

Efecto de las radiaciones gamma sobre callos de papa var. 'Desirée'

Novisel Veitía*, Lourdes R. García, Idalmis Bermúdez-Carabaloso, Pedro Orellana, Yenny Padrón, Damaris Torres * Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: novisel@ibp.co.cu

RESUMEN

La presente investigación se desarrolló con el objetivo de determinar el efecto de las radiaciones gamma sobre callos de papa variedad 'Desirée' para inducirles variabilidad. Se irradiaron callos que habían sido obtenidos a partir de hojas de plantas de papa cultivadas *in vitro*, a los cuales se les aplicaron dosis de 5, 10, 15, 20 y 30 Gy de radiaciones gamma. Se evaluó la masa fresca de los callos, el número de callos vivos por cada dosis de radiación aplicada y el número de plantas regeneradas por callo. Se observó una disminución en la masa de los callos en la medida que aumentaron las dosis de radiaciones. La dosis de 10 Gy se seleccionó para los tratamientos masivos de callos de papa var. 'Desirée' con radiaciones gamma ya que esta fue más próxima a la DL_{50} y GR_{50} , con la cual se logró disminuir el crecimiento en 53.37 % y se alcanzó una regeneración del 71.25 %.

Palabras clave: mutagénesis *in vitro*, *Solanum tuberosum*, variabilidad

ABSTRACT

The present investigation was developed with the objective to determine the effect of gamma radiation on potato variety 'Desirée' calli to induce variability. Calli obtained from leaves of *in vitro* plants were irradiated with doses of 5, 10, 15, 20 and 30 Gy gamma radiations. Fresh weight of calli, survival of these for radiation dose and number of regenerated plants per callus was evaluated. A decrease in the weight of calli was observed when radiations doses were increased. The dose of 10 Gy was selected for the massive treatments of potato var. 'Desirée' calli with gamma radiations. These dose was closer to DL_{50} and GR_{50} , favoring to diminish the growth in 53.37% and to obtain a regeneration percentage of 71.25% .

Key words: *in vitro* mutagenesis, *Solanum tuberosum*, variability

INTRODUCCIÓN

La eficiencia de los métodos de cultivo *in vitro* de plantas ha facilitado el empleo de la radiomutagénesis para el mejoramiento genético tanto en semillas como en plantas propagadas vegetativamente (Alhoowalia, 2001). Conjuntamente han abierto el acceso a nuevas fuentes de variación como la conocida variación somaclonal, ya que los tejidos somáticos no intervienen en la reproducción y en este proceso son eliminados los mutantes no aptos para la fecundación y de esta forma opera como un filtro para la estabilidad de las especies de reproducción sexual (García, 2000).

En la literatura científica se refieren numerosas investigaciones en las cuales se emplea la mutagénesis *in vitro* en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) (Sonino y Ancora, 1986; Alhoowalia, 1990; Gosal *et al.*, 2001; van Enkevort *et al.*, 2001) y señalan la posibilidad de obtener alta frecuencia de mutaciones. La determinación de la radiosensibilidad de la variedad que se desea mejorar es un paso previo para posteriormente aplicar de forma masiva el

tratamiento mutagénico. Para el desarrollo del programa de mejoramiento genético de este cultivo, en el Instituto de Biotecnología de las Plantas, se requiere conocer el efecto de las radiaciones gamma sobre la variedad 'Desirée'.

De acuerdo con lo anteriormente planteado se realizó el presente trabajo con el objetivo de determinar el efecto de diferentes dosis de radiaciones gamma sobre callos de papa var. 'Desirée' y la dosis letal para inducir variabilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon callos de papa variedad 'Desirée', los cuales se formaron a partir de hojas de plantas cultivadas *in vitro*, en el medio de cultivo semisólido propuesto por Freire-Seijo *et al.* (1994). Los mismos fueron tratados con las siguientes dosis de radiaciones gamma: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 Gy.

La irradiación del material vegetal se realizó con un equipo PX-Gamma 30 con una potencia de 33.26 Gy.min el cual se encuentra situado en el Centro de Estudios Aplicados al Desarrollo Nuclear de Ciudad de la Habana, Cuba (CEADEN).

Una vez aplicado el tratamiento, los callos fueron transferidos a medio de cultivo fresco para evitar cualquier toxicidad producida por la acción de las radiaciones sobre los componentes del medio de cultivo. Se emplearon 100 callos por tratamiento mutagénico y 100 del control sin irradiar y se colocaron en condiciones de oscuridad constante a $26 \pm 2^\circ\text{C}$.

Para la regeneración de las plantas a partir de los callos irradiados se utilizó el medio de cultivo propuesto por Freire-Seijo *et al.* (1994). Los frascos de cultivo se colocaron en condiciones de luz artificial con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (FFF) de $62 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y un fotoperíodo de 16 horas luz a $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

Las evaluaciones se realizaron a los 30 días después de aplicado el tratamiento mutagénico y se registró el número de callos que sobrevivieron por cada dosis de radiación aplicada así como la masa fresca (g).

Para determinar el efecto de las radiaciones se evaluó la masa fresca del callo y con dichos valores se calculó el índice medio (I_m), mediante la siguiente fórmula (Labrada, 1999):

$I_m = 100 (I_i / I_c)$ donde: I_i = valor de los tratamientos irradiados y I_c = valor del control

Como índice de comparación se tomó la GR_{50} y la DL_{50} (dosis letal media).

GR_{50} = Dosis que reduce el 50% del crecimiento.

DL_{50} = Dosis que reduce el 50% de la población.

Con los datos de supervivencia se determinó la DL_{50} y la GR_{50} se calculó a partir del índice medio, mediante una ecuación de regresión lineal. Para ello, se empleó

el paquete estadístico Curve Expert 1.3 sobre Windows

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como resultados se observó que todas las dosis de radiaciones aplicadas afectaron el crecimiento de los callos de papa var. 'Desirée' (Figura 1). Esta respuesta indicó la sensibilidad del cultivo de callos al tratamiento mutagénico teniendo en cuenta que este tiene un efecto fisiológico y citológico sobre las células (García, 2001).

Existe un limitado número de investigaciones que refieren que el cultivo de callos es más sensible a los tratamientos con radiaciones. Según Ahloowalia (2001) se requieren dosis mucho más bajas (2-5 Gy) en comparación con los esquejes y semillas.

Una respuesta sensible también fue descrita por Sonino y Ancora (1986) en las yemas que siguen al ápice en plantas de papa var. 'Desirée' cultivadas *in vitro*, las cuales mostraron los mayores porcentajes de mortalidad y los más bajos en la brotación y el enraizamiento. En estudios realizados en otros cultivos como por ejemplo en *Musa* spp. las células de origen adventicio fueron más sensibles que las de los brotes axilares (Afza *et al.*, 1994).

De las dosis de radiaciones estudiadas la más próxima a los valores de DL_{50} y GR_{50} (Figura 2 A y B) fue la de 10 Gy, la cual provocó valores de supervivencia de un 53% y una disminución del crecimiento de los callos de un 53.37%. Según Pérez (1998) cuando se emplea el cultivo *in vitro* se recomienda que los tratamientos mutagénicos reduzcan de un 40-60% de la masa de los materiales vegetales tratados.

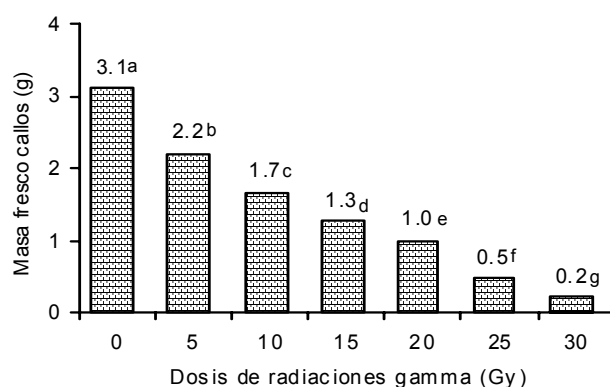


Figura 1. Efecto de diferentes dosis de radiaciones gamma sobre la masa fresca de callos de papa var. 'Desirée'.

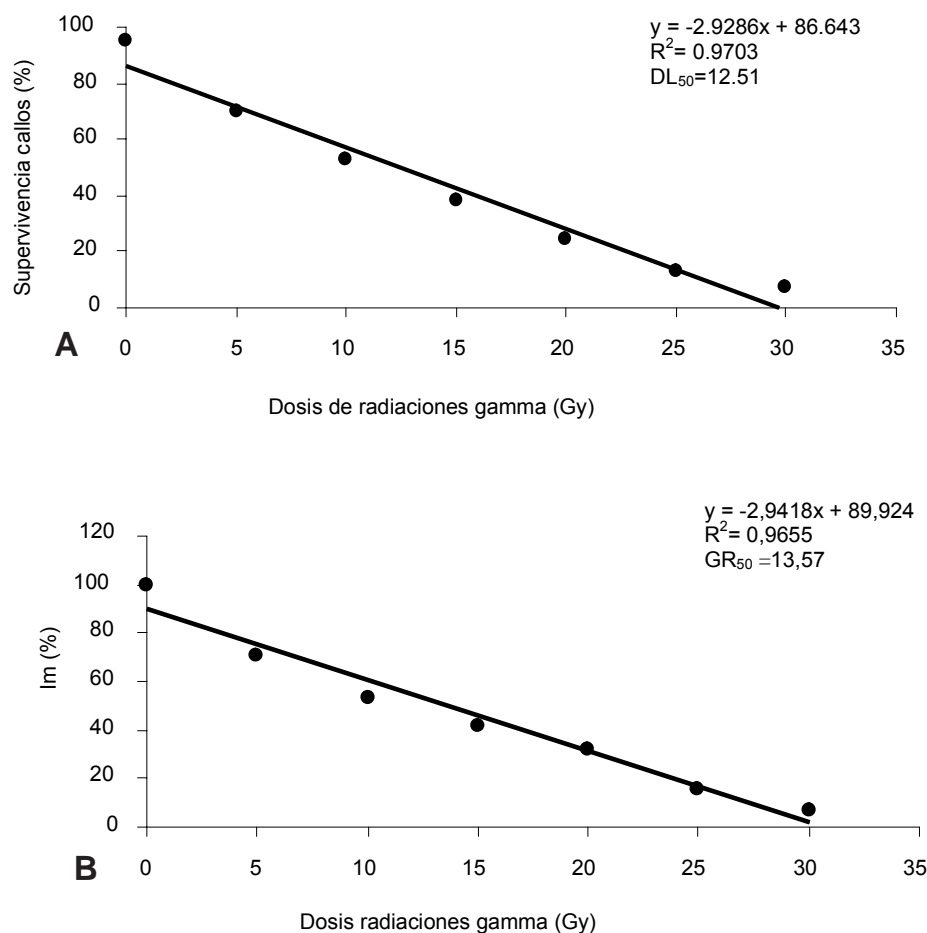


Figura 2. Dosis letal media (DL_{50}) (A) y disminución media del crecimiento (GR_{50}) en callos de papa var. 'Desirée' tratados con diferentes dosis de radiaciones gamma (B) (Im) (índice medio).

En la literatura científica se ha recomendado utilizar dosis bajas de radiaciones en callos de papa. Por ejemplo, Urrea (2000) refirió la utilizar un rango de dosis entre 12.5 y 17 Gy en callos de papa var. Diacol capiro. Sin embargo, en tres países: India, Pakistán y Egipto utilizaron la dosis de 20 Gy para la irradiación de plantas micropropagadas de papa tetraploide mientras que, en Holanda sugieren dosis de 6-8 Gy con rayos X para tratar material vegetal monoploide. Existen factores como el cultivar, las condiciones fisiológicas de las plantas u órganos a irradiar así como la manipulación del material vegetal antes y después de la irradiación que influyen sobre la radiosensibilidad (Predieri, 2001).

El porcentaje de regeneración de las plantas disminuyó con el incremento de la dosis de radiaciones gamma y todos los tratamientos mostraron diferencias significativas respecto al control sin irradiar (Tabla 1). Con la dosis de 10 Gy, la cual fue la más próxima a los valores de DL_{50} y GR_{50} se logró un 71.25% de regeneración difiriendo significativamente con las restantes dosis, las cuales presentan valores por debajo del 50 %.

Roest y Bokelman (1980) irradiaron hojas, raquis y peciolo de plantas de papa var. 'Desirée' cultivadas *in vitro* con diferentes dosis de rayos X y concluyeron que la irradiación afectó considerablemente la capacidad regenerativa de los explantes y las dosis más altas la inhibieron. Urrea (2000), también describió una mayor inhibición en la regeneración de callos de papa variedad 'Diacol capiro' en la medida que se incrementaron las dosis de radiaciones. Esta disminución en la regeneración de plantas con diferentes dosis de tratamiento mutagénico también ha sido referida en otros cultivos como por ejemplo en ajo (*Allium sativum* L.) (Zhen, 2001), boniato (*Ipomoea batata*) (Zhen, 2001a) y caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) (Valdés, 2005).

Teniendo en cuenta los resultados se seleccionó la dosis de 10 Gy para los tratamientos masivos de callos de papa var. 'Desirée' con radiaciones gamma ya que esta fue la dosis más próxima a la DL_{50} y GR_{50} , con la cual se logró disminuir el crecimiento en 53.37% y un porcentaje de regeneración de 71.25%.

Tabla 1. Efecto de diferentes dosis de radiaciones gamma sobre la regeneración de plantas a partir de callos de papa var. 'Desirée'.

Dosis de radiaciones (Gy)	Porcentaje de callos con regeneración de plantas \pm E.E
5	83.75 \pm 3.23 b
10	71.25 \pm 2.67 c
15	41.25 \pm 4.51 d
20	32.50 \pm 3.14 d
25	18.75 \pm 3.02 e
30	8.75 \pm 3.23 e
Control	97.50 \pm 3.23 a

Medias con letras desiguales difieren para $p \leq .05$ según Dunnett' C.

Estos estudios permiten la utilización de las radiaciones para inducir variabilidad como parte del programa de mejoramiento genético en el cultivo de la papa en la búsqueda de plantas resistentes al tizón temprano, teniendo en cuenta que en este cultivo se han mejorado diferentes caracteres agronómicos y la resistencia a enfermedades con el empleo de la mutagénesis *in vitro* (Martínez y Mantell, 1994; Cassells y Kowalski, 1998; Urrea, 2000).

CONCLUSIONES

Se demostró la respuesta sensible de los callos de papa var. 'Desirée' tratados con diferentes dosis de radiaciones gamma y se seleccionó la dosis de 10 Gy para inducir variabilidad a partir de callos de papa var. 'Desirée' ya que provocó una disminución del crecimiento del 53.37% y un porcentaje de regeneración de plantas de 71.25%.

REFERENCIAS

Afza R, Roux N, Brunner M, van Duren M, Morpurgo R (1994) *In vitro* mutation techniques for *Musa*. En: Dr. Jones (Ed.). The Improvement and testing of *Musa*: a Global Partnership. Proceedings of the First Global Conference of international *Musa* Testing Program held at FHIA, Honduras 27-30 abril. pp. 207-221. INIBAP.

Ahloowalia, BS (1990) *In vitro* radiation induced mutagenesis in potato. The impact of biotechnology in agriculture, pp: 39-46. Kluwer Academics Publisher. Dordrecht.

Ahloowalia, BS (2001) *In vitro* techniques for selection of radiation induced mutations adapted to adverse environmental conditions. Proceeding of final Research Co-ordination Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and agriculture and held in Shanghai, China.

Cassells, AC, Kowalski B (1998) Strategies for the evaluation of variation as source of resistance to early blight and late blight of potato. Comprehensive potato technology, pp. 49-64. Malhotra Publishing House, New Delhi

Freire-Seijo, M, García R, Reyes M (1994) Formación, multiplicación y regeneración de plantas a partir de callos de papa *Solanum tuberosum* var. 'Desirée'. Centro Agrícola

3: 66-72.

García LR (2000) Selección *in vitro* a estrés biótico y abiótico. Curso en aplicaciones de la Biotecnología en la mejora genética de plantas y en la producción de semillas. Monografía. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Programa Nacional de Producción de Semillas, La Paz.

García, LR (2001) Empleo de yemas adventicias y radiaciones gamma (^{60}Co) en la inducción de variabilidad en banano (*Musa* sp.) cv. Gran enano (AAA). Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Agrícola. UCLV. Santa Clara.

Gosal, SS, Gomal J, Minocha JL, Chopra HR, Dhaliwal HS (2001) *In vitro* induction of variability through radiation for late blight resistance and heat tolerance in potato. Proceeding of final Research Co-ordination Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and agriculture and held in Shanghai, China.

Labrada, MP (1999) Selección *in vitro* en condiciones salinas de líneas de arroz obtenidas a través del uso combinado de técnicas biotecnológicas y nucleares. Tesis optar por el Grado Académico de Maestro en Ciencias en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de Las Plantas. Santa Clara.

Martínez, PR, Mantell S (1994) Selección *in vitro* de resistencia al tizón temprano (*Alternaria solani* Sor.) en papa criolla (*Solanum phureja* Junz). Fitopatología Colombiana 18(2): 90-100

Pérez, JP (1998) Mutagénesis *in vitro*. En: JN Pérez (Ed.) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología, pp. 299-311. IBP. Santa Clara

Predieri, S (2001) Mutation induction and tissue culture in improving fruits. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (64): 185-210

Roest S, Bokelman GS (1980) *In vitro* adventitious bud techniques for vegetative propagation and mutation breeding of potato (*Solanum tuberosum* L). Potato research 23: 167-181

Sonino, A, Ancora G, Locardi C (1986) *In vitro* mutation breeding in potato. Nuclear techniques and *in vitro* culture for plant improvement, pp. 385-394 International Atomic Energy. Vienna

Urrea A (2000) Efecto de *Phytophthora infestans* (Mont de Bary) y sus metabolitos en la selección *in vitro* de somaclones de papa (*Solanum tuberosum* L.) var. Diacol Capiro obtenidos por mutagénesis *in vitro* y variación somaclonal. Tesis de Dr.C. Universidad Central 'Marta Abreu'

de Las Villas. Santa Clara.

Váldez A, Orellana P, Veitía N, Torres D (2004) Crecimiento, regeneración y radiosensibilidad de callos de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido var. 'SP 70-1284') tratados con radiaciones gamma fuente de ^{60}Co . Biotecnología Vegetal 4(3): 165-169

Van Enckvort, L J G, Hoogkamp T J H, Bergervoet J E M, Visser R G F, Jacobsen E (2001) Induction of recessive mutation in potato using tissue culture techniques. Proceeding of final Research Co-ordination Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and agriculture and held in

Shanghai, China.

Zhen, H R (2001) *In vitro* techniques for selection of radiation induced mutants of garlic. Proceeding of final Research Co-ordination Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and agriculture and held in Shanghai, China.

Zhen, H R (2001a) Radiation induced variation in potato for tolerance to salinity using tissue culture techniques. Proceeding of final Research Co-ordination Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and agriculture and held in Shanghai, China.