

UTILIZACION DE LAS RADIACIONES EN EL MEJORAMIENTO GENETICO PARA LA TOLERANCIA A LA SALINIDAD EN CAÑA DE AZUCAR

P. Díaz, R. Gutiérrez, M.T. Cornide, O. Coto y H. Leonard

Dpto. de Biotecnología de las Plantas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apdo. Postal 6990, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 16 de julio de 1996.

RESUMEN. Se trataron callos (R2) de la caña de azúcar (*Saccharum sp.*) variedad C 8751 (susceptible a la salinidad), con radiaciones gamma (30 Gy). La población obtenida fue preseleccionada en medios con antibióticos. De las plantas regeneradas, se estudiaron tres variantes somaclonales tolerantes a la kanamicina y una a la estreptomycin. Las evaluaciones en medio salino se realizaron según el esquema de selección *in vitro*. Los resultados demostraron que dos de los genotipos preseleccionados en kanamicina muestran tolerancia a los niveles de 1,0 y 1,5 % de NaCl en condiciones *in vitro* para la altura, el número de tallos y el grado de enraizamiento. El análisis de la electroforesis de isoenzimas peroxidases corroboró que se trataban de variantes somaclonales. De la misma manera, se demostró que el uso combinado de las mutaciones y el esquema de selección *in vitro*, posibilita obtener un porcentaje mayor de variantes somaclonales tolerantes a este estrés a partir de las vitroplántulas regeneradas de los callos tratados.

ABSTRACT. Callus tissue of susceptible variety (C 8751) to salt stress was irradiated (30 Gy) and immediately selected for resistance to antibiotics. Two somaclonal varieties selected for kanamycin and one for streptomycin were screened for salt tolerance according to the *in vitro* selection methods. The kanamycin variants showed a higher performance in 1,0 and 1,5 % NaCl in contrast to the donor and streptomycin variant. Peroxidase patterns indicate differences between donor variety and somaclons. Likewise, it was proved that the combined use of mutations and the *in vitro* scheme allows the obtainment of a higher percentage of somaclonal variants tolerant to this stress from vitroplantlets regenerated in the treated callus.

INTRODUCCION

La salinidad de los suelos afecta la producción de alimentos a nivel mundial, fundamentalmente en los países del tercer mundo. Se estima que de 400 a 950 000 000 ha están dañadas por la salinidad.¹ Este fenómeno tiende a aumentar, ya que el 50% de los sistemas de riego en el mundo, presentan procesos de salinización secundarios.² Sólo en América del Sur, se observa que un 25 % de la agricultura de riego presenta problemas de salinización.³ Sin embargo, los problemas de sequía son aún mayores.

La Biotecnología ha sido ampliamente utilizada para acelerar los esquemas de mejora al posibilitar métodos de pre-selección tempranos y masivos. El uso combinado de la selección *in vitro* en medio salino con las mutaciones, puede incrementar la frecuencia de aparición de nuevos genotipos tolerantes a ese estrés.

La participación del genoma citoplasmático en la tolerancia al estrés salino, ha sido ampliamente estudiada,⁴⁻⁶ así como su susceptibilidad a la acción de numerosos antibióticos, como la kanamicina, estreptomycin y cloranfenicol.^{7,8}

Teniendo en cuenta estos antecedentes, los objetivos de este trabajo fueron evaluar con respecto a su tolerancia a la salinidad en condiciones *in vitro*, cuatro variantes somaclonales obtenidas por radiaciones gamma y preseleccionadas en presencia de altas concentraciones de antibióticos. Igualmente, tratar callos de una variedad susceptible con radiaciones gamma y seleccionar, mediante el método de selección *in vitro*, los individuos tolerantes a la salinidad.

MATERIALES Y METODOS

Evaluación en medio salino de las variantes somaclonales preseleccionadas en presencia de altas concentraciones de antibióticos

Los callos del acañado de azúcar (*Saccharum sp.*) variedad C 87-51 (susceptible a la salinidad) se obtuvieron a partir de *spindles* en el medio Heinz suplementado con 2,4 D (H⁺)⁹ modificado.¹⁰ Los cultivos se mantuvieron en la oscuridad a una temperatura aproximada de 23 °C.

Los callos del subcultivo R2, fueron tratados con radiaciones gamma (30Gy) y preseleccionados posteriormente, en medios con antibióticos [kanamicina (K) y estreptomycin (S)]. De la población de plantas regeneradas, se seleccionaron tres variantes de kanamicina y una de estreptomycin para su evaluación en medio salino, las cuales contaban con un alto coeficiente de propagación. La evaluación de la tolerancia a la salinidad se realizó según el esquema de selección *in vitro*¹¹ modificado.¹² En cada fase, se evaluó la altura (cm) y la cantidad de hijos. En la fase IV, se evaluó el enraizamiento mediante una escala cualitativa (1- Malo, 2- Regular, 3- Bueno, 4- Vigoroso).

Para corroborar la presencia de posibles variantes somaclonales, se realizaron electroforesis de isoenzimas peroxidases. Los extractos se obtuvieron de hojas de plantas de 3 meses de edad, plantadas en un suelo ferráltico rojo. Las electroforesis se realizaron en geles de poliacrilmidaal 8,5 %, en soporte vertical durante 4a5ha4 °C.^{13,14}

Tratamiento de callos de una variedad susceptible

Otra población de callos de la variedad C 87-51, igualmente tratada con radiaciones gamma (30Gr), se puso a diferenciar en medio Heinz (H) una parte directamente con 1,5 % de NaCl y la otra, se propagó en medio normal o control (sin NaCl) durante un mes. La evaluación en el medio salino se realizó por el método de selección *in vitro*¹¹ a la sal modificado¹² para los callos de caña de azúcar.

Tratamiento estadístico

Se realizó un análisis de varianza¹⁵ comparando las diferentes variantes y medios de cultivo, para cada fase y variable, de manera independiente. Las medias se compararon según la prueba de rangos múltiples de Duncan.¹⁶

RESULTADOS Y DISCUSION

Evaluación de las variantes somaclonales tolerantes a antibióticos

En la fase I (0; 0,5 y 1,0 % de NaCl) se observó una disminución significativa de la altura con el aumento de las concentraciones de sal. Los genotipos más afectados fueron C 87-51 (variedad donante susceptible) y el somaclón tratado con estreptomycin, S 61. En los dos niveles altos de sales (0,5 y 1,0 %) de la fase I, los genotipos que provenían de la evaluación en kanamicina mostraron los mejores resultados. De ellos, los más destacados fueron K 311 y K 331 (Tabla I).

En la fase II (0% de NaCl), no se encontraron diferencias significativas entre los individuos, lo cual se atribuyó a la no presencia del agente estresante.

En la fase III (0; 1,0 y 1,5 % de NaCl), se observó un daño más marcado. Los genotipos S 61 y K 1411 no crecieron en medios salinos. En estas condiciones, los genotipos K 331 y 311 alcanzaron los mayores valores de altura de los tallos.

El número de hijos en la primera fase mostró un ligero incremento en el medio con 0,5% de NaCl. Se experimentó una disminución en el medio con 1,0 % de esta sal. Esta tendencia se ha observado en otras investigaciones de la caña de azúcar en condiciones *in vitro*^{12,17} y se atribuye a una respuesta de supervivencia de la planta en niveles medios del agente estresante para garantizar su perpetuidad. Se pudo observar que la C 87-51, susceptible a la salinidad mostró la mayor cantidad de hijos. En el nivel superior los niveles del sal resultan letales para los genotipos susceptibles y mueren. Bajo estas condiciones, los somaclones K 331 y K 311 resultaron los más destacados.

En la fase II, se encontró un comportamiento no significativo en el número de hijos similar a los incrementos de altura debido a la ausencia del agente estresante.

En la fase III, se constató ausencia de crecimiento en algunos genotipos con el aumento de la concentración de sal. Nuevamente, los genotipos K 311 y K 331 fueron los más destacados al presentar el menor daño en el ahijamiento lateral.

Para los niveles altos de sales, los genotipos más destacados resultaron los mismos que para la altura y número de hijos. No obstante, el genotipo K 331 fue el único que logró enraizar en las condiciones salinas de la fase IV (0,35 % de una mezcla de sales : NaCl, Na₂SO₄ y MgCl₂; sales más tóxicas de la zona natural en estudio).

TABLA I
Resultados correspondientes a las evaluaciones de las variantes somaclonales en el esquema de selección *in vitro*

Fase	Nivel de sal (%)	Genotipos				
		C 8751	S 61	K 331	K 311	K 1411
Altura (cm)						
I	0*	6,0 a	5,2 b	5,6 ab	5,1 b	4,3 c
	0,5*	2,6 e	2,1 ef	3,5 d	3,8 d	3,1 d
	1,0*	0,8 g	0,9 g	2,1 ef	2,3 e	1,9 f
III	0*	5,9 a	5,3 ab	5,4 a	5,7 a	5,1 ab
	1,0*	1,3 e	0 f	2,1 c	2,0 c	0 f
	1,5*	0f	0f	1,8 cd	1,3 e	0f
Número de hijos						
I	0*	4,5 e	4,7 de	6,1 bc	4,3 e	4,9 d
	0,5*	11,3 a	5,8 c	7,3 b	5,4 cd	5,7 c
	1,0*	5,1 d	2,1 g	4,1 f	4,3 ef	1,3 gh
III	0*	6,0 a	4,7 b	6,3 a	4,7 b	4,6 bc
	1,0*	4,9 b	0 e	6,4 a	5,1 ab	0 e
	1,5*	0e	0e	2,3 d	2,0d	0e
Enraizamiento						
IV	0**	2,1a	1,8b	2,1a	2,1a	1,8b
	0,35**	1,2 d	0 e	1,8 b	1,3 b	0 e
	0,35**	0e	0e	1,2 d	0e	0e

* Medio salino suplementado con NaCl. ** Medio salino suplementado con una mezcla de NaCl, Na₂SO₄ y MgCl₂. Letras diferentes muestran diferencias significativas según la prueba de rangos múltiples de Duncan (p ≤ 0,05).

En este trabajo también se encontró que los genotipos más susceptibles no lograron enraizar en los niveles de sal estudiados (Tabla I).

El sistema radical resulta el órgano más afectado de la planta, pues es el que está en contacto directo con el ambiente salino. Los efectos letales más drásticos en condiciones naturales comienzan por esta zona. La salinidad, fundamentalmente en los altos niveles, influye de manera negativa en el enraizamiento de las vitroplántulas.¹²

El análisis de la electroforesis de las isoenzimas peroxidadas (Fig. 1) de las plantas provenientes de condiciones naturales normales, mostró que existen diferencias entre los somaclones y el donante. Los genotipos K 331 y K 311 mostraron patrones idénticos, por lo que se hace necesario buscar posibles diferencias en otros sistemas isoenzimáticos.

Este resultado evidencia la presencia de genotipos diferentes al donante C 87-51 en este nivel primario de caracterización.

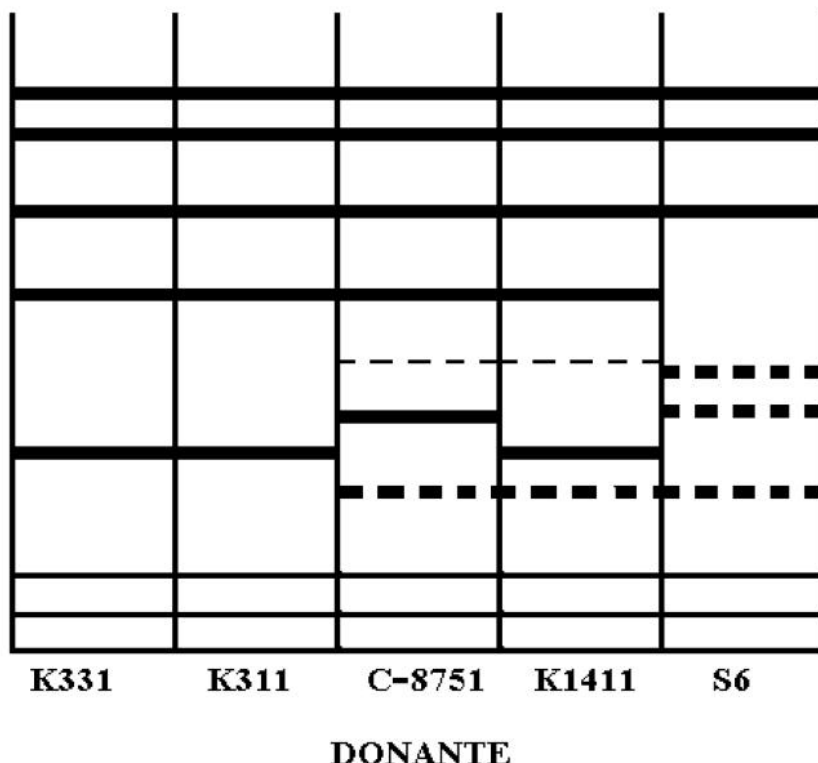


Fig. 1. Zimograma de las variantes somaclonales estudiadas y el donante susceptible C 8751.

Variantes somaclonales estudiadas:

S 61 (Tolerante a la estreptomycin); K 331; K 311; K 1411 (Tolerantes a la kanamicina).

Evaluación de plantas regeneradas de callos tratados

La regeneración de callos en medio salino fue muy inferior a la del control (Tabla II). La cantidad de plantas obtenidas por regeneración en medio normal fue disminuyendo gradualmente al irse evaluando a través del esquema de recurrencia *in vitro*. En el establecimiento de esta metodología para la caña de azúcar se observaron resultados similares.¹¹

TABLA II
Supervivencia de las plantas regeneradas de los callos tratados

Concentración de NaCl (%) en el medio de regeneración	01,	0
Total de callos plantados	200	200
Total de plantas regeneradas (A)	103	14
	0,9%	3
	1,5 %	23
Fases de la recurrencia	0%	23
	1,0%	19
	0,35 %	14
Supervivencia en suelo normal (B)	11	2
(A/B en %)	10,7	14,3

El número de individuos totales que lograron sobrevivir en la última fase (siembra en suelo normal) resultó superior en las plantas que regeneraron a partir de callos en medio suplementado con sal. A pesar de que el número de plantas que regeneraron en medio selectivo fue menor, sin embargo, la supervivencia al final del proceso de evaluación en los diferentes medios salinos favoreció a este último.

La irradiación de los callos y la recurrencia en medios con y sin el agente estresante aumenta la eficacia de los sistemas de selección *in vitro* al aumentar la variabilidad genética junto con la presión de selección.

CONCLUSIONES

El método de selección *in vitro* a la salinidad permitió evidenciar una respuesta diferencial en las variantes somaclonales estudiadas. Los genotipos K 331 y K 311 fueron los más destacados en la recurrencia en niveles medios y altos de sal (0,5 y 1,0 %). El K 1411 y S 61 mostraron el mismo comportamiento susceptible que el donante C 87-51 bajo altas concentraciones de sal. En la fase de enraizamiento (Fase IV), la variante K 331, proveniente de los dos tenores altos de sales, fue la que mejor comportamiento tuvo en la formación de raíces.

Los zimogramas de las isoenzimas peroxidadas muestran la presencia de genotipos diferentes para este sistema isoenzimático.

La supervivencia correspondiente al proceso de evaluación *in vitro* resultó superior en las plantas que regeneraron a partir de callos en medio suplementado con sal.

BIBLIOGRAFIA

1. Shannon M.C. Breeding, selection and the genetics of salt tolerance. In: Salinity tolerance in plants: Strategies for crop improvement. Edited by Richard C. Staples. John Wiley and Sons, Inc., 231-254, 1984.
2. Aidarov I. P., Golovanou S. I. y Mamaev H. G. El riego Ed. Mir. Moscú, 1985.
3. Anaya G. M. Problemas de erosión y desertificación en los suelos de América Latina . Resúmenes del IX Congreso Latino Americano y III Congreso Colombiano de la Ciencia del Suelo. Colombia. 130, 1985.
4. Winicov I. Gene expression in salt tolerant alfalfa cell cultures and the salt tolerant plants regenerated from tissue culture. In: Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. Edited by H.J.J. Nijkamp, L.H.W. Van der Plas and J. Van Aartrijk. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Press, 142, 1990.
5. Winicov I. and Seemann J.R. **Plant and Cell Physiology**, **31**, 1155, 1990.
6. Winicov I. Gene expression in relation to salt tolerance. In: Stress-induced gene expression in plants. Ed. Amarjit Singh Basra. Harwood Academic Publishers, 61, 1994.
7. Etzold T., Fritz C. C., Schell J. and Shereier P. H. A point mutation in the chloroplast 16S rRNA genes of a Streptomycin resistant *Nicotiana tabacum*. Elsevier Publishers, 219, 2, 343, 1987.
8. Moazed D. and Noller H.F. **Nature**, **327**, 389, 1987
9. Heniz D.J. and Mee G.W. **Crop. Science** **9**, May-June, 346, 1969.
10. Korneva S. and Maribona R. H. Influence of growth factors on callus growth and shoot regeneration. Proc. ISSCT XIII Cong., Cuba, 1983.
11. Korneva S and Maribona R.H. Selección *in vitro*. Memorias del Simposio Internacional de Cultivo de Células y Tejidos de Plantas. Checoslovaquia, 1984.
12. Díaz P. y Maribona R.H. Respuesta *in vitro* a la salinidad de un grupo de híbridos comerciales de la caña de azúcar. Resúmenes del XI Seminario Científico del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, 31 de octubre-3 de noviembre, Ciudad de La Habana, Cuba, 1990.
13. David B. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, **121**, 404, 1964.
14. Ornstein B. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **121**, 321, 1964.
15. Scheffe H. Analysis the Variance. John Wiley and Sons Inc., London, 1967.
16. Duncan D.R. **Biometrics**, **11**, 1, 1965.
17. Díaz P., Guía Y. y Cornide M.T. Evidencias de la tolerancia a la salinidad de la caña de azúcar *in vitro*. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, 1997 (sometido).