bajo (1.1 brotes) de brotes que los explantes de raíz.

5.1.4 Interacción entre el tipo de explante y el tiempo de exposición a la colchicina

La respuesta de los explantes de raíz y nudos fue diferente a la de los explantes de hoja. Los explantes de hoja mostraron ser más sensibles a la colchicina que los de raíz y nudos. Después de 12 semanas de cultivo más de 60 % de los explantes permanecían vivos, por lo que no fue posible determinar la DL₅₀ en este tiempo; en tanto que la exposición de los nudos a la colchicina durante

4 horas causó que 64 % de éstos murieran, considerando este tiempo de exposición la colchicina como el óptimo para generar mutantes. Por otro lado, aun cuando el número de brotes que formaron los explantes de raíz fue muy superior al de los nudos, sólo 2 de los explantes de raíz formaron brotes, por lo que los nudos pueden considerarse el mejor tipo de explante para inducir mutagénesis por colchicina en anturio.

5.2 Respuesta de los explantes de hoja, raíz y nudos a la radiación gamma

5.2.1 Explantes de hoja

Al igual que para los explantes de hoja expuestos a colchicina, los irradiados con rayos gamma mostraron una tasa de supervivencia muy baja. Como se mencionó anteriormente, dicha respuesta pudo deberse a las características de fisiológicas y anatómicas de las hojas de la vitroplantas, así como a la deshidratación y al daño físico que sufrieron al momento de la disección. No obstante, los explantes de hoja irradiados murieron más rápidamente que aquellos expuestos a colchicina, lo que podría indicar que la radiación tiene mayor capacidad de penetración en los tejidos que la colchicina. Gudkov *et al.*, (2019) menciona que las heridas en tejidos irradiados promueven la producción de etileno endógeno que contribuye a la muerte celular.

5.2.2 Explantes de raíz

Fue evidente que la supervivencia de los explantes de raíz estuvo directamente correlacionada con el aumento en la dosis de radiación al que fueron expuestas. Asimismo, la supervivencia de los explantes irradiados con rayos gamma fue menor que aquellos expuestos a colchicina; es decir, la radiación causó mayor daño a los explantes. Aun cuando los explantes de raíz irradiados con 3, 6 y 9 Gy sobrevivieron y formaron callo, sólo las expuestas a 3 Gy lograron regenerar brotes

adventicios (en baja proporción) y a 15 Gy los explantes perdieron su capacidad para formar callo y brotes. El porcentaje de explantes irradiados que formaron callos en las distintas dosis también fue menor que el de aquellos expuestos a la colchicina. Aun cuando en los explantes de raíz tratados con colchicina no fue posible determinar la DL₅₀ debido a que la supervivencia registrada a las 12 semanas fue de 100 %; para los explantes irradiados la dosis letal se encontró a los 12 Gy. Lo anterior confirma que la capacidad de penetración de los rayos gamma es mayor que la de la colchicina. La respuesta registrada en los explantes de raíz sometidos a irradiación puede deberse a que la raíz es uno de los órganos que responde más rápido al estrés por su proximidad al suelo, además de que su capacidad de absorción es mayor que el de otros órganos, haciéndola más susceptible al daño (Caplin y Willey, 2018). Algunos autores afirman que la supervivencia de los meristemas radicales después de la irradiación depende de la etapa de crecimiento y del ciclo celular de la planta, y que las células expuestas a la irradiación que se dividen activamente sufren un daño más severo que las que no lo hacen (Van-Harten, 1998; Caplin y Willey, 2018).

Por otro lado, la penetración de la radiación gama causa descomposición del agua y otros compuestos químicos, (radiólisis), lo cual, aumenta la concentración de las especies reactivas de oxígeno (SRO) por encima de los niveles de protección de las células, ocasionando estrés oxidativo. Dicho estrés causa daño en el ADN y en los sitios de su síntesis de ADN, de tal manera que las células dejan de sintetizar el ADN y dividirse (Gudkov *et al.*, 2019).

Dubrosky y Shishkova (2008) demostraron que en las raíces de *Arabidopsis thaliana* expuestas a rayos laser, las células quiescentes mueren al ser más afectadas debido a que se dividen activamente; por el contrario, las células adyacentes no se dividen y mantienen la capacidad de desdiferenciación (formación de callo) y diferenciación (formación de brotes *de novo*).

5.2.3 Nudos

Al irradiar los nudos con rayos gamma Co^{60} la supervivencia fue superior al 90 % en todos los tratamientos, por lo que no fue posible estimar la DL50. Estos resultados contrastan con lo observado en los explantes tratados con colchicina en donde después de 3 horas de exposición se registraba menos de 50 % de supervivencia. No obstante, la alta supervivencia de los explantes, la capacidad para formar brotes adventicios disminuyó considerablemente a partir de los 6 Gy, alcanzando el valor más bajo a los 15 Gy. Cabe señalar que el número de brotes regenerados por los explantes irradiados y la longitud de los mismos, fueron más bajos que aquellos expuestos a la colchicina. Al respecto, Suraninpong y Wuthisuthimethavee (2015) observaron que la regeneración de brotes adventicios en *A. andreanum* se inhibió cuando los explantes se expusieron a los rayos gamma (10 Gy).

Jan *et al.* (2012), mencionan que los fotones emitidos durante la radiación son suficientemente poderosos para interactuar con las biomoléculas, afectando la biosíntesis de los principales componentes estructurales y funcionales de la célula (proteínas, carbohidratos, ADN y lípidos). Las especies reactivas de oxígeno generadas durante la irradiación causan oxidación de estas moléculas alterando su estructura y función y reduciendo la vida funcional de la célula (Gudkov *et al.*, 2019). Asimismo, se sabe que el mayor agrupamiento de auxinas se encuentra en zonas donde hay división celular activa, como los meristemas, y es probable que los procesos morfogénicos que esta hormona promueve sean atrofiados por la radiación (Kiong *et al.*, 2008). Martirena *et al.*, (2018) y Gudkov *et al.*, (2019) afirman que la irradiación puede inhibir la actividad de auxinas o afectar su efectividad, pudiéndose reflejar en su capacidad para inducir la morfogénesis (formación de órganos o embriones).

Los nudos de *A. andreanum* que formaron brotes presentaron diferencias significativas en la formación de brotes entre las dosis utilizadas; los explantes presentaron una reducción hasta de un 76 % en la formación de brotes a la dosis más alta. Hasbulla *et al.* (2012), obtuvieron resultados similares en *Gerbera jamesonii*, cuando usaron radiación gamma.

Las diferencias observadas en la regeneración de distintos tipos de explantes tratados con radiación gamma Co^{60} y colchicina mostraron la sensibilidad diferencial de los explantes a los mutágenos. La nula respuesta de las hojas de las vitroplantas de anturio, nos permite inferir que éstas no es una buena fuente de explantes para los trabajos de mutagénesis inducida, en tanto que los nudos y las raíces de las vitroplantas si lo son. El hecho de que a partir de un explante de raíz se hayan podido regenerar 120 brotes adventicios, sugiere que las raíces de las vitroplantas de anturio pueden ser utilizadas para la propagación de esta especie a gran escala.

5.2.4 Interacción entre el tipo de explante y la dosis de irradiación con rayos gamma Co^{60}

El efecto de la radiación gamma Co^{60} sobre los explantes de *A. andreanum* fue más severo que el de la colchicina; los explantes de hoja no sobrevivieron a ninguna de las dosis probadas. Debido a que los nudos mostraron más del 90 % de supervivencia en cualquiera de las dosis, no fue posible determinar la DL50, en tanto que 12.1 Gy se considera la dosis óptima para generar mutantes utilizando explantes de raíz. Aun cuando las raíces formaron un número de brotes por explante más alto que los nudos, sólo 2 explantes tuvieron capacidad para mostrar esta respuesta, por lo que los nudos podrían considerarse el tipo de explante adecuado para obtener mutantes de anturio mediante radiación gamma.

5.3 Características morfológicas de los presuntos mutantes generados con colchicina

5.3.1 Plántulas obtenidas a partir de nudos

Fenotípicamente las hojas de las plantas regeneradas a partir de los explantes tratados con colchicina mostraron coloración verde oscuro. Se ha descrito que la colchicina puede ocasionar trastornos fisiológicos y aberraciones cromosómicas, principalmente causando poliploidía (Manzoor *et al.*, 2019); el aumento o pérdida del número de cromosomas ocasiona ganancias o pérdida de secuencias de ADN (Corneillie *et al.*, 2019). Es posible la coloración verde oscuro de los presuntos mutantes se deba a que la colchicina haya ocasionado un aumento en el número de copias de genes involucrados con la síntesis de clorofila.

Otra de las características que mostraron los presuntos mutantes (4 h) fue la mayor área foliar con respecto a las plantas testigo. Algunos autores afirman que uno de los efectos morfológicos de la poliplodización inducida, es el aumento en el tamaño celular de los órganos debido al aumento en el contenido nuclear (Tsukaya, 2008; Manzoor *et al.*, 2019). Análisis morfométricos en hojas en *Arabidopsis thaliana* con diferentes niveles de ploidía demostraron que las células epidérmicas son afectadas por el número de cromosomas que hay por célula; así, conforme aumenta el número cromosómico, se incrementa el tamaño de las células, en tanto que el número de células en la lámina de la hoja se reduce; asimismo, los poliploides se desarrollaron más lentamente (Melaragno *et al.*, 1993; Corneillie *et al.*, 2019). Tavan *et al.*, (2015) indujeron poliploidía en *Tymus persicus* utilizando colchicina y obtuvieron plántulas con tallos más gruesos y hojas más oscuras. Kobayashi *et al.*, (2008) trataron semillas de *Salvia officinalis* con distintas concentraciones de colchicina y observaron un incremento en el tamaño de las hojas en las plantas tetraploides.

De la misma manera, la reducción en el tamaño de los presuntos mutantes puede atribuirse a que la colchicina afecta la síntesis y la actividad de algunas hormonas como las auxinas, lo cual puede modificar el crecimiento de las plantas (El-Nashar y Ammar, 2016).

5.4 Características morfológicas de los presuntos mutantes generados mediante radiación gamma Cobalto⁶⁰

5.4.1 Plantas obtenidas de nudos

Ramesh *et al.*, (2010) mencionan que la sensibilidad a la radiación depende del genotipo y etapa de desarrollo de la planta donadora de explantes. En general, la radiación gamma causó un daño más severo a los explantes, lo que se vio reflejado en su capacidad para regenerar plantas y las características de las mismas. Fue evidente que a mayor dosis mayor daño de los explantes y menor vigor de las plantas regeneradas. Se sabe que la radiación gamma promueve la producción de especies reactivas de oxígeno (SRO) los cuales puede causar estrés oxidativo en las células alterando directa o indirectamente distintas rutas metabólicas en las plantas (Mehdi, 2018). Una de esas alteraciones puede ser la disminución o aumento de los niveles de reguladores endógenos del crecimiento (auxinas, citocininas, etileno, ácido abscísico) por reducción en su síntesis o por degradación (Kiong *et al.*, 2008).

En plantas de *Arabidopsis* el tamaño de las raíces se redujo conforme aumento la dosis de irradiación gamma, dicha respuesta se atribuyó a las especies reactivas de oxígeno generadas durante la radiación (Kim *et al.*, 2018). Como resultado, la producción de especies reactivas de oxígeno conduce a un aumento de estrés oxidativo en las células.

El plegamiento de las hojas observado en las plantas regeneradas a partir de los explantes irradiados puede estar relacionado con la producción de etileno promovida por irradiación. Al

respecto, Chen *et al.* (2014) y Gudkov *et al.*, (2019) mencionan que las dosis altas de radiación aumentan temporalmente el contenido de etileno y la expresión de enzimas clave para su síntesis, así como la expresión de los genes sensibles al ácido abscísico.

VI. CONCLUSIONES

Las hojas de las vitroplantas de anturio mostraron alta sensibilidad a los agentes mutagénicos. La sensibilidad a la radiación gamma y la colchicina estuvo en función del tipo de explante y la dosis utilizada. Las raíces y los nudos son órganos promisorios para la regeneración de mutantes de anturio. La radiación gamma Co^{60} causó un daño más severo a los explantes que la colchicina. La supervivencia y la morfogénesis no están directamente relacionadas. La capacidad para formar plantas se redujo tanto en los explantes de raíz como en los nudos conforme se incrementó la dosis de los mutágenos. Las características morfológicas de los presuntos mutantes sufrieron cambios.

VII. LITERATURA CITADA

- Ahloowalia B. S., M. Maluszynski and K. Nichterlein (2004)** Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica*. 135: 187 – 204.
- Alberts B., D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y P. Walter (2006)** Introducción a la Biología Celular. Editorial Médica Panamericana. 2° ed. Madrid, España. 842 p.
- Alcántar J. P (2014)** La poliploidía y su importancia evolutiva. *Temas de Ciencia y Tecnología*. 18:17 – 29.
- Alcántar J. P (2015)** La poliploidía y sus consecuencias genéticas. *Temas de Ciencia y Tecnología*. 19: 3 – 13.
- Álvarez-Holguín A., C. R. Morales-Nieto, C. H. Avendaño-Arrazate, E. Santellano-Estrada, A. Melgoza-Castillo, M. E. Burrola-Barraza and R. Corrales-Lerma (2018)** Dosis letal media y reducción media del crecimiento por radiación gamma en pasto africano (*Eragrostis lehmanniana* Ness). *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. 5(13): 81-88.
- Andersen J. R. y T. Lübberstedt (2003)** Functional markers in plants. *Trends in Plant Science*. 8: 554 – 560. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2003.09.010>
- Atak C. and O. Celik (2012)** Micropropagation of *Anthurium* spp. *In: Plant Science*. Kumar N. and S. Charan (eds). InTech. Croatia pp: 241-254. <http://dx.doi.org/10.5772/51426>
- Azadi P., H. Bagheri, A. M. Nalouisi, F. Nazari and S. F. Chandler (2016)** Current status and biotechnological advances in genetic engineering of ornamental plants. *Biotechnology Advances*. 34:1073-1090. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.06.006>

- Bleotu C., L. Matei, L. D. Dragu, L. Grigorescu, C. C. Diaconu and G. Anton (2018)** Methods for plant genetic modification. *In: Handbook of Food Bioengineering, Genetically Engineered Foods.* A. M. Holban and A. Mihai (eds.). Academic Press Elsevier. London, United Kingdom. pp: 385-401.
- Caplin N. and N. Willey (2018)** Ionizing radiation, higher plants and radioprotection: from acute high doses to chronic low doses. *Frontiers in Plant Science.* 9:1-20. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00847>
- Caruso G., V. Broglia y M. Pacovi (2015)** Diversidad genética, importancia y aplicaciones en el mejoramiento vegetal. *Instituto de Ecología y Ambiente Humano.* 4: 45-50.
- Castillo-Diego T. I (2012)** Viabilidad económica del cultivo de la flor de anturio y esquemas de comercialización. *Temas de Ciencia y Tecnología.* 15:19-25.
- Castillo-Martínez C. R., E. de la Cruz-Torres, G. Carrillo-Castañeda y C. H. Avendaño-Arrazate (2015)** Inducción de mutaciones en crisantemo (*Dendrathera grandiflora*) usando radiación gamma y etil metano sulfonato. *Agroproductividad.* 18:60-64.
- Chen C., X. Hou, H. Zhang, G. Wang and L. Tian (2011)** Induction of *Anthurium andreanum* “Arizona” tetraploid by colchicine in vitro. *Euphytica.* 181: 137-145. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0344-3>
- Chen Q. F., H. Y. Ya., Y. R. Feng and Z. Jiao (2014)** Expression of the key genes involved in ABA biosynthesis in rice implanted by ion beam. *Appl. Biochem Biotechnol.* 173: 239–247.
- Corneillie S., N. de Storme., R. Van A., J. U. Fangel., M. de Bruyne., R. de Ryck., W. Boerjan (2019)** Polyploidy affects plant growth and alters cell wall composition. *Plant Physiology.* 179:74–87.

- Cornide M. T. (2001)** La genética vegetal, el mejoramiento y la sociedad. *Cultivos Tropicales*. 22: 73-82.
- Cristina-Pereira R., L. Chamma-Davide, V. Helena-Techio and A. L. Oliveira-Timbo (2012)** Chromosomal duplication of forage grasses: an alternative for breeding programs. *Ciência Rural, Santa Maria*. 42:1278-1285.
- Cruz-Izquierdo S. (2012)** Curso internacional de actualización en fitomejoramiento por mutagénesis asistida por marcadores moleculares. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 35:1-2.
- Cubero-Salmeron J. I (2013)** Introducción a la Mejora Vegetal. Mundi-Prensa. Soria, España. 600 p.
- Donini P and A. Sonnino (1998)** Induced mutation in plant breeding: current status and future outlook. *In: Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*. S. M. Jain, D. S. Brar and B. S. Ahloowalia (eds.). Kluwer Springer Dordrecht. Rome, Italy. pp: 255-291.
- Drubrovsky J. G. y S. Shishkova (2008)** Enigmas de la raíz: la parte oculta de la planta. *En: Una ventana al quehacer científico*. M. A. López y F. Rebolledo (comps). Instituto de Biotecnología de la UNAM. México. D. F. pp: 201-212.
- El-Nashar Y. I and M. H. Ammar (2016)** Mutagenic influences of colchicine on phenological and molecular diversity of *Calendula officinalis* L. *Genetics and Molecular Research*. 15:1-15.
- Eng W-H and W-S. Ho (2018)** Polyploidization using colchicine in horticultural plants: A review. *Scientia Horticulturae*. 246: 604-617.
- Escandón A. S., P. A. Marinangeli y M. Pérez de la Torre (2010)** Avances de la biotecnología en cultivos de ornamentales *In: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. G. Levitus, V.

- Echenique, C. Rubinstein, E. Hoop y L. Mroginski (eds.) INTA. Buenos Aires, Argentina. pp: 421-433.
- Espinosa-Flores A., J. Mejía-Muñoz y M. A. Rodríguez-Elizalde (2011)** Manual de producción de plantas de nochebuena y ornato. Colección MC. Sinaloa, México 47 p.
- FAO, Organización de las Naciones Unidad para la Alimentación y la Agricultura (2003)** Aplicación de la biotecnología en plantas ornamentales. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=IR2008003073> (Junio 2018).
- Forster B. P. and Q. Y. Shu (2012)** Plant mutagenesis in crop improvement: basic terms and applications. *In: Plant Mutation Breeding and Biotechnology*. Q. Y. Shu, B. P. Forster and H. Nakagawa (eds.). FAO, IAEA. Vienna, Australia. pp: 9-20.
- Foster P. L (2013)** Mutation, spontaneous. *In: Brenner's Encyclopedia of Genetics*. S. Maloy and K. Hughes (eds.). Academic Press. California. U.S.A. 556 p.
- Gantait S. and N. Mandal (2010)** Tissue culture of *Anthurium andreaum*: a significant review and future prospective. *International Journal Botany*. 6:207-219.
- González-Jiménez J (2004)** La tecnología nuclear en el mejoramiento de las plantas. *Revista Ciencia (Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares)*. 52: 43-52.
- Goodman S. R. (2008)** The cell cycle and cancer. *In: Medical Cell Biology*. S. R. Goodman (ed.). Academic Press. USA. pp: 273-289.
- Gudkov S. V., M. A. Grinberg, V. Sukhov and V. Vodeneev (2019)** Effect of ionizing radiation on physiological and molecular processes in plant. *Journal of Environmental Radioactivity*. 202: 8-24.
- Gunckel J. E (1956)** The effects of ionizing radiation on plants: morphological effects. *The Quarterly Review of Biology*. 32:46-56.

- Gutiérrez M. A., F. Santacruz R., J. L. Cabrera P. y B. Rodríguez G. (2002)** Mejoramiento genético vegetal *in vitro*. *e-Gnosis*. 1(4):1-19.
- Gutiérrez-Velázquez M. V (2015)** Metilación del ADN vegetal, principal mecanismo epigenético en plantas. *Vidsupra*. 7:1-5.
- Hart J. W. and D. D. Sabnis (1976)** Colchicine and plant microtubules: a critical evaluation. *In: Commentaries in Plant Science*. H. Smith (ed.). Pergamon Press 272 p.
- Hasbullah N. A., R. M. Taha, A. Saleh and N. Mahmud (2012)** Irradiation effect on *in vitro* organogenesis, callus growth and plantlet development of *Gerbera jamesonii*. *Horticultura Brasileira*. 30: 252-257.
- Henikoff S. and L. Comai (2003)** Single-nucleotide mutation for plant functional genomics. *Annual Review of Plant Biology*. 54: 375-401.
- Hernández L. (2004)** El cultivo del anthurium. *Cultivos Tropicales*. 25:41-51.
- Heyman J., T. Cools, B. Canher, S. Shavialenka, J. Trass. I. Vercautere and L. De Veylder (2016)** The heterodimeric transcription factor complex ERF115-PAT1 grants regeneration competence. *Nature Plants*. 2(11): 1-7.
- Horemans N., D. J. Spurgeon, C. Lecomte-Pradines, E. Saenen, C. Bradshaw, D. Oughton, I. Rasnaca, J. H. Kamstra and C. Adam-Guillermin (2019)** Current evidence for a role of epigenetic mechanisms in response to ionizing radiation in a ecotoxicological context. *Environmental Pollution*. 251:469-483.
- Imery J. and H. Cequea (2001)** Colchicine-induced autotetraploid in *Aloe vera* L. *Citologia*. 66: 409-413.
- Ikeuchi M., Y. Ogawa, A. Iwase and K. Sugimoto (2016)** Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. *Company of Biologists*. 143: 1442-1451.

- Jan S., T. Parween, T. O. Siddiqi and Mahmooduzzafar (2012)** Effect of gamma radiation on morphological biochemical, and physiological aspects of plants and plant products. *Environmental Reviews*. 20:17-39. <https://doi.org/10.1139/a11-021>
- Kapazoglou A., I. Ganopoulo, E. Tani and A. Tsaftaris (2018)** Epigenetics, epigenomics and crop improvement. *In: Advances in Botanica Research Transgenic Plants and Beyond*. M. Kuntz (ed.). Academic Press. London, United Kindom. pp: 287-324.
- Kharkwal M. C. (2012)** A brief history of plant mutagenesis. *In: Plant Mutation Breeding and Biotechnology*. Q. Y. Shu, B. P. Forster and H. Nakagawa (eds.). FAO, IAEA. Vienna, Austria. pp: 21-30.
- Kim J-H., T. H. Ryu, S. S. Lee, S. Lee and B. Y. Chung (2018)** Ionizing radiation manifesting DNA damage response in plants: an overview of DNA damage signaling and repair mechanisms in plants. *Plant Science*. 278: 44-53. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.10.013>
- Kiong A. L. P., A. G. Lai., S. Hussein and A. R. Harun (2008)** Physiological responses of *Orthosiphon stamineus* plantles to gamma irradiation. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*. 2:135–149.
- Kishi-Kaboshi M., R. Aida and K. Sasaki (2018)** Genome engineering in ornamental plants: current status and future prospects. *Plant Physiology and Biochemistry*. 131:47-52. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.03.015>
- Kobayashi N., S. Yamashita., K. Ohta and T. Hosoki (2008)** Morphological characteristic and their inheritance in colchicine-induced *Salvia* polyploids. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 77:186–191.

- Kodym A. and R. Afza (2003)** Physical and chemical mutagenesis. *In: Plant Functional Genomics*. E. Grotewold (ed.). Human Press. Totowa, Nueva Jersey. pp: 189-204.
- Kron P., J. Suda, and B. C. Husband (2007)** Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology. *Annual Review of Ecology Evolution, and Systematics*. 38:847-876.
- Kuehnle A. R., F-C. Chen and N. C. Sugii (2001)** Transgenic *anthurium*. *In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Transgenic Crops III*. Y. P. S. Bajaj (ed.). Springer. Berlin. Alemania. pp: 3-15.
- Lee K. and P. J. Seo (2018)** Dynamic epigenetic changes during plant regeneration. *Trends in Plant Science*. 23:235-247.
- Li Q., M. Deng, J. Zhang, W. Zhao, Y. Song, Q. Li and Q. Huang (2013)** Shoot organogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Lysionotus serratus* D. Don. *The Scientific World Journal*. 2013:1-7.
- López-Puc G., M. A. Ramírez-Mosqueda y H. E. Lee-Espinosa (2013)** El cultivo moderno del anturio. *Revista Ciencias*. 64:52-59.
- Lundqvist U., J. D. Franckowiak and B. P. Forster (2012)** Mutation categories. *In: Plant Mutation Breeding and Biotechnology*. Q. Y. Shu, B. P. Forster and H. Nakagawa (eds.). FAO, IAEA. Vienna, Austria. pp: 47-55.
- Luckett D. L. (1988)** Colchicine mutagenesis is associated with substantial heritable variation in cotton. *Euphytica*. 42:177-182.
- Macleod R. D. (1971)** The response of apical meristems of primary roots of *Vicia faba* L. to colchicine treatments. *Chromosoma*. 35: 217-232.

- Maluszynski M., I. Szarejko, J. Maluszynska and M. Szurman-Zubrzycka (2017)** Mutation techniques. *In: Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. B. B. Thomas, B. C. Murray and D. J. Murphy (eds.). Academic Press. Netherlands. pp: 215-218.
- Manzoor A., T. Ahmad., M. Ajmal., I. Ahmad and C. Silvestri (2019)** Studies on colchicine for enhancement of quality traits in ornamental plants. *Plants*. 8:2–16.
- Martínez M. C., M. Helguera y A. Carrera (2012)** Marcadores moleculares. *In: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp y L. Mroginski (eds.). INTA. Buenos Aires, Argentina. pp: 70-85.
- Martín K. P., D. Joseph, J. Madassery and V. J. Philip (2003)** Direct shoot regeneration from lamina explants of two commercial cut flower cultivars of *Anthurium andreaum*. *Hort. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 39: 500-504.
- Martirena R. A., N. Veitía, L. Rodríguez, R. Collado, D. Rodríguez, L. Rivero y M. Ramírez-López (2018)** Efecto de diferentes explantes irradiados en la regeneración *in vitro* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar “ICA Pijao”. *Acta Biológica Colombiana*. 24:13-25. <https://doi.org/10.15446/abc.v24n1.70422>
- Mba C. (2013)** Induced mutation unleash the potentials of plant genetic resources for food and agriculture. *Agronomy*. 3:200–231.
- Mehdi M. S. (2018)** Mutation technique and its applications in the breeding of ornamental plants. *In: Second International Congress and 3rd National Congress of Ornamental Flowers and Ornamental Plants*. Department of Horticulture, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran. https://www.researchgate.net/publication/328601280_Mutation_technique_and_its_applications_in_the_breeding_of_ornamental_plants (Junio 2018).

- Melaragno J. E., B. Mehrotra and A. W. Coleman (1993)** Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue of *Arabidopsis thaliana*. *Plan cell*. 5:1661–1668.
- Messmer, M., K-P Wilbois, C. Baier, F. Schäfer, C. Arncke D. Drexler and I. Hildermann (2015)** Técnicas de Mejora Vegetal, Una valoración desde la Agricultura Ecológica. Editorial SEAE. Valencia, España. 48 p.
- Mireles-Ordaz J., A. Arellano-Perusquia, A. Espinal-Centeno, L. Sánchez- Segura, A. A. Estrada-Luna y A. Cruz-Ramírez (2015)** Reprogramación celular de embriones de *Anthurium andraeanum* por fitohormonas para micropropagación masiva. *Revista Nova Scientia*. 7:49-67.
- Muller H. J. (1927)** Artificial transmutation of the gene. *Science*. 66:84-87.
- Murashige T. and F. Skoog (1962)** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. 15:473-497.
- Mustafa N. S., F. Liu, M. R. Odongo, X. Wang, X. Cai, Z. Zhang and K. Wang (2017)** Effects of colchicine treatments on chromosome doubling in three diploid cotton species. *Journal of Multidisciplinary Engineering Science and Technology*. 4:7170-7145.
- Onamu R., J. P. Legaria, J. Sahugún, J. L. Rodríguez de la O y J. Pérez (2012)** Análisis de marcadores morfológicos y moleculares en papa (*Solanum tuberosum* L). *Revista Fitotecnia Mexicana*. 35: 267-277.
- Piñero D., A. Barahona, L. Eguiarte, A. R. Oivares y R. S. Lizana (2008)** La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. CONABIO, México. pp: 415-435.
- Planchais S., N. Glab, D. Inzé and C. Bergounioux (2000)** Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. *FEBS Letters*. 476:78-83.

- Prina A., A. Landau, M. G. Pacheco y E. H. Hoop (2010)** Mutagénesis, tiling y ecotilling. In: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp y L. Mroginski (eds.). INTA. Buenos Aires, Argentina. pp: 217-228.
- Prina A. R., A. M. Landau, A. E. Martínez, M. G. Pacheco, M. C. Arias, V. J. Etchart, F. A. Lencina y D. G. Díaz (2011)** Fuentes primarias de variabilidad genética en plantas cultivadas. Mutaciones inducidas y genes mutadores. *Journal of Basic & Applied Genetics*. (22) 10:1-6.
- Ramesh H. L., Y. Murthy and V. N. Munirajappa (2010)** Effect of gamma radiation on morphological and growth parameters of Mulberry variety M5. *Int. J. Sci. Nat.* 3:447–452.
- Rentaría-Alcántara M. (2007)** Breve revisión de los marcadores moleculares. In: Ecología molecular. L. E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre (Eds.). Instituto Nacional de Ecología. D. F, México. pp: 541-562.
- Robledo-Paz A., V. M. Villalobos-Arámbula y A. E. Jofre-Jarfias (2000)** Efficient plant regeneration of garlic (*Allium Sativa* L.) by root-tip culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 36:416-419.
- SAGARPA, Secretaria de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2015)** Anturio producto usos, condiciones edáficas y clima. Ciudad de México. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/294337/anturio_monograf_a.pdf (Febrero 2018).
- Salazar M. S. A., G. J. Valderrama y J. D. Quintero (2018)** Efecto de la colchicina sobre la morfología foliar y los estomas de *Kalanchoe daigremontian* Raym.-Hamet & H. Perrier (Crassulaceae). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 12: 212-222.

- Schrader T. J. (2016)** Mutagens. *In*. Encyclopedia of Food and Health. B. Caballero, P. M. Finglas and F. Toldra (eds.). Editorial Academic Press. United Kingdom. pp: 20-26.
- Schum A. and W. Preil (1998)** Induced mutation in ornamental plants. *In*: Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement. S. M. Jain, D. S. Brar, B. S. Ahloowalia (eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. pp: 367-378.
- Shibai A., Y. Takahashi, Y. Ishizawa, D. Motooka, S. Nakamura, B-W. Ying and S. Tsuru (2017)** Mutation accumulation under UV radiation in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*. 7: 1-12.
- SIAP, Sistema de Información Agropecuaria y Pesquera (2017)** Anturio producto usos, condiciones edáficas y clima. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Ciudad de México. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/294337/anturio_monograf_a.pdf (Febrero 2018).
- Styler D. J. and C. K. Chin (1983)** Meristem and shoot-tip culture for propagation. Pathogen elimination, and germplasm preservation. *In*: Horticultural Reviews. Janick. J. (ed.). Hoboken. NJ. USA. pp: 221-227.
- Suraninpong P. and S. Wuthisuthimethavee (2015)** Mutation Induction of *Anthurium andreanum* using gamma radiation. *Acta Horticulturae*. 1083: 139-144.
- Tamania-Saptari R., M. Maya-Sinta and A. Budiani (2016)** *In vitro* propagation on *Anthurium andreanum* cv. Nitt through organogenesis. *Agrivita Journal of Agricultural Science*. 39:192–200.
- Takahashi C. S. (2018)** A history of the development of the Latin American mutagenesis society: ALAMCTA. *Mutation Research Genetic Toxicology*. 836:4-8.

- Tavan M., M. Hossein and G. Karimzadeh (2015)** In vitro polyploidy induction: changes in morphological, anatomical and phytochemical characteristics of *Thymus persicus* (Lamiaceae). *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 122:573 – 585.
- Toctaguano V. A. (2018)** Efectos de la colchicina en el proceso de la inhibición del huso cromático en la fase mitótica en el estado de huevo de la mosca de la futa *Ceratitis capitata* (Wiedemann). <https://es.slideshare.net/VictorInge1/colchicina>. (Julio 2018).
- Tomas P. A., A. M. Gottlieb, G. E. Schrauf y L. Poggio (2013)** Utilización de marcadores morfológicos y moleculares AFLP en la identificación de germoplasma nativo y cultivado de *Elymus cabrifolius* (Poaceae). *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias.* 45:85-100.
- Torres J. y M. E. Sanabria (2011)** Efecto del ambiente de desarrollo sobre la anatomía foliar de *Cattleya Jenmanii* rolfe y *C. Lueddemanniana* Rchb. F. (Orchidaceae). *Acta Botánica Venezolana.* 34: 199-214.
- Tsukaya H. (2008)** Controlling size in multicellular organs: focus on the leaf. *Plos Biology.* 6:1373–1376.
- Ullah K. E., X. Z. Fu, J. Wang, Q. J. Fan., X. S. Huang, G. N. Zhang, J. Shi and J. H. Liu (2008)** Regeneration and characterization of plants derived from leaf *in vitro* culture of two sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) cultivars. *Scientia Horticulturae.* 120: 70-76.
- Valle-Sandoval M. R., J. O. Mascorro-Gallardo, I. Gil-Vázquez y G. Iturriaga-de la Fuente (2008)** Regeneración directa *in vitro* del crisantemo, *Dendrathera X grandiflorum* Kitam, a partir de segmentos de tallo. *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo.* 24: 219-227.
- Van de Perr Y., E. Mizrachi and K. Marchal (2017)** The evolution significance of polyploidy. *Nature Review Genetics.* 18:411-424.

- Van Harten A. M.** (1998) Mutation breeding: theory and practical applications. Cambridge University Press. The Netherlands. 353 p.
- Van de Walle J., N. Horemans, E. Saenen, M. V. Hess, J. Wannijn, R. Nauts, A. V. Gompel, J. Vangronsveld, H. Vandenhove and A. Cuypers (2016)** Arabidopsis plants exposed to gamma radiation in two successive generations show a different oxidative stress response. *Journal of Environmental Radioactivity*. 165:270-279.
- Wu J.H., A. R. Ferguson, B. G. Murray, Y. Jia, P. M. Datson and J. Zhang (2012)** Induced polyploidy dramatically increases the size and alters the shape of fruit in *Actinidia chinensis*. *Annals of Botany*. 109:169-179.
- Xu L. and H. Huang (2014)** Genetic and epigenetic controls of plant regeneration. *In: Mechanisms of Regeneration*. B. Galliot (ed.). Academic Press. Amsterdam, The Netherlands pp: 1- 33.
- Xu L., U. Najeeb, M. S. Naeem, G. L. Wan, Z. L. Jin, F. Khan and W. J. Zhou (2012)** In vitro mutagenesis and genetic improvement. *In: Technological Innovations in Major World Oil Crops*. S. K. Gupta (Ed.). Springer. NY. pp:151-173.
- Yamaguchi H. (2018)** Mutation breeding of ornamental plants using ion beams. *Breeding science*. 68:71–78.
- Zambelli A., A. León y R. Garcés (2015)** Mutagenesis in sunflower. *In: Sunflower*. E. Martinez-Force, N. Turgut and J. J. Salas (eds.). AOCS Press. Argentina pp: 27-52.