

DOSIS LETAL Y REDUCTIVA MEDIA CON RAYOS GAMMA EN *Clitoria ternatea* VAR. TEHUANA

LETHAL AND MEDIAN REDUCTIVE DOSES WITH GAMMA RAYS IN *Clitoria ternatea* VAR. TEHUANA

Gálvez-Marroquín, L. A.^{1*}; Maldonado-Méndez, J. J.²; Guerra-Medina, C. E.²; Ovando-Cruz, M. E.¹; Ortiz-Curiel, S.²; Martínez-Bolaños, M.²; Gómez-Simuta, Y.³

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valles Centrales de Oaxaca. Melchor Ocampo No. 7, Santo Domingo Barrio Bajo, Etlá, Oaxaca. ²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Rosario Izapa. Km 18. Carretera Tapachula-Cacahoatán. Tuxtla Chico, Chiapas, México. ³Subdirección de Producción, Programa Moscamed-Moscafrut, Metapa de Domínguez, Chiapas.

*Autor por correspondencia: galvez.luis@inifap.gob.mx

ABSTRACT

The objective was to estimate the lethal and median reductive doses with gamma radiation, in seeds of *Clitoria ternatea* var. Tehuana, to induce genetic variation. Ten (10) doses of radiation (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 and 1000 Gy) were used, plus one control (without radiation). The experimental design was completely random with three repetitions. The germination was evaluated 12 days after sowing (das), while the survival, plant height, stem diameter, number of leaflets and leaf area, at 30 das. The data were analyzed through ANOVA and the means comparison with the Dunnett test. The LD₅₀ and GR₅₀ for plant survival and height were estimated through linear regression. The radiation did not influence the germination and stem diameter; however, the survival was reduced significantly starting at 300 Gy, compared with the control (39.16%). Meanwhile, for plant height, leaflet number and leaf area it was from 100, 200 and 400 Gy (15.24, 22.54 and 70.26 %). The LD₅₀ and GR₅₀ was estimated at 350.91 and 306.1 Gy. The dose of gamma radiation to induce genetic variation in *Clitoria ternatea* var. Tehuana is suggested at between 306 and 350 Gy.

Keywords: *Clitoria ternatea*, LD₅₀, GR₅₀, gamma radiation.

RESUMEN

El objetivo fue estimar la dosis letal y reductiva media en semillas de *Clitoria ternatea* var. Tehuana con radiación gamma para inducir variación genética. Se utilizaron 10 dosis de radiación (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 Gy) más un control (sin irradiar). El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones. Se evaluó la germinación a 12 días después de la siembra (dds), mientras que la supervivencia, altura de planta, diámetro de tallo, número de folíolos y área foliar, a los 30 dds. Los datos fueron analizados mediante ANOVA y la comparación de medias con la prueba de Dunnett. La DL₅₀ y GR₅₀ para supervivencia y altura de planta se estimaron mediante regresión lineal. La radiación no influyó en la germinación y diámetro de tallo; sin embargo, la supervivencia se redujo de manera significativa a partir de 300 Gy comparado con el testigo (39.16%). Mientras que, para altura de planta, número de folíolos y área foliar fue a partir de 100, 200 y 400 Gy (15.24, 22.54 y 70.26 %). La DL₅₀ y GR₅₀ se estimó a 350.91 y 306.1 Gy. La dosis de radiación gamma para inducir variación genética en *Clitoria ternatea* var. Tehuana se sugiere entre 306 y 350 Gy.

Palabra clave: *Clitoria ternatea*, DL₅₀, GR₅₀, radiación gamma

INTRODUCCIÓN

En las regiones tropicales *Clitoria ternatea* (Fabaceae) es una especie importante para forraje por su aporte de nutrientes para los rumiantes (Villanueva-Avalos *et al.*, 2004). *C. ternatea* se ha utilizado para la alimentación de ganado productor de carne y leche, además es altamente palatable por lo que es preferida por el ganado sobre otras leguminosas (Michael-Gómez y Kalamani, 2003). No obstante, se requiere incrementar el rendimiento de biomasa y capacidad de rebrote mediante programas de mejoramiento. La base del mejoramiento genético de cultivos depende de la magnitud de la variabilidad genética. Sin embargo, se reporta que *C. ternatea* presenta baja diversidad genética (Bishoyi *et al.*, 2014; Ali *et al.*, 2013).

Un factor que favorece la generación de diversidad genética es la mutación, la cual puede ser natural o inducida. La mutagénesis inducida genera mayor frecuencia de mutaciones comparado con las mutaciones naturales, siendo la radiación gamma un mutágeno efectivo para inducir las en plantas de importancia económica (<http://mvd.iaea.org>). La radiación gamma produce mutaciones múltiples en el genoma objetivo como sustitución de base simple e inserciones/deficiencias (Li *et al.*, 2016). Sin embargo, se requiere determinar la dosis óptima que genere la mayor frecuencia de mutaciones favorables en el genotipo de interés. La dosis óptima de radiación está relacionada con los parámetros dosis letal media y reductiva media de la primera generación irradiada (DL_{50} y GR_{50}), por ello su determinación es importante (Ángeles-Espino *et al.*, 2013). Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue estimar la dosis letal y reductiva media en semillas de *C. ternatea* var. Tehuana con rayos gamma (^{60}Co) y el efecto sobre la germinación, supervivencia, altura de planta, diámetro de tallo, número de foliolos y área foliar.

MATERIALES Y MÉTODOS

La irradiación de las semillas de *C. ternatea* var. Tehuana se efectuó en la planta de irradiación de Moscafrut dependiente de la SAGARPA, ubicado en Metapa de Domínguez, Chiapas, México, con el equipo panorámico Gamma Beam 127 MDS Nordion, con fuente de almacenamiento de 50 g ^{60}Co en seco, con una razón de dosis de 0.029 Gy s^{-1} . Las semillas fueron expuestas a dosis de radiación gamma de 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 Gy, se utilizaron 75 semillas por dosis con 10.16% de humedad.

La evaluación del efecto de la radiación gamma en las semillas de *C. ternatea* se realizó bajo condiciones de invernadero en el Campo Experimental Rosario Izapa del INIFAP, ubicado en Tuxtla Chico, Chiapas ($14^{\circ} 40' 16.1'' \text{ N}$, $92^{\circ} 42' 59.1'' \text{ O}$, y 435 m de altitud). La siembra se realizó un día después de la irradiación de las semillas, en charolas de germinación con cavidades de 5.2 cm de diámetro \times 10 cm de profundidad, donde se utilizó como sustrato peatmoss[®]. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones, cada repetición consistió de 25 cavidades donde se depositó una semilla de *C. ternatea* var. Tehuana por cavidad.

Las variables evaluadas fueron el porcentaje de germinación de semillas 12 días después de la siembra (dds), mientras que la supervivencia de plantas, altura de planta, diámetro de tallo, número de foliolos y área foliar, se re-

gistró a los 30 dds. La germinación y supervivencia, se calcularon con las siguientes ecuaciones: $PG = (\text{Número de semillas germinadas a los 12 días} / 25 \text{ semillas}) \times 100$, y $PS = (\text{número de plantas vivas por repetición} / \text{número de plantas germinadas a los 12 dds}) \times 100$. Para altura de planta, número de foliolos y área foliar, la evaluación se efectuó en cinco plantas por repetición, 15 plantas en total por tratamiento. Respecto al área foliar se determinó con el integrador de área foliar LICOR, LI 3100 (tres determinaciones por planta).

Los datos se analizaron mediante ANOVA y la comparación de medias con respecto al control se efectuaron con la prueba de Dunnett con una confiabilidad del 95%; para altura de planta, diámetro de tallo, número de foliolos y área foliar sólo se analizaron dosis desde 100 hasta 400 Gy, ya que en dosis de 500 y 600 Gy hubo menos de cinco plantas por repetición. La DL_{50} y GR_{50} para supervivencia y altura de planta, se estimaron mediante los parámetros de modelos de regresión lineal simple. En todos los análisis efectuados se comprobaron los supuestos de normalidad de datos de cada modelo estadístico; cada uno de ellos se realizó en SAS versión 9.0 (SAS, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La radiación gamma no influyó en la germinación de semillas de *C. ternatea* var. Tehuana ($p > 0.05$, $cv = 9.1$). En el tratamiento control se registró 81.5% de germinación, mientras en los tratamientos con radiación la germinación osciló entre 71.5 y 78.5 % (Figura 1A). Estos resultados son congruentes con los reportados por Gálvez-Marroquín *et al.* (2017), que mostraron que dosis

de 100 hasta 1000 Gy no influyen en la germinación de semillas de soya (*Glycine max* L.) var. Huasteca 100. Por el contrario, en semillas en *Zinnia elegans*, la capacidad de germinación fue reducida en dosis de 100 y 125 Gy comparado con el control (Pallavi et al., 2017). Otros estudios, determinaron dosis de 25 Gy hasta 200 Gy, y promovieron la germinación, velocidad de germinación e índice de vigor en *Terminalia arjuna* (Akshatha et al., 2018). En cuanto al factor genético, el nivel de ploidía, contenido de ADN y fase del ciclo celular influyen en la sensibilidad a la radiación gamma (Lagoda et al., 2012). Asimismo, el contenido de humedad en las semillas afecta la germinación de semillas tratadas con rayos gamma como reporta Minisi et al. (2013) en *Molucella laevis* L. a los 10 dds; semillas humedecidas con agua 12 horas antes de la irradiación presentaron menor germinación comparado con semillas sin tratamiento previo.

La radiación gamma influyó en la supervivencia de plantas de *C. ternatea* var. Tehuana ($P < 0.05$, $cv = 16.09$). En dosis de 100 y 200 Gy la supervivencia de plantas fue similar al control (98.33 y 91.24%), mientras tanto, a partir de dosis de 300 hasta 600 Gy, la supervivencia se afectó de manera significativa con promedios de 60.84% hasta 5.83%; y dosis superiores a 600 Gy provocaron 100% de mortalidad de plantas (Figura 1B). Estos resultados son congruentes con lo reportando por Ulukapi y Ozmen (2018), quienes mostraron una disminución de la supervivencia de las variedades de *Phaseolus vulgaris* L. F16 y Efsane, con el incremento de la dosis de radiación gamma. Además, Minisi et al. (2013) concluyen que dosis altas de radiación reducen la germinación, supervivencia y altura de planta de *Molucella laevis* L. Esto puede ser debido a daños genéticos y fisiológicos en las plantas por efecto de la radiación gamma (Kamaruddin et al., 2016). Asimismo, se reporta que la supervivencia de plantas a la madurez depende de la naturaleza y el alcance del daño cromosómico (Kiong et al., 2008). En cuanto a daños en cromosomas por radiación, Ahirwar (2015) reporta en células mitóticas de *Allium cepa* L. incremento de aberraciones cromosómicas como dicéntricos, tricéntricos, deficiencias y fragmentos acéntricos con el incremento de la dosis de radiación gamma.

En la altura de planta de *C. ternatea* var. Tehuana, la radiación gamma provocó efectos significativos ($p < 0.05$, $cv = 6.64$). Se registró una tendencia gradual hacia promedios inferiores de altura de planta con el incremento de la dosis de radiación gamma (Figura 1C). A partir de dosis 300 Gy, la altura de las plantas fue 50% menor

comparado con el control. Las plantas con menor altura se observaron en dosis de 500 Gy. Estos resultados son congruentes con los reportados por Grover y Khan (2014), quienes obtuvieron reducción de la altura de planta de avena (*Avena sativa* L.) con dosis de 10 Gy hasta 25 Gy. El efecto negativo en la altura de planta puede estar relacionado con la reducción de reactividad al ácido indolacético por la radiación gamma (Miura et al., 1974). Asimismo, puede ser atribuido a menor división celular, como se reporta en *Phlox drummondii* (Ramesh y Verma, 2015). En otra variable, como el diámetro de tallo de *C. ternatea* var. Tehuana, la radiación no afectó ($p > 0.05$, $cv = 5.65$). El promedio de diámetro de tallo en los tratamientos de irradiación y en el control fue de 2 mm (Figura 1D). Wang et al. (2017) encontraron en dosis de 200 y 400 Gy promedios de diámetro de tallo de *Sophora davidii* similares al control, por el contrario, en dosis de 600 y 800 Gy, obtuvieron los mayores diámetros de tallo (3.86 y 3.93 mm).

La radiación gamma afectó de manera significativa el número de foliolos promedio de *C. ternatea* var. Tehuana ($p < 0.05$, $cv = 16.73$). En dosis de 100 Gy, la media de foliolos por planta fue similar al tratamiento control (9 y 11 foliolos por planta, respectivamente). Mientras en dosis de 200, 300, 400 y 500 Gy, se registraron diferencias significativas comparados con el control. En dosis de 500 Gy se registró el menor número de foliolos por planta (Figura 1E). Por su parte, Yadav (2016) reportan en dosis de radiación desde 100 hasta 250 Gy, mayor número de hojas de *Canscora decurrens*, mientras que dosis de 300 hasta 500 Gy, registraron un efecto negativo en el número de hojas. El menor número de foliolos por planta está asociado a menor desarrollo de plantas tratadas con altas dosis de radiación gamma.

Respecto al área foliar por planta, la radiación gamma influyó en el área foliar ($p < 0.05$, $cv = 15.65$). Dosis de 100, 200 y 300 Gy, presentaron promedios de área foliar similares al control (33.16, 32.46, 27.04 y 37.01 cm²). Por el contrario, las plantas de *C. ternatea* obtenidas de semillas tratadas con dosis de 400 Gy registraron la menor media de área foliar (Figura 1F), esto relacionado al menor número y forma de los foliolos. Los foliolos de las plantas de 400 Gy presentaron formas elípticas en contraste con el control que fueron aovado a elíptico oblongo. Singh et al. (2013) reportan menor área de la hoja bandera de trigo con dosis de radiación gamma 10 Gy comparado con el control. Mientras, El-Khateeb et al. (2016) reporta el mayor promedio de área foliar en

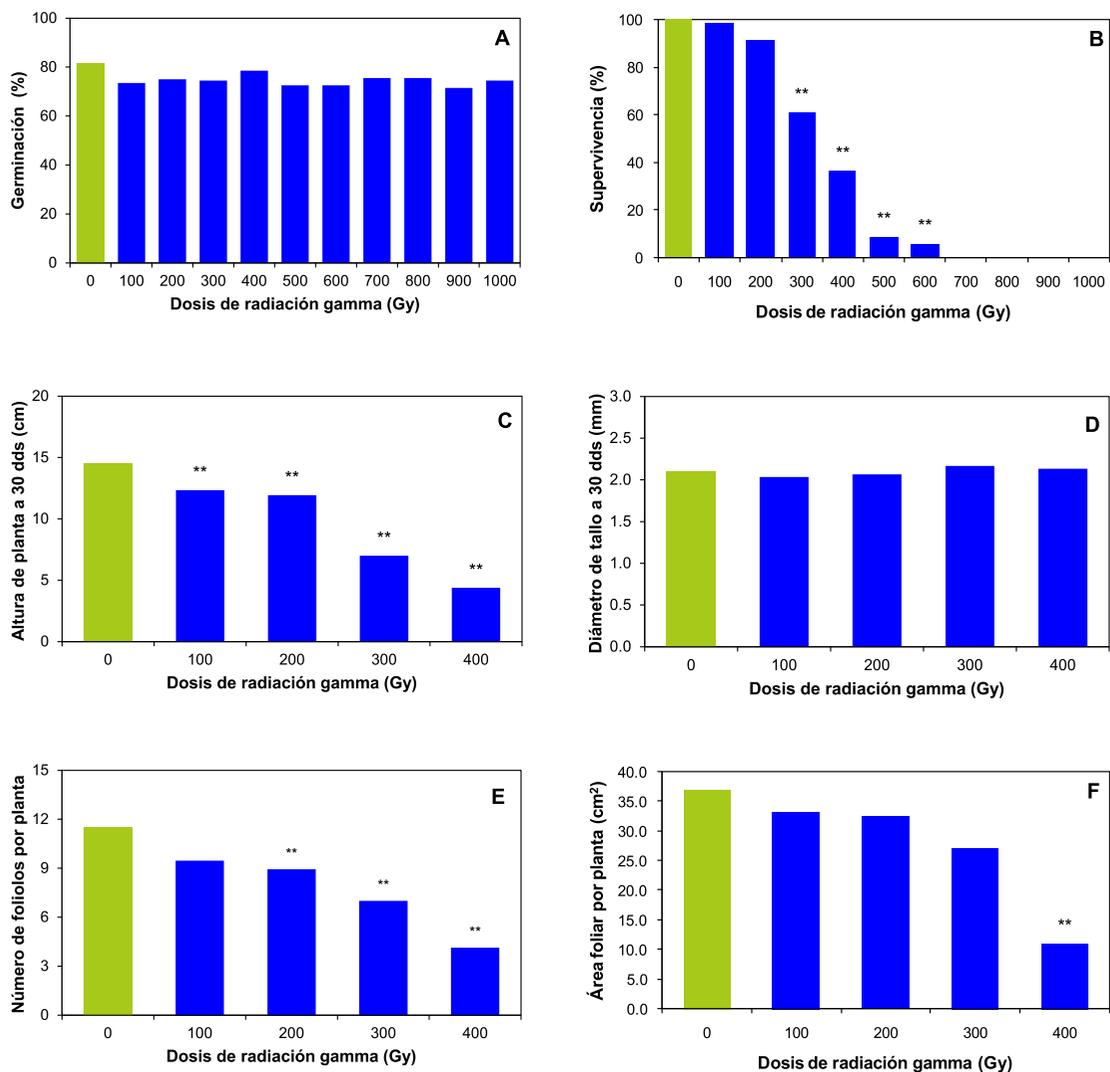


Figura 1. Efecto de la radiación gamma en semillas de *C. ternatea* var. Tehuana: A) Germinación de semillas, B) Supervivencia de planta, C) Altura de planta, D) Diámetro de tallo, E) Número de folíolos y F) Área foliar.

Philodendron scandens a 50 Gy y la menor media a 200 Gy.

Dosis letal y reductiva media

La dosis letal y reductiva media son parámetros básicos de estudios de radiosensibilidad a los rayos gamma en especies vegetales para iniciar un programa de mejoramiento genético asistido por inducción de mutagénesis; su importancia radica en su uso para inducir mutaciones favorables en el material genético objetivo (Hernández-Muñoz *et al.*, 2017, Ángeles-Espino *et al.*, 2013). En este sentido, Talukdar (2011) al irradiar semillas de *C. ternatea* var. CAZR-1466 a 250 Gy de rayos gam-

ma, identificó en la generación M3 el mutante CR2 con alta tolerancia a 130mM de NaCl. En el presente estudio la DL₅₀ para supervivencia de plantas de *C. ternatea* var. Tehuana se estimó a 350.91 Gy y la GR₅₀ para altura de planta a 306.22 Gy. Estas estimaciones se realizaron con modelos de regresión lineal simple con coeficientes de determinación superiores

al 0.9, que indica que más del 90% de la respuesta de la supervivencia y altura de plantas fue debido a la radiación gamma (Cuadro 1 y Figura 2). En otras fabáceas, como *Vigna unguiculata* genotipos Nakare, Shindimba y Bira, la DL₅₀ fue a 165.24, 198.69 y 689 Gy, de manera respectiva (Horn y Shimelis, 2013), mientras, en *Vigna radiata* L., fue a 619.875 Gy (Roslim *et al.*, 2015).

Cuadro 1. DL ₅₀ y GR ₅₀ para supervivencia y altura de planta de <i>C. ternatea</i> var. Tehuana por efecto de la radiación gamma ⁶⁰ Co, estimados mediante regresión lineal.					
Variable	Pr>F	R ²	Ecuación	DL ₅₀	GR ₅₀
Supervivencia	<.0001	0.9180	Y=109.9325-0.17079x	350.91	-
Altura de planta	<.0001	0.9523	Y=15.20810-0.02589x	-	306.22

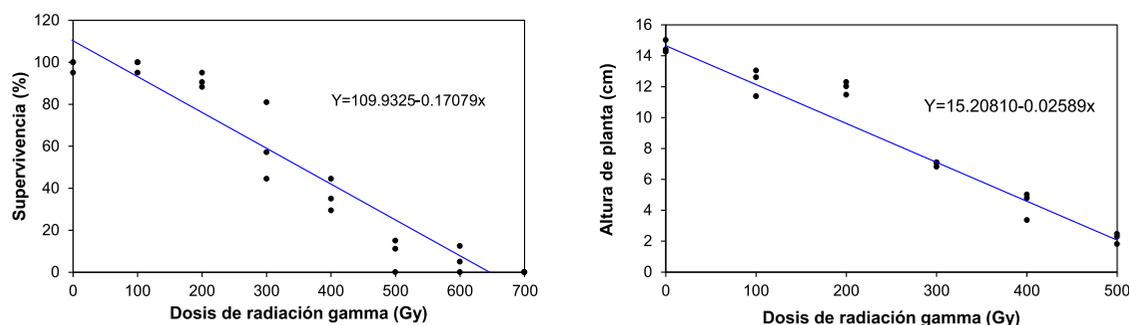


Figura 2. Efecto de la radiación gamma en *C. ternatea* var. Tehuana: A) Supervivencia de plantas y B) Altura de planta, y sus respectivas simulaciones mediante regresión lineal.

En razón de lo anterior, dosis de radiación gamma entre 306 y 350 Gy pueden inducir variación genética en *C. ternatea* var. Tehuana.

CONCLUSIONES

El incremento de la dosis de radiación gamma ^{60}Co , tiene un efecto de disminución de la supervivencia, altura de planta, número de foliolos y área foliar de *Clitoria ternatea* var. Tehuana, excepto para germinación y diámetro de tallo. A partir de dosis de radiación de 100 Gy se observan efectos negativos en las variables de estudio de manera significativa. Dosis de radiación gamma ^{60}Co desde 306 hasta 350 Gy pueden ser utilizadas para inducir variación genética en *Clitoria ternatea* var. Tehuana.

LITERATURA CITADA

- Ahirwar R. 2013. Gamma radiation induced chromosomal aberrations at mitosis in *Allium cepa* L. International Journal of Science and Research 4: 855-858.
- Akshatha K. R., Chandrashekar H. M., Somashekarappa, Souframanien J. 2013. Effect of gamma irradiation on germination, growth, and biochemical parameters of *Terminalia arjuna* Roxb. Radiation Protection and Environment 36: 38-44.
- Ali Z., Ganie S. H, Narula A., Sharma M. P., Srivastava P. S. 2013. Intra-specific genetic diversity and chemical profiling of different accessions of *Clitoria ternatea* L. Industrial Crops and Products 43: 768-773.
- Ángeles-Espinosa A., Valencia-Botín J. A., Virgen-Calleros G., Ramírez-Serrano C., Paredes-Gutiérrez L., Hurtado-De La Peña S. 2013. Determinación de la dosis letal (DL_{50}) con ^{60}Co en vitroplantas de *Agave tequilana* var. Azul. Rev. Fitotec. Mex. 36: 381-386.
- Bishoyi A.K., Pillai V.V., Geetha K.A., Satyabrata M. 2014. Assessment of genetic diversity in *Clitoria ternatea* populations from different parts of India by RAPD and ISSR markers. Genetic Resources and Crop Evolution 61: 1597-1609.
- El-Khateeb M. A., Abdel-Ati K. E. A., Khalifa M. A. S. 2016. Effect of gamma irradiation on growth characteristics, morphological variations, pigments and molecular aspects of *Philodendron scandens* plant. Middle East Journal of Agriculture Research 5: 6-13.
- Gálvez-Marroquín L. A., Avendaño-Arrazate C. H., Alonso-Báez M., Maldonado-Méndez J. J., Gómez-Simuta Y., Ortiz-Curiel S., Verdugo-Velázquez A. J. 2017. Radio-sensitivity on Huasteca-100 soybean seeds variety with ^{60}Co gamma radiation. Int. J. Curr. Res. Aca. Rev. 5: 19-25.
- Grover S., Khan A. S. 2014. Effect of ionizing radiation on some characteristics of seeds of wheat. International Journal of Scientific & Technology Research 3: 32-39.
- Hernández-Muñoz S., Pedraza-Santos M. E., López P. A., De La Cruz-Torres E., Fernández-Pavía S.P., Martínez-Palacios A., Martínez-Trujillo M. 2017. Determinación de la DL_{50} y GR_{50} con rayos gamma (^{60}Co) en protocormos de *Laelia autumnalis* in vitro. Agrociencia 51: 507-524.
- Horn L., Shimelis H. 2013. Radio-sensitivity of selected cowpea (*Vigna unguiculata*) genotypes to varying gamma irradiation doses. Scientific Research and Essays 8: 1991-1997.
- Kamaruddin N. Y., Abdullah S., Harun A. R. 2016. The effect of gamma rays on the radiosensitivity and cytological analysis of *Zingiber officinale* roscoe varieties Bentong and Tanjung Sepat. Int'l Journal of Advances in Agricultural & Environmental Engg. 3: 142-145.
- Kiong A., Pick A. L., Lai S. H. G., Harun A. R. 2008. Physiological responses of *Orthosiphon stamineus* plantlets to gamma irradiation. American Eurasian Journal Sustainable Agriculture 2: 135-149.
- Lagoda P. J. L. 2012. Effects of radiation on living cells and plants. In: Shu, Q. Y., Forster, B. P. and Nakagawa, H., Eds., Plant mutation breeding and biotechnology, Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture International Atomic Energy Agency, Vienna, 123-134.
- Li S., Zheng Y. C., Cui H. R., Fu H. W., Shu Q. Y., Huang J. Z. 2016. Frequency and type of inheritable mutations induced by γ rays in rice as revealed by whole genome sequencing. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology) 17: 905-915.
- Michael-Gomez S., Kalamani A. 2003. Butterfly Pea (*Clitoria ternatea*): A nutritive multipurpose forage legume for the Tropics - An Overview. Pakistan Journal of Nutrition 2: 374-379.
- Minisi F. A., El-Mahrouk M. E., Rida M. E. F., Nasr M. N. 2013. Effects of gamma radiation on germination, growth, characteristics and morphological variations of *Moluccella laevis* L. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci. 13: 696-704.
- Miura K., Hashimoto T., Yamaguchi H. 1974. Effect of gamma-irradiation on cell elongation and auxin level in *Avena coleoptiles*. Radiation Botany 14: 207-215.

- Pallavi B., Nivas S. K., D'souza L., Ganapathi T.R., Hegde S. 2017. Gamma rays induced variations in seed germination, growth and phenotypic characteristics of *Zinnia elegans* var. Dreamland. *Advances in Horticultural Science* 31: 267-273.
- Ramesh A., Verma R. C. 2015. Effect of gamma radiation on chromosome at mitotic division in *Phlox drummondii*. *International Research Journal of Biological Sciences* 4: 82-85.
- Roslim D. I., Herman, Fiatin I. 2015. Lethal dose 50 (LD₅₀) of Mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) cultivar Kampar. *SABROA Journal of Breeding and Genetics* 47: 510-516.
- Singh B., Ahuja S., Singhal R. K., Babu P. V. 2013. Effect of gamma radiation on wheat plant growth due to impact on gas exchange characteristics and mineral nutrient uptake and utilization. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 298: 249-257.
- SAS Statistical Analysis System. 2002. Institute Inc., SAS/STAT. User's Guide, versión 9.0. Carey, N. C.
- Talukdar D. 2011. Isolation and characterization of NaCl-tolerant mutations in two important legumes, *Clitoria ternatea* L. and *Lathyrus sativus* L.: Induced mutagenesis and selection by salt stress. *Journal of Medicinal Plants Research* 5: 3619-3628.
- Ulukapi K., Ozmen S. F. 2018. Study of the effect of irradiation (⁶⁰Co) on M1 plants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars and determined of proper doses for mutation breeding. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 1-5. doi.org/10.1016/j.jrras.2017.12.004.
- Villanueva-Avalos J. F., Bonilla-Cárdenas J. A., Rubio-Ceja J. V., Bustamante-Guerrero J. J. 2004. Agrotecnia y utilización de *Clitoria ternatea* en sistemas de producción de carne y leche. *Técnica Pecuaria en México* 42: 79-96.
- Wang P., Zhang Y., Zhao L., Mo B., Luo T. 2017. Effect of Gamma Rays on *Sophora davidii* and Detection of DNA Polymorphism through ISSR Marker. *BioMed Research International*. Article ID 8576404: 1-6.
- Yadav V. 2016. Effect of gamma radiation on various growth parameters and biomass of *Canscora decurrens* Dalz. *International Journal of Herbal Medicine* 4: 109-115.

