

DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL (DL_{50}) CON Co^{60} EN VITROPLÁNTULAS DE *Agave tequilana* var. Azul

LETHAL DOSIS (LD_{50}) DETERMINATION USING Co^{60} ON *Agave tequilana* var. Azul VITROPLANTLETS

Alejandro Ángeles-Espino¹, Alberto J. Valencia-Botín^{2*}, Gil Virgen-Calleros¹, Carlos Ramírez-Serrano¹, Lydia Paredes-Gutiérrez³ y Salvador Hurtado-De la Peña¹

¹Doctorado en Ciencias Biosistémicas, Ecología, Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUC-BA), Universidad de Guadalajara. Km 15.5 Carr. Guadalajara-Nogales. Las Agujas, Zapopan, Jalisco. ²Centro Universitario de la Ciénega, Universidad de Guadalajara. Av. Universidad 1115. 47820, Ocotlán, Jalisco. ³Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. Cooyoacac, Estado de México.

*Autor para correspondencia (alberto.valencia@cuci.udg.mx)

RESUMEN

El cultivo del agave (*Agave tequilana* Weber var. 'Azul') utilizado para producir el tequila tiene importancia económica, cultural y social en México, por la generación de empleos en el campo y la industria, así como el ingreso de divisas resultado de la exportación de esta bebida. La diversidad genética de esta especie es muy baja por lo que una opción de inducir variabilidad genética es vía mutagénesis. El objetivo de la investigación fue determinar la dosis letal media (DL_{50}) mediante la irradiación con rayos gamma Co^{60} en callos y plántulas de agave obtenidas *in vitro*, como medio para generar variabilidad genética. Las plántulas se obtuvieron a partir de yemas axilares promovidas mediante la aplicación de reguladores de crecimiento en el medio Murashige y Skoog (MS). Se irradiaron callos seis semanas posteriores a la inducción y plántulas a las 12 semanas después de la emergencia. En ambos casos las dosis de radiación fueron: 0 (testigo), 10, 20, 30, 40 y 50 Gy. Hubo diferencias significativas tanto en el desarrollo de las plántulas como del callo; ambas estructuras mostraron una disminución significativa en su crecimiento cuando la dosis de radiación fue igual o mayor a los 20 Gy en callos y 30 Gy en plántulas. Los modelos de regresión lineal y cuadrático entre dosis y variables mostraron ajustes superiores de $R^2=0.62$ para el primero y de $R^2=0.74$ para el segundo. La DL_{50} se ubicó entre 20 y 25 Gy para número de brotes y tamaño de plántula y 16 Gy para el área del callo de acuerdo a la regresión cuadrática.

Palabras clave: *Agave tequilana*, micropropagación, mutaciones, rayos gamma.

SUMMARY

The agave crop (*Agave tequilana* Weber var. 'Azul') is the source for tequila. It has important social, cultural and economic impacts, particularly on employment needed to fulfill the activities around the crop and industry. Low genetic diversity is present in the cultivar; thus, induction of genetic variability via mutagenesis can be an option. In this research the mean lethal dose (LD_{50}) of Co^{60} gamma rays for inducing genetic variability on agave *in vitro* callus and plantlets was quantified. Plantlets were obtained by incubating agave explants on a Murashige and Skoog (MS) medium containing growth regulators which promoted growth of axillary buds. Calli were irradiated six weeks after induction and plantlets at 12 weeks of development. In both cases, doses applied were: 0 (control), 10, 20, 30, 40 and 50 Gy. Statistically differences were obtained for plantlets and calli growth; significant effects appeared at radiation level above 20 Gy for calli and 30 Gy for plantlets. Linear and quadratic regression models between

doses and variables were appropriate; R^2 for the linear model was 0.62, while the quadratic model had $R^2=0.74$. LD_{50} was fixed between 20 and 25 Gy for plantlets and 16 Gy for callus, based on the quadratic model.

Index words: *Agave tequilana*, gamma rays, micro propagation, mutations.

INTRODUCCIÓN

El tequila tiene alta demanda en el mercado nacional e internacional; además cuenta con la denominación de origen que obtuvo el gobierno mexicano en 1977 (González *et al.*, 2007a), la cual protege al país como productor y procesador del cultivo de agave (*Agave tequilana* Weber var. 'Azul'). Según la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-1994, el agave es la única especie autorizada para la producción del tequila (González *et al.*, 2007b).

El cultivo de *A. tequilana*, así como el tequila, tienen importancia económica, cultural y social en México. El tequila ha sido la bebida más popular y tradicional del país, pero la investigación en esta especie ha recibido menor atención que otras especies como gramíneas y hortalizas (González *et al.*, 2007b). Al respecto, es conveniente destacar que se requieren de seis a ocho años para que la planta alcance la madurez comercial y se pueda efectuar la cosecha o "jima" de la piña (tallo) para la posterior industrialización y obtención del tequila. En esta etapa la planta emite el vástago floral (quiote), el cual se elimina para evitar la disminución de azúcares en la piña, lo que impide la producción de semilla. Esto último reduce la variabilidad genética y obliga a que la reproducción se lleve a cabo mediante estructuras vegetativas.

La incidencia de insectos plaga y fitopatógenos en agave se ha incrementado en la última década, y el control se realiza habitualmente con plaguicidas químicos, biológicos, o con prácticas culturales (González *et al.*, 2007b). La inducción de mutaciones es una alternativa para inducir variabilidad

genética, y así incrementar la probabilidad de obtener segregantes con resistencia a enfermedades fungosas, como la mancha gris causada por *Cercospora agavicola*, o bacterianas como la pudrición blanda (*Pectobacterium carotovorum*).

En los programas de mejoramiento genético convencional de especies de reproducción sexual, la inducción de variabilidad genética generalmente se obtiene mediante hibridación y en menor grado por inducción de mutaciones. Entre las opciones para las especies de reproducción asexual como el agave, la inducción de mutaciones mediante la exposición de tejido somático a radiación ionizante puede provocar cambios en el material genético de las células y así obtener quimeras mutantes (Robles, 1986).

Las mutaciones que se generan en las especies que se propagan asexualmente corresponden a cambios en las células somáticas y, por consiguiente, sin la recombinación genética que ocurre en especies de reproducción sexual. Una opción para mantener y multiplicar a estos tipos de mutantes en especies de multiplicación asexual es el cultivo de tejidos, que a su vez permite que en poco tiempo se disponga de una gran cantidad de plántulas sanas para incorporarlas a las producciones comerciales.

En la inducción de mutantes, los individuos mutantes presentan cambios negativos en una frecuencia creciente conforme aumenta la dosis de radiación, por lo que es importante conocer la dosis letal media (DL₅₀). En el caso de semillas, la DL₅₀ corresponde a la cantidad de radiación absorbida con la cual sobrevive 50 % de la población que ha sido expuesta, proporción que se considera como el rango donde se favorece la aparición de mutaciones útiles en los programas de mejoramiento genético (Morela *et al.*, 2002).

En el caso de plántulas, la DL₅₀ o dosis reductiva media (GR₅₀) se determina cuando un carácter manifiesta una disminución de 50 % en su expresión con respecto al tratamiento testigo, pues la radicación absorbida provoca cambios en el ADN y origina mutaciones somáticas, mismas que causan alteraciones en la fisiología de la plántula (González *et al.*, 2007a).

El objetivo de esta investigación fue determinar la DL₅₀ al irradiar callos embriogénicos y plántulas de agave (ambos obtenidos *in vitro*) con rayos gamma de Co⁶⁰.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo inició con la siembra de tejido meristemático *in vitro* para obtener plántulas, de las cuales se utilizaron

secciones de hoja como explantes para producir callos.

Obtención de plántulas *in vitro*

Material biológico. Se utilizaron hijuelos de agave con piñas del tamaño de un limón (4 a 8 cm), vigorosos y sin síntomas de enfermedades, procedentes de plantas de 3 años de edad, colectados en el municipio de Arandas ubicado en la zona de los Altos de Jalisco (20° 41' 58" LN, 102° 21' 57" LO, y 2049 msnm).

Tratamiento de desinfección. Los hijuelos se lavaron con agua corriente, y luego se le eliminaron las hojas exteriores para dejar solamente las interiores que rodean al tejido meristemático. Los hijuelos así preparados se desinfectaron en una solución de alcohol etílico a 70 % por 1 min, y posteriormente en una solución de hipoclorito de sodio a 3 % por 20 min, en la cámara de flujo laminar bajo condiciones de asepsia. Se enjuagaron tres veces con agua bidestilada estéril, se colocaron en cajas de Petri estériles, y previo a la siembra *in vitro* se retiró el tejido dañado por el tratamiento de desinfección.

Medio de cultivo. El medio de cultivo usado para obtener las plántulas *in vitro* fue el MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 24.6 µM de ácido indolbútrico (AIB), 46.46 µM de cinetina, 30 g L⁻¹ de sacarosa y 8 g L⁻¹ de agar para su solidificación. El pH del medio se ajustó a 5.7 ± 0.03, y luego el medio con el agar fundido se vertió a razón de 25 mL por contenedor, después de lo cual se esterilizaron en autoclave por 15 min a una presión de 1.4 kg cm⁻² y una temperatura de 121 °C.

Siembra de meristemas *in vitro*. En la cámara de flujo laminar VECO® (Maryland, USA) bajo condiciones de asepsia, los meristemas apicales se cortaron en secciones de 0.5 cm de diámetro aproximadamente que constituyeron los explantes, y se sembraron dos explantes por contenedor; los contenedores se sellaron, rotularon y transfirieron a la cámara de incubación a una temperatura de 27 °C ± 1 °C con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad. A las 8 semanas de desarrollo las plántulas se transfirieron a recipientes (una plántula por contenedor) para su multiplicación en un medio MS en el que la concentración de AIB se redujo a 0.5 µM y se mantuvieron las concentraciones de citocinina, que en este caso se cambió a benciladenina BA (44.4 µM), más sacarosa (30 g L⁻¹) y agar (8 g L⁻¹), como propusieron Soltero *et al.* (1999; Com. personal)¹.

¹R Soltero, M F Nieto, C Ramírez (1999) Embriogénesis somática en *Agave tequilana* Weber, hacia el mejoramiento genético. Memorias VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, 12 al 17 de septiembre, Huatulco, Oaxaca. México.

Obtención de callo embriogénico *in vitro*

Medio de cultivo y siembra. Se utilizaron las sales minerales del medio básico MS adicionando con 13.57 μM de ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D), 8.87 μM de benciladenina (BA), 9.27 μM de cinetina, 30 g L⁻¹ de sacarosa y 8 g L⁻¹ de agar. Los callos se indujeron a partir de secciones de hoja de las plántulas obtenidas *in vitro*. Bajo condiciones de asepsia en la cámara de flujo laminar se abrieron los contenedores con las plántulas, se pusieron en cajas de Petri previamente esterilizadas, se cortaron las hojas y se devolvieron a los contenedores, que luego se sellaron y transfirieron a la cámara de crecimiento. Las hojas se seccionaron en cuadros de 0.5 cm² (explantes) y se colocaron seis explantes por contenedor. A la cuarta semana se presentó la inducción de los callos embriogénicos, mismos que se dejaron crecer antes de aplicarles los tratamientos de irradiación.

Irradiación con rayos gamma Co⁶⁰

En el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) se utilizó un irradiador Gammacell Modelo GO-220® (Ontario, Canada) para aplicar seis dosis de irradiación: 0 (testigo), 10, 20, 30, 40 y 50 Gy con rayos gamma de Co⁶⁰. La irradiación se llevó a cabo seis semanas después de la inducción de los callos y 12 semanas después de la emergencia de las plántulas.

Posterior al tratamiento de radiación, las plántulas se transfirieron a un medio MS suplementado con 0.53 μM de ácido naftalenacético (ANA) y 44.4 μM de benciladenina (BA) para su multiplicación. Por otro lado, los callos embriogénicos se transfirieron a un medio MS sin reguladores de crecimiento adicionado con 500 mg L⁻¹ de caseína hidrolizada y 250 mg L⁻¹ de glutamina.

Análisis estadístico

Se aplicó un diseño experimental completamente al azar con seis tratamientos y cinco repeticiones. La unidad experimental consistió de una plántula o un callo por repetición (cinco plántulas o cinco callos por tratamiento de radiación). Se hizo análisis de varianza ($\alpha = 0.01$) para altura (cm), número de nuevos brotes de plántulas y área del callo (cm²). Se utilizó la prueba de Tukey para la comparación entre medias. Para conocer la magnitud de la respuesta de cada variable a las dosis de radiación, se evaluaron dos modelos de regresión, lineal y cuadrática. Además se hizo un análisis de correlación lineal ($P \leq 0.01$), entre las dosis de radiación como variable independiente (X), y las variables dependientes (Y): inducción de brotes, crecimiento de las plántulas y el área del callo, para determinar la dosis letal media (DL₅₀) o dosis reductiva media (GR₅₀). Se evaluó la altura de plántula (de la base al ápice de la hoja más grande),

número de brotes nuevos y el área de callo (largo x ancho). Las mediciones se hicieron a las seis semanas después del tratamiento de irradiación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Formación de nuevos brotes, altura de plántula y tamaño de callo

Los análisis de varianza indicaron que las dosis de radiación causaron diferencias significativas ($P \leq 0.01$) en la inducción de nuevos brotes, en la altura de plántula y en el área del callo.

Al analizar el efecto de la radiación absorbida (radio sensibilidad) en la inducción de brotes y la altura de la plántula (Cuadro 1), se encontró que ambas variables no difirieron significativamente ($P \leq 0.05$) entre las plántulas irradiadas con 10 Gy y el testigo, aunque hubo reducción de 19 % en la inducción de brotes y de 5 % en altura. Esto indica que el desarrollo de nuevos brotes es viable cuando las plántulas se someten a esta dosis de radiación, sin afectar el porte de las plántulas.

Al aumentar la dosis de radiación a 20 Gy se detectaron efectos negativos importantes pues el número de brotes por plántula se disminuyó en 42 %, y en 43 % la altura de las plántulas. En las plántulas irradiadas con 30 Gy el efecto de la irradiación fue más severo, pues la inducción de brotes se redujo 65 % y la altura 56 %. Con dosis de 40 y 50 Gy el número de brotes fue estadísticamente similar a 30 Gy y lo mismo sucedió para la altura de las plántulas, excepto que a 50 Gy esta variable disminuyó en 71 %. Estos resultados indican que la inducción de brotes y la altura de plántula prácticamente se detuvieron a partir de la dosis de 30 Gy.

Al irradiar con Co⁶⁰ ápices de henequén (*Agave fourcroides* Lemark) cultivados *in vitro* con dosis de 10 a 50 Gy, González *et al.* (2007a) encontraron que al incrementar las dosis de radiación a 10, 20 y 30 Gy, el número de brotes por explante se redujo entre 40 y 60 %, con diferencias significativas entre el testigo y esas dosis. La DL₅₀ se ubicó en este rango por lo que esos autores recomiendan aplicar tales dosis en el mejoramiento *in vitro* a través de mutaciones. En la dosis de 50 Gy la mortalidad fue de 90 %. Según estos autores, en henequén la reducción del número de brotes evidenció la ruptura del balance hormonal que permite una buena proliferación, y además de que las variable peso del callo, mortalidad de los explantes y producción de brotes nuevos, resultaron excelentes indicadores de la radio sensibilidad, cuya dosis reductiva media (GR₅₀) se ubica entre 20 y 30 Gy.

Otahola *et al.* (2001) irradiaron explantes de crisantemo

Cuadro 1. Efecto de la radiación con Co⁶⁰ en brotes por plántula, altura de plántula y tamaño de callo de *A. tequilana* cultivada *in vitro*.

Dosis de radiación (Gy)	Brotes por plántula	Altura de plántula (cm)	Área del callo (cm ²)
0 (Testigo)	5.20 a	5.82 a	2.65 a
10	4.20 ab (19) †	5.52 a (5)	1.06 b (60)
20	2.60 bc (42)	3.30 b (43)	0.33 c (88)
30	1.80 cd (65)	2.54 cd (56)	0.27 c (90)
40	1.80 cd (65)	2.48 de (57)	0.38 c (86)
50	1.60 cd (69)	1.68 e (71)	0.23 c (91)
Media	2.93	3.56	0.82
DSH ^{††}	1.81	0.42	0.13

†Valores entre paréntesis corresponden a porcentajes de reducción con respecto al testigo. ††DSH = diferencia significativa honesta. Valores con la misma letra dentro de columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

(*Dendrothema grandiflorum* Ramat) con dosis de 5 a 20 Gy, y evaluaron su crecimiento a los 7, 14, 21 y 28 d posteriores a la irradiación. Ellos encontraron que a los 7 d no hubo diferencias significativas en el crecimiento entre las dosis de 5 a 15 Gy con respecto al testigo; en las fechas posteriores el mayor crecimiento se obtuvo con 5 Gy, mientras que con la dosis de 20 Gy el crecimiento se redujo en todas las fechas evaluadas. Estos resultados concuerdan con los de *A. tequilana* en que con dosis mayores a 20 Gy el crecimiento disminuye de 43 % a 71 %, mientras que con 10 Gy no difiere del tratamiento sin irradiar.

Lemus *et al.* (2002) evaluaron el efecto de la radiación en la longitud de las plántulas de dos genotipos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp a los 7 d después de la siembra, y encontraron diferencias significativas entre dosis absorbidas y entre genotipos, así como en la interacción. Los autores reportaron tres tipos de respuesta: 1) Plántulas altas que correspondieron a las no irradiadas e irradiadas con dosis de 150 Gy; 2) Plántulas de porte intermedio irradiadas con dosis de 300 a 700 Gy para uno de los genotipos; y 3) Plantas pequeñas con dosis de 300 Gy para el otro genotipo. En las plántulas de agave del presente estudio también se formaron tres grupos, los de dosis menores a 20 Gy que no mostraron diferencia con el testigo, un segundo grupo en el que se ubica la dosis reductiva media (GR₅₀) entre 20 y 30 Gy, y un tercer grupo con dosis mayores a 30 Gy en las que se detuvo el desarrollo de las plántulas.

En cuanto al efecto de la radiación en el área del callo, desde la dosis más baja el tamaño disminuyó a 1.06 cm² a la dosis de 10 Gy (vs. 2.65 cm² en el testigo) que representa una reducción de 60 %, y a dosis iguales o superiores a 20 Gy la reducción varió entre 88 y 91 %, sin diferencias significativas entre 20 y 50 Gy (Cuadro 1). Estas reducciones se atribuyen a que el callo es un tejido conformado por células embriogénicas con alta capacidad de diferenciación (mor-

fogénesis) y muy susceptibles a los cambios, principalmente cuando se altera el ADN (Freire, 2003).

Según Valdez *et al.* (2004), el crecimiento del callo en caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) es afectado por el incremento de la dosis de radiación, ya que el mayor crecimiento de callos se presentó con una dosis de 10 Gy aunque fue significativamente menor que el de los callos no irradiados, y el crecimiento se redujo más a medida que aumentó la dosis de radiación hasta los 30 Gy. Al igual que en el agave del presente estudio, la tendencia del crecimiento se redujo a medida que aumentó la dosis de radiación hasta 30 Gy, y con la dosis de 50 Gy el desarrollo fue muy pobre. García *et al.* (2001) también señalaron que este comportamiento se relaciona con el efecto fisiológico y citológico que producen las irradiaciones en las células. En caña de azúcar también se encontraron diferencias entre cultivares ('U-Thong 1' y 'Q83') en la resistencia a la radiación con rayos gamma, en cuanto a la formación de callo y regeneración de plantas (Ngampongsai *et al.*, 1992). En el presente estudio, el aumento en la radiación tuvo un efecto negativo en el comportamiento de las células embriogénicas de los callos de *A. tequilana*.

Se conoce que el contenido de humedad y de oxígeno presente en los callos incrementa la susceptibilidad de las células a las mutaciones ocasionadas por la radiación acumulada en cada dosis (IAEA, 1977), lo que aunado a que genéticamente las células embriogénicas tienen una estructura bipolar, se esperarían cambios en el ADN al perder la capacidad de diferenciación que las caracteriza (Freire, 2003). Esto explicaría los altos índices de decaimiento que aquí se registraron en *A. tequilana*, aun en las dosis de 10 y 20 Gy. Resultados similares reportó Rodríguez (2000; Com. personal)², quien trabajó con

²Rodríguez D J M (2000) Estudio de Radio sensibilidad en tejido somático de *Agave tequilana* Weber Var. Azul. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad de Guadalajara. 55 p.

callos embriogénicos de *A. tequilana* y encontró que a dosis mayores a 45 Gy se detuvo el crecimiento, y no encontró respuesta de los callos en la inducción de embriones.

Dosis letal media

La DL₅₀ se determinó mediante análisis de regresión entre las dosis establecidas (de 0 a 50 Gy) y la inducción de brotes, altura de plántula y desarrollo de callo, y los mejores ajustes (R²) se obtuvieron con los modelos lineal y cuadrático (Cuadro 2).

Se obtuvo una correlación negativa y altamente significativa entre las dosis de Co⁶⁰ y las variables evaluadas, lo que indica que la radiación absorbida produjo mutaciones en el ADN de las células y alteró su desarrollo normal conforme la dosis se incrementó.

La DL₅₀ o GR₅₀ se determinó a través de regresión lineal y regresión cuadrática. En brotes por planta se encontró diferencia de 5.9 Gy, 2.6 Gy para altura de plántula y 7.9 Gy para el área del callo; lo que indica que ambos modelos resultaron eficientes para determinar la DL₅₀. Sin embargo, el modelo cuadrático fue el que mejor se ajustó (mayor R²) para simular el efecto de la radiación conforme ésta se incrementó.

La mayor diferencia se obtuvo en el área del callo debido a que es una estructura conformada por células competentes que generan estructuras bipolares (embriones), atribuible a que la radiación probablemente indujo cambios en este patrón al modificar la totipotencia celular (Freire, 2003). En altura de plántula los modelos reportaron prácticamente el mismo valor, pero en número de brotes la diferencia fue de 25 %.

De acuerdo con los resultados, las dosis de radiación que

deben aplicarse a explantes de agave propagados *in vitro* para inducir variabilidad, se ubican entre 20 y 25 Gy para plántulas y de 15 a 25 Gy para callos, debido a que en estas dosis se incrementa la probabilidad de inducir mutaciones favorables para fines de selección y mejoramiento genético (Morela *et al.*, 2002). Estos resultados coinciden con los reportados por González *et al.* (2007a), quienes aplicaron dosis de 10 a 50 Gy a brotes apicales de henequén micropropagados, y reportaron una dosis letal media de 30 Gy para la producción de nuevos brotes axilares y de 20 Gy para la disminución en el peso fresco de callo. En callos de papa (*Solanum tuberosum* L.), Novisel *et al.* (2007) reportaron que la dosis de 10 Gy corresponde a la DL₅₀ para la inducción de variabilidad genética como parte del programa de mejoramiento genético.

CONCLUSIONES

Las dosis de radiación absorbidas tuvieron efecto directo en el desarrollo de las plántulas y en el desarrollo de callo, pues ambas variables presentaron altos índices de reducción con dosis superiores a 30 Gy. La DL₅₀ se ubicó entre 20 y 25 Gy para la inducción de brotes adventicios y altura de plántula, y de 15 a 25 Gy para callo. Por tanto, las dosis de radiación para inducir variabilidad en plántulas de agave propagadas *in vitro* deben ubicarse de 15 a 25 Gy para favorecer la aparición de mutaciones favorables.

BIBLIOGRAFÍA

Freire S (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotec. Veg.* 3:195-209.
 García L R, P Orellana, L García, J Pérez, V Rodríguez, I Bermúdez, J Clavero, C Romero (2001) Empleo de la mutagénesis en la mejora al grosor del tallo del somaclón IBP 89-169 de caña de azúcar. *Biotec. Veg.* 2:71-75.
 González G S, M Alemán, R O Garriga, C de la Fe (2007a) Radio sensitivity to gamma rays (⁶⁰Co) in shoot tips of henequen. *Biotec. Veg.* 7:115-117.

Cuadro 2. Correlaciones, regresiones lineal y cuadrática para número de brotes, altura de plántula y tamaño de callo, vs. dosis de radiación con Co⁶⁰

	Brotes por plántula	Altura de plántula (cm)	Área de callo (cm ²)
Correlación "r"	- 0.78**	- 0.94**	- 0.79**
Valor crítico	P = 0.001	P = 0.001	P = 0.001
Ec. lineal	Y = 4.80 - 0.072X; R ² = 0.62	Y = 5.741 - 0.087X; R ² = 0.88	Y = 1.832 - 0.041X; R ² = 0.62
Ec. cuadrática	Y = 5.34 - 0.15X + 0.0015X ² ; R ² = 0.75	Y = 6.10 - 0.14X + 0.0011X ² ; R ² = 0.92	Y = 2.46 - 0.13X + 0.0019X ² ; R ² = 0.84
DL ₅₀ (Gy) lineal	25.9 Gy	24.9 Gy	24.8 Gy
DL ₅₀ (Gy) cuadrática	20.0 Gy	22.3 Gy	16.9 Gy

** Diferencias altamente significativas a P ≤ 0.05

- González H, J Del Real, J Solís (2007b)** Manejo de Plagas del Agave Tequilero. Ed. Colegio de Postgraduados y Tequila Sauza, S.A de C.V. 123 p.
- IAEA, International Atomic Energy Agency (1977)** Manual of Mutation Breeding. 2nd. ed. Vienna, Austria. 288 p.
- Lemus Y, N Méndez, J Cedeño, V Otahola-Gómez (2002)** Radio sensibilidad de dos genotipos de frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) a radiaciones gamma. Rev. Cient. UDO Agríc. 2:22-28.
- Morela F, V González, L Castro (2002)** Efecto de la radiación Gamma sobre la diferenciación de plantas de caña de azúcar a partir de callos. Agron. Trop. 52:311-323.
- Murashige T, F Skoog (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Ngampongasai S, W Sriphisut, P Sruiyapan (1992)** Use of radiation and tissue culture techniques to induced mutation in sugarcane. In: Research Report Buri Field Crops Research Center. Dept. of Agriculture. Suphan Buri, Thailand. pp:133-143.
- Novisel V, L R García, I Bermúdez, P Orellana, Y Padrón, D Torres (2007)** Efecto de las radiaciones gamma sobre callos de papa var. 'Desirée'. Biotec. Veg. 7:57-61.
- Otahola G V, M Aray, A Yira (2001)** Inducción de mutantes para el color de la flor en crisantemo (*Dendranthema grandiflora* (Ram) Tzevelev) mediante radiaciones gamma. Rev. Cient. UDO Agríc. 1:56-63.
- Robles S R (1986)** Genética Elemental y Fitomejoramiento Práctico. 1ª ed. Ed. Limusa Wiley. 475 p.
- Valdez B A, P Orellana, N Veitia, D Torres (2004)** Crecimiento, regeneración y radiosensibilidad de callos de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido var. "SP 70-1284") tratados con radiación gamma fuente ⁶⁰Co. Biotec. Veg. 4:165-169.