

CURVA DE RADIOSENSIBILIDAD CON ^{60}Co EN GUINEA (*PANICUM MAXIMUM* JACQ.) CV. K-249

G. Lajonchere, A.R. Mesa, Marlenis Prieto y Elsa Sánchez-Quiroz

**Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey"
Matanzas, Cuba**

Con el objetivo de seleccionar el adecuado criterio de radiosensibilidad y las dosis útiles, se estudiaron los efectos de las radiaciones gamma sobre callos embriogénicos de guinea cv. K-249. Las dosis de aplicación fueron 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300 y 400 Gy y las medidas evaluadas: el incremento de masa fresca de los callos en medio fresco y el número de brotes, plantines y total por callo y por gramo de callo en medio de regeneración. Se determinó del análisis de los resultados que las curvas formadas con el número de brotes, plantines y total por callo y por gramo de callo, fueron más radiosensibles que la formada con el incremento de masa fresca de los callos; se seleccionó como criterio de radiosensibilidad en este cultivar el número total de brotes y plantines por gramo de callo, por la sencillez y veracidad tanto en la evaluación como en los resultados. Las dosis útiles que determinaron un Gy 10, 20, 50 y 70% fueron 16, 20, 29 y 160 Gy respectivamente. Se observaron además brotes albinos, cuyos valores se mostraron aleatoriamente, e incluso se observó albinismo en la dosis 0.

Palabras claves: *Cultivo de tejidos, radiosensibilidad, embriogénesis somática, Panicum maximum Jacq.*

In order to select the adequate radiosensitivity criterion and useful dosis were studied the effects of gamma radiation on the embryogenic callus of guinea cv. K-249. The application dosages were 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300 and 400 Gy and the measures evaluated were: increase of fresh mass of the callus in fresh medium, number of shoots, plantlets and total by callus and by gram of callus in regeneration medium. It was determined that the curves shaped with the number of shoots, plantlets and total by callus and by gram of callus were more radiosensible than that shoped with increase of fresh mass of the callus; as criterion of radiosensitivity in mis cultivar the total number of shoots and plantlets from gram of callus was selected for ifs simplicity and veracity as much as in the evaluation and in the results. The useful dosis that determined one GR 10, 20, 50 and 70% were 16, 20, 29 and 160 Gy respectively. Albino shoots were also observed whose values were randomizely showed and it was observed albinism in O dosis.

Additional index words: *In vitro tissue, radiosensitivity, somatic embryogenesis, Panicum maximum Jacq.*

En la búsqueda de novedosas vías para el mejoramiento genético, se ha recurrido al cultivo de tejidos por sus conocidas ventajas, que permiten obtener en un corto período de tiempo un número considerable de nuevos individuos (Scowcroft y Larkin, 1982;

Rodríguez, 1992), ya que los métodos rutinarios de cruzamiento de plantas para la inducción de variación genética son insuficientes (Bajaj, Sidhu y Dubey, 1981).

A pesar de que la organogénesis conlleva a una menor estabilidad genética, favorable a la

variación somaclonal, ha sido poco aplicada en los pastos; sin embargo, la embriogénesis somática presenta características distintivas más ventajosas con respecto a dicha técnica (Pérez Ponce y Agramonte, 1992) y es más fácil de obtener.

La embriogénesis somática en el género *Panicum* ha sido poco difundida y sus estudios se localizan en los Estados Unidos y la India. Este proceso comenzó a partir de suspensiones celulares (Lu y Vasil, 1981a; Lu, Vasil y Vasil, 1981; Heyser, 1984); no obstante, el manejo de la embriogénesis en suspensiones celulares es engorroso, ya que las gramíneas, a diferencia de otras plantas, necesitan de estadios intermedios de agregados celulares. La embriogénesis en medio sólido es más efectiva y se han obtenido buenos resultados en: *P. maximum* (Lu y Vasil, 1981b; Lu y Vasil, 1982), *P. mileaceum* (Heyser y Nabors, 1982), *P. miliare* Lamk (Rangan y Vasil, 1983), *Digitaria eriantha* (Watt, Mycock y Cressweil, 1989), *Bothriochloa* spp. (Netzinger, Taliaferro, Johnson y Mitchell, 1987), *Digitaria decumbens* (Cheng, 1985) y *Secale cereale* (Lu, Chandler y Vasil, 1984).

En la mayoría de los trabajos desarrollados con diferentes cultivares de *P. maximum*, no varía el número de cromosomas ni el fenotipo de las plantas regeneradas por embriogénesis (Lu y Vasil, 1981a; Lu y Vasil, 1981b; Lu y Vasil, 1982). Sin embargo, el examen de las células de los callos embriogénicos de las gramíneas muestra que, junto a la mayoritaria población de células con normal número de cromosomas, pueden aparecer no más de un 20 a 25% de aneuploides y poliploides que se originan de células con números alterados de ploidía del tejido original. Vasil (1986) considera que existe una posible ventaja de selección favorable a las células normales durante la embriogénesis y por ello las plantas regeneradas muestran un número normal de cromosomas.

Teniendo en cuenta el uso de la inducción de variabilidad genética por agentes físicos y

químicos, la alta estabilidad genética que ofrece la embriogénesis en este género de pasto, pasaría de hecho a un segundo plano.

La literatura especializada informa la obtención de mutantes con el uso de las radiaciones ionizantes en diferentes cultivos; sin embargo, la información disponible en los pastos tropicales es limitada. Solamente se conocen algunos trabajos en trigo (Gao, Liang y Cheng, 1988), arroz (Kúo, 1986; González, Padrón, Iglesias y Santana, 1993), *Pennisetum purpureum* cv. King grass, *Cynodon nlemfuensis* cv. Jamaicano y *Leucaena leucocephala* cv. Perú (Cruz, Herrera, Padrón, Martínez, Monzote, Tuero y García, 1991) y *Teramnus labialis* cv. Semilla Clara (Martín, G., datos inéditos).

El objetivo de este trabajo fue seleccionar el adecuado criterio de radiosensibilidad y las dosis útiles en callos embriogénicos de guinea cv. K-249, irradiados con una fuente de ^{60}Co .

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron callos embriogénicos formados de ápices caulinares de *P. maximum* cv. K-249, los que se irradiaron con dosis de 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300 y 400 Gy en una fuente de ^{60}Co (modelo MPx-J-25M, con tasa de dosis de 5 Gy/min). Se subcultivaron en un medio de crecimiento de callos embriogénicos compuesto por las sales nutritivas MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 30 g/l de sacarosa, 8 g/l de agar, 3 mg/l de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y 10% de agua de coco (CM) (Lajonchere, G., datos inéditos).

A las 13 semanas, cuando la mayoría de los callos alcanzaron su máximo desarrollo y crecimiento, se midió el incremento de masa fresca por la diferencia entre la masa inicial al ser subcultivados y la masa final al ser evaluados.

Cada callo se fraccionó entre 18 y 20 partes y se subcultivaron en medio de regeneración

(medio nutritivo MS) suplementado con 30 g/l de sacarosa, 8 g/l de agar, 0,3 mg/l de kinetina (Kin), 1 mg/l de ácido giberélico (AG3) y 1 mg/l de prolina (Lajonchere, G., datos inéditos). Con el fortalecimiento de los primeros plantines regenerados a los 28 días de subcultivos, estos callos fueron evaluados y se registró el número de brotes, plantines y total por callo y por gramo de callo.

Para el cálculo de las dosis útiles se realizó un ajuste de una función lineal a la zona de

radioinhibición de la medida tomada como criterio de radiosensibilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las medidas tomadas para estudiar la radiosensibilidad fueron afectadas por la acción de la energía ionizante y se describió en todos los casos una curva completa, como se muestra en las figuras 1, 2, 3, 4 y 5.

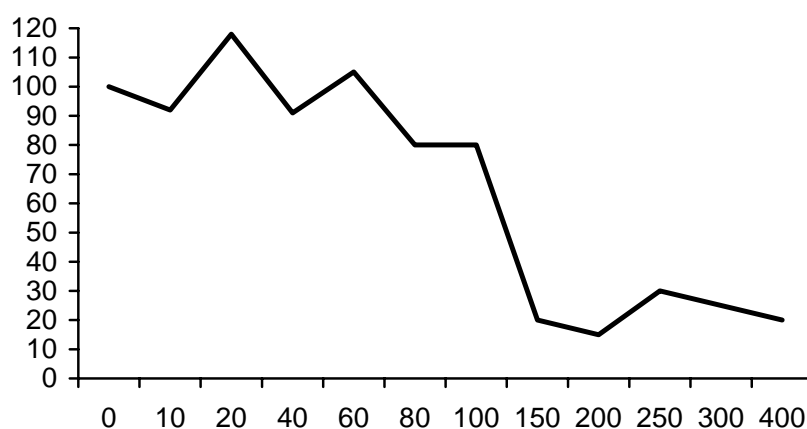


Fig. 1. Curva de radiosensibilidad del incremento de masa fresca de callos embriogénicos de *P. maximum* cv. K-249 irradiados con ^{60}Co .

Se puede observar que la medida incremento de masa fresca (fig. 1) fue menos radiosensible que el número de brotes, plantines y total por callo y por gramo de callo (figs. 2, 3, 4 y 5). Esta tendencia fue encontrada por Moustafa, Duncan y Widholm (1989) y por González *et al.* (1993), quienes detectaron mayor radiosensibilidad en la regeneración de plantas que en la formación y crecimiento de los callos. Los primeros autores, al medir el incremento de masa fresca de callos de maíz a los 21 días después de aplicar 7 dosis de rayos gamma, hallaron una mayor radiosensibilidad que la obtenida en el presente experimento. Se puede afirmar de estos resultados, la alta radiosensibilidad de los callos.

El hecho de hacer el corte evaluativo a las 13 semanas, posibilitó la recuperación del tejido y la compensación de las afectaciones causadas por las radiaciones, lo que puede explicar la menor radiosensibilidad del incremento de masa fresca. González *et al.* (1993) encontraron la dosis letal (LD) entre los 50 y 100 Gy para callos de arroz irradiados con rayos gamma; mientras que en este experimento, con dichas dosis solo se logró un GR no mayor de 20% sin ningún caso de necrosis. Ello sugiere que se debe hacer una secuencia de cortes evaluativos para determinar la edad de subcultivo que exprese mayor radiosensibilidad.

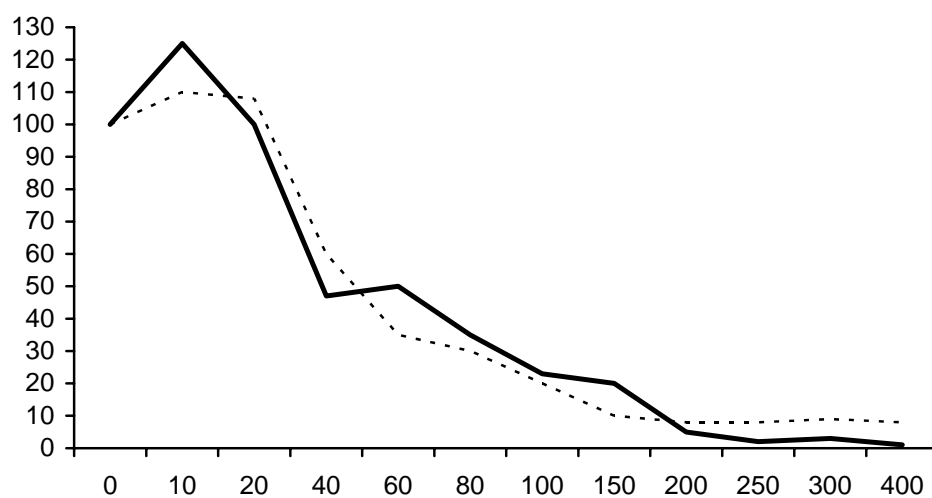


Fig. 2. Curva de radiosensibilidad de las medidas número de brotes y plantines por callo de *P. maximum* cv. K-249 irradiados con ^{60}Co .

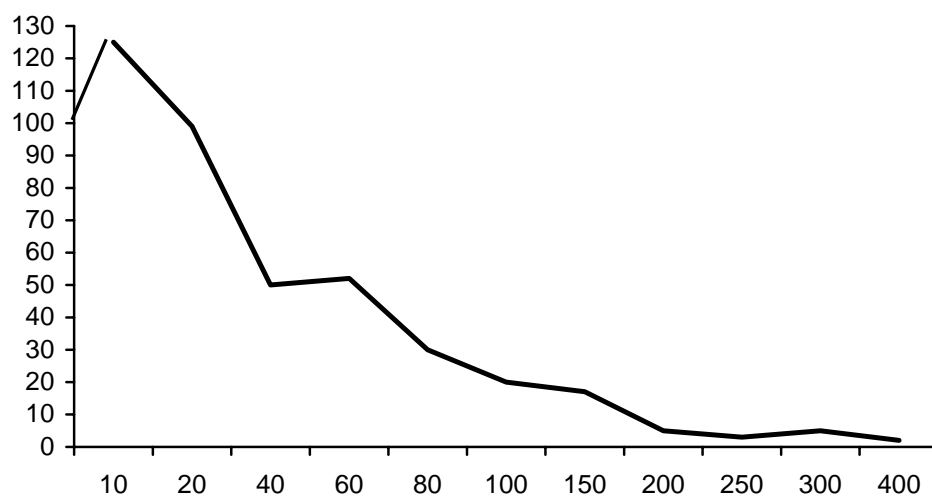


Fig. 3. Curva de radiosensibilidad de la medida número total de brotes y plantines por callo de *P. maximum* cv. K-249 irradiados con ^{60}Co .

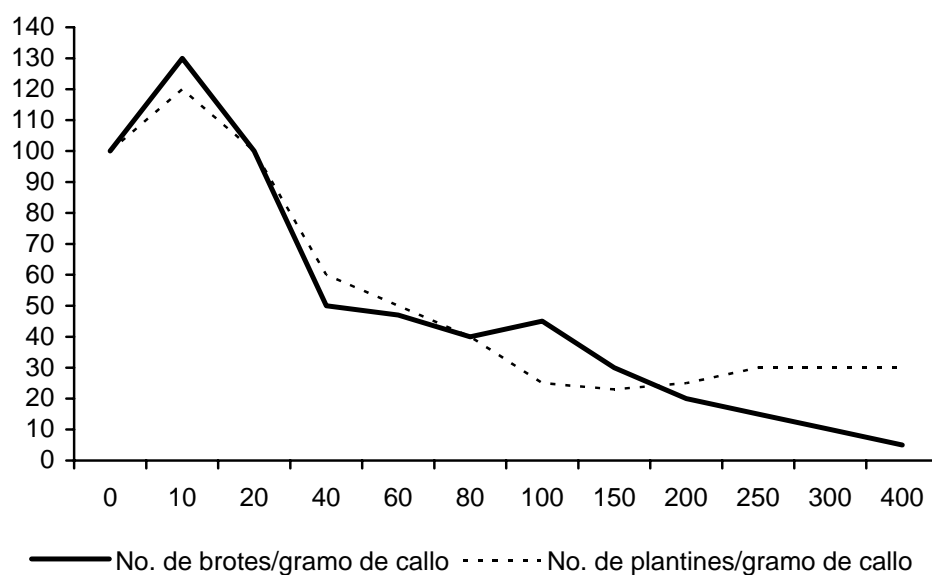


Fig. 4. Curva de radiosensibilidad de las medidas número de brotes y plantines por gramo de callo de *P. maximum* cv. K-249 irradiados con ^{60}Co .

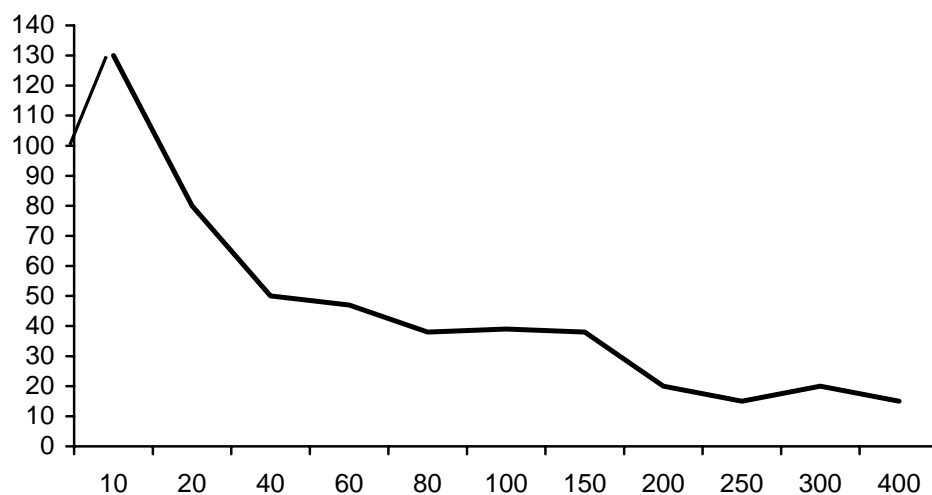


Fig. 5. Curva de radiosensibilidad de las medidas número total de brotes y plantines por gramo de callo de *P. maximum* cv. K-249 irradiados con ^{60}Co .

Por otra parte, no se puede subestimar las diferencias genéticas de los tejidos vegetales con que se trabaja, ya que incluso la respuesta radiactiva entre cultivares de una misma

especie puede ser muy diferente, como la encontrada por Novak, Afza, Duren y Ornar (1990) en cultivo *in vitro* de ápices caulinares de 7 clones de *Musa*, donde las dosis que

determinaron un GR 50% variaron desde menos de 15 Gy hasta más de 30 Gy. Cruz *et al.* (1991) también hallaron diferencias en cuanto a la radiactividad en la germinación de semillas agámicas de leucaena y king grass.

Las figuras 2, 3, 4 y 5 muestran similitud en las curvas y se encontró igual respuesta cuando se contabilizó el número de brotes, plantines y total tanto por callo como por gramo de callo, aunque esta última medida permite la comparación en igualdad de condiciones con otros experimentos.

El criterio de radiosensibilidad tomado de estos indicadores fue el número total de brotes y plantines por gramo de callo, teniendo en cuenta su sencillez y veracidad al realizar las mediciones, ya que evita la introducción de errores al clasificar un brote o plantín según su estado de desarrollo fisiológico, además de tener en cuenta que la regeneración de plantas es el paso fundamental para el mejoramiento genético por radiomutaciones a partir del cultivo de tejidos.

El ajuste de los valores experimentales en la zona de radioinhibición a una función lineal en la medida tomada como criterio de radiosensibilidad, no explica la mayor parte de los valores que definen la curva experimental; esto se debe a que la zona de radioinhibición fue definida solo por 7 puntos, por lo que el peso de los valores de las dosis más altas influyó sobre el de las dosis más bajas. Esto determinó un coeficiente de regresión (b) igual a -0,16 y un término independiente (a) de 56,65, de lo cual se infiere la imposibilidad de seleccionar GR 10 y 20% usando este tipo de correlación-regresión.

Una tendencia similar se observó también al realizar ajustes en la zona de radioinhibición del resto de las variables calculadas en el experimento.

Con el objetivo de dar solución a la determinación de las dosis útiles (10, 20, 50 y 70%), se recurrió a su cálculo aproximado teniendo en cuenta el criterio de

radiosensibilidad; estas fueron de 16, 20, 29 y 160 Gy respectivamente.

Los brotes y plantines albinos no fueron afectados por las radiaciones (fig. 6) y mostraron una distribución aleatoria de los valores. Estos aparecieron en sectores de callos bien delimitados, que se diferenciaron de los sectores normales que originaron plantas verdes. Es de interés el hallazgo de albinismo en el tratamiento testigo (0 Gy), ya que indicó que en este cultivar de guinea la estabilidad genética de la embriogénesis pudo ser baja o el medio de cultivo ideado indujo el albinismo.

Se sugiere realizar otros estudios en los que se debe disminuir los intervalos de dosis para contar con más valores en la zona de radioinhibición, así como determinar si el medio de regeneración influye en la presencia de plantas albinas.

REFERENCIAS

- BAJAJ, Y.P.S.; SIDHU, B.S. & DUBEY, V.K. 1981. Regeneration of genetically diverse plants from tissue cultures of forage grass *Panicum* sp. **Euphytica**. 30:135
- CHENG, Y.K. 1985. Callus induction and plant regeneration from inflorescence segments of pangola grass. Proc. XV Int. Grassl. Cong., Kyoto.p. 313
- CRUZ, R.; HERRERA, R.S.; PADRÓN, E.; MARTÍNEZ, R.O.; MONZOTE, MARTA; TUERO, R. & GARCÍA, M. 1991. Efecto de las radiaciones gamma en los pastos *Pennisetum purpureum* cv. King grass, *Cynodon nlemfuensis* cv. Jamaicano y *Leucaena leucocephala* cv. Perú. **Rev. cubana Cienc. agric.** 25:305
- GAO, M.W.; LIANG, Z.Q. & CHENG, Z.Y. 1988. Effects of gamma radiation on immature wheat embryo culture. In: Semi dwarf cereal mutants and their use in cross breeding. III IAEA TECDOC 4555. IAEA. Viena. p. 177

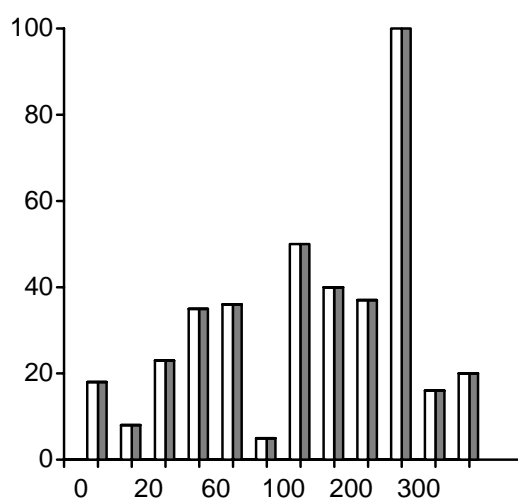


Fig. 6. Por ciento de brotes y plantines albinos regenerados de callos embriogénicos de guinea cv. K-249 irradiados ^{60}Co .

- GONZÁLEZ, MARÍA C.; PADRÓN, E.; IGLESIAS, LOURDES & SANTANA, NANCY. 1993. Radiosensibilidad *in vitro* de la variedad de arroz Amistad-82. **Cultivos Tropicales**, 14(1): 64
- HEYSER, J.W. 1984. Callus and shoot regeneration from protoplasts of Proso Millet (*Panicum miliaceum* L.). **Z. Pflanzenphysiol.** 113:293
- HEYSER, J.W. & NABORS, M.W. 1982. Regeneration of Proso Millet from embryogenic calli derived from various plant parts. **Crop Science**. 22:1070
- KUO, D. 1986. Induction of useful mutations by gamma irradiation of anther culture in rice. **Mutation Breeding Newsletter**. (Viena). 27: (8)
- LU, C.; CHANDLER, S.F. & VASIL, I.K. 1984. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cultured immature embryos of Rye (*Secale cereale* L.). **J. Plant Physiol.** 115:237
- LU, C. & VASIL, I.K. 1981a. Somatic embryogenesis and plant regeneration from freely-suspended cells and cell groups of *Panicum maximum* Jacq. **Ann. Bot** 48:543
- LU, C. & VASIL, I.K. 1981b. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissue of *Panicum maximum* Jacq. **Theoretical and Applied Genetics**. 59:275
- LU, C. & VASIL, I.K. 1982. Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of *Panicum maximum* Jacq. **Amer. J. Bot.** 69:77
- LU, C.; VASIL, V. & VASIL, I.K. 1981. Isolation and culture of protoplasts of *Panicum maximum* Jacq. (Guinea grass): Somatic embryogenesis and plantlet formation. **Z. Pflanzenphysiol.** 104:311
- MOUSTAFA, R.A.K.; DUNCAN, D.R. & WIDHOLM, J.M. 1989. The effect of gamma radiation and N-ethyl-N-nitrosourea on cultured maize callus growth and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 17:121
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F.T. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiol Plant**. 15:173
- NETZINGER, D.; TALIAFERRO, C.M.; JOHNSON, B.B. & MITCHELL, E.D. 1987. *In vitro* regeneration of apomictic bluestem grasses. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 10:31
- NOVAK, F.J.; AFZA, R.; DUREN, M. VAN & OMAR, M.S. 1990. Mutation induction by gamma irradiation of *in vitro* cultured shoot-tips of banana and plantain (*Musa* cvs.). **Trop. Agric. (Trinidad)**. 67:21

- PÉREZ PONCE, J. & AGRAMONTE, D. 1992. Fundamentos teórico-prácticos del cultivo *in vitro*. En: Conferencias Primer Curso FAO-Francia-Cuba sobre Técnicas Modernas de Mejoramiento y Multiplicación de Especies Agámicas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de Las Villas, Cuba
- RANGAN, T.S. & VASIL, I.K. 1983. Somitic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of *Panicum miliaceum* L. and *Panicum miliare* Lamk. **Z. Pflanzenphysiol.** 109:49
- RODRÍGUEZ, S. 1992. Fitomejoramiento en especies de reproducción agámica. En: Conferencias Primer Curso FAO-Francia-Cuba sobre Técnicas Modernas de Mejoramiento y Multiplicación de Especies Agámicas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de Las Villas, Cuba
- SCOWCROFT, W.R. & LARKIN, P.J. 1982. Somaclonal variation: a new option for plant improvement. In: Plant improvement and somatic cell genetics. (Eds. I.K. Vasil, W.J.L. Scowcroft and K.J. Frey). Academic Press, New York. p. 159
- VASIL, I.K. 1986. Relative genetic stability of embryogenic cultures of the gramineae and uniformity of regenerated plants. In: Somaclonal variations and crop improvement (Ed. Jean Semal). Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. p. 108
- WATT, PAULA; MYCOCK, D.J. & CRESSWELL, C.F. 1989. Plant regeneration by somatic embryogenesis from leaf explants of *Digitaria eriantha* (Steud) Subsp. Eriantha. Proc. XVI Int Grassl. Cong. Nice. p. 421

Recibido el 20 de octubre de 1994