

## Crecimiento, regeneración y radiosensibilidad de callos de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido var. "SP 70-1284") tratados con radiación gamma fuente $^{60}\text{Co}$

Apolonio Valdez Balero<sup>1</sup>, Pedro A. Orellana Pérez<sup>2</sup>, Novisel Veitía Rodríguez<sup>2</sup> y Damaris Torres Rodríguez<sup>2</sup>.

\*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup> Colegio de Posgraduados, Campus Tabasco. México licpo@yahoo.com.my y apoloniovb@colpos.mx

<sup>2</sup> Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreus" de La Villas. Carretera a Camajuani Km 5 ½. Santa Clara, Villa Clara. Cuba

### RESUMEN

Callos en crecimiento de caña de azúcar de la variedad "SP 70-1284", fueron irradiados con una fuente de  $^{60}\text{Co}$ . Las dosis estudiadas fueron entre 10 y 80 Gy. Se evaluó la afectación de la radiación Gamma fuente  $^{60}\text{Co}$  en el crecimiento del callo y la regeneración de plantas. Los resultados indicaron que la dosis que disminuyó el crecimiento de callo en un valor por debajo del 50% fue la de 30 Gy, así mismo se encontró que la dosis que disminuyó la capacidad regenerativa del callo menor al 50% de la población fue la de 30 Gy. Los resultados mostraron que para esta variedad de caña de azúcar dosis superiores a 30 Gy de radiaciones Gamma comprometen el crecimiento y la posterior regeneración del callo. Se recomienda su aplicación para inducir variabilidad genética en la variedad de caña de azúcar "SP 70-1284", así como en programas de mejora genética por mutaciones, en variedades susceptibles a roya de la caña de azúcar (*Puccinia melanocephala* Syd) empleando callos en crecimiento.

Palabras clave: callo, híbrido, *in vitro*, mejoramiento, roya, *Saccharum* sp., variabilidad

### ABSTRACT

Calluses in growth of sugar cane, variety "SP 70-1284", were radiated with a source of  $^{60}\text{Co}$ . The studied doses were between 10 and 80 Gy. The affectation of the Gamma radiation source  $^{60}\text{Co}$  in the growth of the callus and the regeneration of plants was evaluated. The results indicated that the dose that diminished the growth of callus in a value under 50% was the one of 30 Gy, and also the dose that diminished the regenerative capacity of the callus below to the 50% of the population was the one of 30 Gy. The results showed that for this variety of sugar cane doses superior to 30Gy of Gamma radiations jeopardizes the growth and the later regeneration of the callus. Its application is recommended to induce genetic variability in the variety of sugar cane "SP 70-1284", as well as in programs of genetic improvement by mutations, in susceptible varieties of the sugar cane red blight (*Puccinia melanocephala* Syd) using calluses in growth.

Key words: callus, hybrid, *in vitro*, improvement, rust, *Saccharum* sp, variability

### INTRODUCCION

El sistema de mejoramiento genético de plantas convencional tiene algunas limitaciones por su base genética estrecha, así como la incompatibilidad entre individuos para llevar a cabo el cruzamiento (Lee, *et al.*, 2002). La hibridación convencional está basada en la inducción de la variabilidad a través de la recombinación sexual, para esto se requiere de una gran población para la selección de fenotipos los cuales deberán ser evaluados en varios ambientes, en varias localidades y años y, finalmente multiplicados y recomendados como nuevas variedades (Ahloowalia, 1998). Para incrementar la variabilidad se utilizan las mutaciones inducidas las cuales se apoyan en la teoría que los agentes mutagénicos producen cambios similares a las mutaciones naturales, en un tiempo relativamente corto y una mayor cantidad (Donini y Sonnio, 1998).

En el cultivo de la caña de azúcar una de las formas para inducir variabilidad es a través del uso combinado del cultivo de tejidos con la mutagénesis *in vitro*. La mutación inducida es capaz de cambiar uno o pocos caracteres sin alterar las demás características del cultivar deseado (Van Den Bula, 1991; Novak, 1991 y 1992; Phillips, 1994; Smith *et al.*, 1995; Mak *et al.*, 1995; Larkin, 1998; Van Harten, 1998). Sin embargo, la combinación de la radiación con los métodos de cultivo *in vitro* aceleraran los programas de mejoramiento genético e incrementaran la variabilidad, así como la eficiencia en la selección y la multiplicación rápida de nuevos genotipos (Maluszynsky *et al.*, 1995).

Predieri (2001) recomendó que el primer paso en tratamientos mutagénicos deberá ser la estimación de la dosis de aplicación más apropiada. Según el mismo autor los genotipos difieren en

radiosensibilidad aun para cultivares de la misma especie y el nivel de ploidía es un factor que también tiene una gran influencia.

En experimentos con radiaciones es esencial determinar la dosis letal media ( $DL_{50}$ ), evaluar una serie de dosis de radiaciones y comparar la supervivencia de los explantes cultivados con el control no irradiado. Los mutágenos deben ser usados a dosis de  $DL_{50}$ . La misma genera un amplio espectro de mutaciones inducidas y permite un tamaño razonable de la población para recuperar mutantes útiles (Donini y Sonnio, 1998).

El presente trabajo se propuso como objetivo estudiar diferentes dosis de radiación Gamma en callos organogénicos en crecimiento del cultivar híbrido de caña de azúcar 'SP 70-1284' susceptible a roya (*Puccinia melanocephala* Sydow) con el fin de determinar la dosis de radiación que este por de bajo del 50% en el crecimiento del callo y en la regeneración de plantas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el Instituto de Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas, en el Laboratorio de Mejora Genética. Para los experimentos se utilizaron explantes de campo de la variedad de caña de azúcar (*Saccharum spp.* híbrido "SP 70-1284"), los cuales fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 3% durante 15 minutos. Para la inducción de callo se empleó el medio de cultivo propuesto por Payan *et al.* (1977). En la multiplicación de callos se utilizó medio de cultivo recomendado por Heinz y Mee (1969). El tratamiento mutagénico fue aplicado a callos en el cuarto subcultivo. Las dosis que se estudiaron fueron: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 Gy y un control sin irradiar. Las dosis de radiación fueron aplicadas a 100 callos por tratamiento, incluyendo el control. Para la evaluación de la regeneración, los callos fueron transferidos al medio de cultivo propuesto por Payan *et al.* (1977) libre de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y colocados en cámara de crecimiento con luz solar.

### Efecto de las radiaciones sobre callos en crecimiento

La evaluación en la recuperación de los callos después de la aplicación del tratamiento mutagénico se realizó cada tercer día, en siete ocasiones posteriores a la irradiación, para ello se utilizó la escala de Santana (1982).

### Evaluación de la afectación de las radiaciones en la regeneración de plantas

Después de tres subcultivos los callos que se desarrollaron fueron transferidos al medio de cultivo de regeneración. A los 45 días se determinó el porcentaje de callos que regeneraron plantas, se tomó

como criterio para planta regenerada que cada brote tuviera definido al menos una hoja y brote apical.

Con los valores de regeneración de plantas para cada dosis, se obtuvo la curva dosis-efecto, que se ajustó a una recta mediante una ecuación de regresión, empleando el programa Curve Expert 1.3 sobre Windows 2000.

### Radiosensibilidad de callos tratados con diferentes dosis de radiaciones Gamma

Para ajustar la afectación de los callos según la escala de Santana (1982) con los resultados de las variables de porcentaje de crecimiento del callo y porcentaje de regeneración se determinó la dosis que redujo el 50 % el crecimiento del callo ( $GR_{50}$ ) y el 50 % de la población de plantas durante la regeneración ( $DL_{50}$ ).

Escala de Santana (1982):

Grado 1: Callo muerto

Grado 2: Callo vivo, pero sin crecimiento

Grado 3: Callo vivo y con pequeños puntos de crecimiento

Grado 4: Callo creciendo en el 50% de su volumen

Grado 5: Callo con crecimiento normal

Los datos obtenidos fueron analizados por el paquete estadístico SAS Versión 4.0 sobre Windows.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto de las radiaciones en la fase de crecimiento del callo

El crecimiento del callo fue afectado por el incremento de la dosis de radiación (Tabla 1). El mayor crecimiento del callo, aunque significativamente diferente con los callos no irradiados fue la dosis de 10 Gy. La tendencia del crecimiento de los callos se redujo a medida que aumentó la dosis de radiación hasta la dosis de 30 Gy. Entre 40 y 70 Gy la afectación se mantuvo muy similar y volvió a bajar drásticamente con la dosis de 80 Gy donde solo se logró un incremento en crecimiento de 1.37 lo cual equivale a callos con un crecimiento muy limitado, los cuales generalmente no regeneran. García (2002) mencionó que este comportamiento está relacionado con el efecto fisiológico y citológico que producen las irradiaciones en las células.

Se observó que a partir de 50 Gy los callos mostraron un bajo crecimiento, este en general fue muy pobre por lo que se puede considerar que a partir de esta dosis se compromete el desarrollo de callos para la variedad de caña de azúcar "SP 70-1284".

La dosis más cercana al 50% de disminución del crecimiento del callo, fue el valor de 2.48 de acuerdo con la escala de Santana (1982) la cual correspondió a la dosis de 30 Gy.

Así mismo se observó que los callos tardaron en recuperar su desarrollo normal tres semanas después del tratamiento mutagénico, si embargo el crecimiento se afectó por el incremento en la dosis.

Anbalagan *et al.* (2000) y Khan *et al.* (2002) irradiaron callos de caña de azúcar con dosis de 0, 10, 20, 30, 40 y 50 Gy y observaron que a medida que incrementaron las dosis de radiación el crecimiento del callo disminuyó.

Los resultados indicaron que para esta variedad de caña de azúcar dosis superiores a 30 Gy de radiaciones gamma comprometen el crecimiento del callo.

### Evaluación para la afectación de las radiaciones en la regeneración de plantas

Al igual que para la fase de crecimiento se obtuvo una respuesta en la regeneración de los callos en

dependencia de las dosis de radiación aplicada. En la figura 1 se observa disminución gradual en el porcentaje de regeneración con el aumento de la dosis de radiación hasta 40 Gy. A partir de esa dosis se produjo una drástica afectación en la capacidad regenerativa de los callos, llegando a ser inhibida a partir de la dosis de 70 Gy. Este comportamiento es explicado a partir de que los callos con limitación en su crecimiento son fuertemente afectados en su capacidad regenerativa. La curva de ajuste en base a la ecuación de regresión mostró una alta correlación negativa entre la regeneración de plantas y las dosis de radiaciones gamma aplicadas, como lo indicó el coeficiente de determinación  $R^2 = 0.9834$ . Los callos no irradiados (control), presentaron un 100% de regeneración con plantas de aspecto normal, mientras que los irradiados mostraron una disminución gradual de la regeneración y plantas de menor vigor a medida que la dosis de irradiación se hacía mayor.

Tabla 1. Efecto de la dosis de radiaciones gamma sobre callos en crecimiento de caña de azúcar variedad "SP 70-1284", expresados según la escala de Santana (1982).

Dosis (Gy)	Escala de Santana (1982)
0	4.94 a
10	3.86 b
20	3.28 c
30	2.48 d
40	2.14 e
50	2.08 e
60	2.04 e
70	1.96 e
80	1.37 f
E.E.	0.10

Medias con letras no comunes en una misma columna difieren por Tukey para  $p < 0.05$

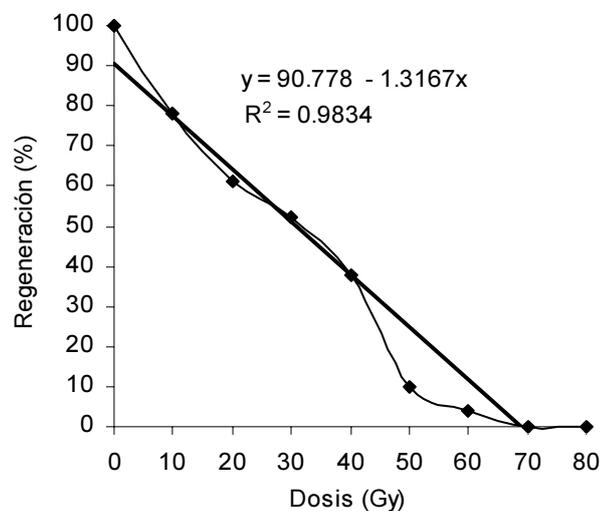


Figura 1. Regeneración de plantas a partir de callos de caña de azúcar var. "SP 70-1284" tratados con diferentes dosis de radiaciones gamma fuente  $^{60}\text{CO}$ .

Tabla 2. Crecimiento y mortalidad de callos de la variedad 'SP 70-1284' tratados con diferentes dosis de radiaciones Gamma fuente  $^{60}\text{Co}$ .

Dosis (Gy)	(%) Crecimiento	(%) Mortalidad
0	98.8 a	0.0 a
10	77.2 b	22.0 b
20	65.6 c	39.0 c
30	49.6 d	48.0 d
40	42.8 e	62.0 e
50	41.6 e	90.0 f
60	40.8 e	96.0 g
70	39.2 e	100.0 h
80	27.4 f	100.0 h
Error estándar	0.40	1.72

Medias con letras desiguales difieren por Dunett-C para  $p < 0.05$   $n=100$

Gahukar y Jambhale (2000) irradiaron callos de caña de azúcar y observaron que la regeneración de plantas disminuía severamente a partir de los 60 Gy.

#### **Radiosensibilidad de callos tratados con diferentes dosis de radiaciones gamma**

En la Tabla 2 se muestra el incremento en volumen del callo expresado en porcentaje respecto al control y el porcentaje de regeneración de los callos. Se observa que a las dosis de 20 y 40 Gy se obtuvo de un 40 a un 60% de disminución de crecimiento respecto al control. Pérez (1998) recomendó que para el mejoramiento genético por mutaciones *in vitro* los tratamientos mutagénicos deberán reducir entre un 40 y un 60% el crecimiento de los callos tratados, y recomendó este rango de dosis ya que con él se obtiene una adecuada frecuencia de mutaciones sin la aparición de mutaciones múltiples e indeseables.

Siddiqui y Javed (1989) irradiaron callos con dosis de 10-100 Gy en las variedades de caña de azúcar 'PR 1000', 'NCo 310', 'SL 4' y 'Co 547' observaron que los callos después de la irradiación, se vieron afectados en su crecimiento dependiendo de la dosis.

Anbalagan *et al.* (2000) y Khan *et al.* (2002) encontraron que el crecimiento del callo después de aplicado el tratamiento mutagénico, estos tardarán entre tres o cuatro semanas para recuperar su capacidad de desarrollo, a medida que se incrementan las dosis de irradiación se redujo el crecimiento de callo.

La dosis que provocó una disminución en el crecimiento de los callos más cercana al 50% fue la de 30 Gy, seleccionándose esta como la  $GR_{50}$ . En el caso de la regeneración, con la dosis de 30 Gy se obtuvo un porcentaje de regeneración de los callos de 48%, por lo cual se puede aceptar esta como la

$DL_{50}$ . Con la dosis de 50 Gy se obtuvo un porcentaje del crecimiento de los callos del 41.6% y en la regeneración de plantas se alcanzó una mortalidad muy elevada (90%), por lo que esta dosis se puede considerar como letal para la variedad de caña de azúcar "SP 70-1284".

Pérez (1998), demostró que dosis bajas de radiaciones en caña de azúcar, fueron más eficientes para el mejoramiento genético en caracteres de interés, mientras que dosis altas indujeron una mayor frecuencia de mutaciones múltiples que no presentaron interés para la mejora.

#### **CONCLUSIONES**

Para la variedad de caña de azúcar "SP 70-1284" se recomienda la dosis de 30 Gy de radiaciones gamma fuente  $^{60}\text{Co}$  aplicada a callos en crecimiento, para continuar con los estudios de mutagénesis en esta variedad, ya que con ella se lograron los valores medios de afectación tanto para la fase de crecimiento como para la regeneración de los callos que permitirá producir y recuperar mutantes útiles para los programas de mejoramiento en esta especie. Con esta dosis se redujo al 49.6% el crecimiento del callo y 48% la regeneración. Se asume esta dosis como la  $GR_{50}$  y la  $DL_{50}$ , respectivamente para cada fase y se sugiere su empleo en programas de mejora genética por mutaciones en variedades de caña de azúcar susceptibles a la roya.

#### **AGRADECIMIENTOS**

ALA ANUIES-México. Por la beca otorgada para la realización de la estancia doctoral.

AL COLEGIO DE POSTGRADUADOS-CAMPUS TABASCO-México por las facilidades brindadas para la realización del doctorado.

## REFERENCIAS

- Ahloowalia BS (1998) *In vitro* techniques and mutagenesis for the improvement of vegetatively propagated plants, en: Jain MS Brar DS Ahloowalia BS(eds). Somaclonal variation and induced mutations crop improvement, pp 293-309. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Anbalagan, S, Kalamani A y Sakila M (2000) *In vitro* mutagénesis in *sugarcane*. Research on Crops. 1 (2) 141-144
- Donini P Sonnio A (1998) Induced Mutation in Plant Breeding. Current Status and Future Outlook. En Jain, SM. (Ed) Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement, pp 255-291. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht
- Gahukar SJ y Jambhale ND (2000) Callus induction and regeneration in *Saccharum* cultivars as influenced by mutagen treatments. Journal of Maharashtra Agricultural Universities. 25, (2) 219-220
- Heinz D y Mee G (1969) Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. Crop. Sci. 9: 346-348
- Khan, R, Katri A, Javed A, Siddiqui M, Kansada M, Dahar H y Khan A (2002) Performance of sugarcane somaclones under field conditions at NIA, Tando Jam. Pakistan Journal Botany. 24 (1): 65-71
- Larkin, PJ (1998) Induction En: Jain SM, Brar DS and Ahloowalia BS. (eds) Somaclonal Variation and Induced Mutations in crop Improvement, pp. 3-13. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Lee, IY, Lee IS y Pyo YL (2002) Variations in Sweetpotato Regenerates from Gamma-ray Irradiated Embryogenic Callus. Journal Plant of Biotechnology. 4 (4) 163-170
- Mak, C, Ho YW, Tan YP, Ibrahim R y Liew KW (1995) Mutation reduction by gamma irradiation in a triploid banana Pisang Berangan. Malaysian Jour. Sci. 16: 77-81
- Maluszynky, M, Ahloowalia BS y Sigurbjornsson B (1995) Application of *in vitro* mutation techniques for crop improvement. Euphytica 85: 303-315
- Novak FJ (1991) *In vitro* mutation system for crop improvement. in Plant mutation breeding for crop improvement. Vol. 2. IAEA, Vienna, Austria. 327-342 pp.
- Novak FJ (1992) *Musa* (Bananas and Plantains). in Biotechnology of perennial fruit crops. (F.A. Hammerschlag and R.E. Litz, eds). CAB. International. Wallingford, UK. 449-488 pp.
- Payán, F, Carmen O y Tarcon G (1977) Técnicas para la micropropagación de la caña de azúcar mediante el cultivo de tejidos y yemas axilares. Acta agronómica. (27) 43-49
- Pérez PJ (1998) Mutagenesis *in vitro*. En: Pérez JP (Ed) Propagación y Mejora Genética de las Plantas por Biotecnología, IBP. Santa Clara. 229-311 pp.
- Phillips RL, Kaepler SM y Olhoff P (1994) Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (91) 5222-5226
- Predieri S (2001) Mutation induction and tissue culture in improving fruits. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. pp. 64: 185-210. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Santana N (1982) Determinación de un medio adecuado para la obtención de callos en variedades de caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) *in vitro*. Rev. Cultivos Tropicales, 4 (3)
- Siddiqui SH y Javed M (1989) Mutation breeding in sugar-cane (*Saccharum* sp. Hybrid) by gamma irradiation of cuttings and tissue cultures. Induced mutations in vegetatively propagated plants II. Coimbatore, India
- Smith MK, Hamil SD y Langhon PW (1995) *In vitro* mutation breeding for the development of banana with resistance to Race 4, *Fusarium* wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense). in *In vitro* mutation breeding of bananas and plantains. IAEA-TECDOC- 800. 37-44 pp.
- Van Den Bulk, RW (1991) Application of cell and tissue culture and *in vitro* selection for disease resistance breeding –a review. Euphytica 56: 269-285
- Van Harten, AM (1998) Mutation Breeding: Theory and Practical Applications. Cambridge Univ. Press; Cambridge