ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE RADIACIONES GAMMA Y MMS SOBRE LA PLÁNTULA DE SEMILLAS DE *TRITICALE* PRETRATADAS CON ÁCIDO ASCÓRBICO*

GUADALUPE PALOMINO HASBACH**

RESUMEN

A fin de probar el efecto protector del ácido ascórbico contra el daño fisiológico inducido por las radiaciones ionizantes, se trataron semillas de *Triticale hexaploide* L. (var. Bacum), con diferentes dosis de rayos gamma y de MMS. Las semillas fueron irradiadas en seco, o con pretratamiento de agua o ácido ascórbico.

La supervivencia no mostró variación entre los diferentes tratamientos. La velocidad de germinación no se afectó por las diferentes dosis de rayos gamma, disminuyendo en cambio con las concentraciones de MMS y en los lotes tratados con ácido ascórbico.

No se obtuvo efecto protector del ácido ascórbico en la altura de las plántulas tratadas con las radiaciones y el MMS, pero fue notable en la altura de los coleóptilos, particularmente en las altas dosis, a nivel de la elongación celular.

ABSTRACT

The protective effect of the ascorbic acid against the physiological damage induced by gamma irradiation and MMS in *Triticale caryopses* was tested: caryopses were irradiated in absence of water, with water or in an ascorbic acid solution.

No variation was detected in the survival following the different treatments. Germination speed was not affected by the different gamma irradiation doses. MMS concentrations and ascorbic acid were toxic.

* Trabajo aceptado para su publicación en abril de 1983.

** Jardín Botánico, U.N.A.M. 04510, México, D. F.

The protective effect of the ascorbic acid was not found on seedling growth of caryopses treated with gamma irradiation and MMS, however it was remarkably expressed on coleoptile growth specially in higher doses, at level of cell elongation.

INTRODUCCION

La inducción de mutaciones por medio de la aplicación de mutágenos físicos y químicos ha sido ampliamente estudiada para descubrir los mecanismos de acción de los mutágenos (Khalatkar y Bhatia, 1975) y con fines de fitomejoramiento (Kawai, 1969; Walther y Seibold, 1979) habiéndose obtenido resultados favorables en plantas de cultivo y ornamentales (Sigurbjornsson y Micke, 1974).

Una forma de incrementar la eficiencia mutagénica es el uso combinado de agentes físicos y químicos (Doll y Sandfer, 1969, Appa Rao y Jana, 1976) y la importancia del orden en que se den los tratamientos la han señalado Sharma (1970), Khalatkar y Bhatia (1975) y Hussein y Abdalla (1979), quienes reportaron que la irradiación en semillas de cebada y haba con rayos gamma o X seguida por tratamientos con EMS (etilmetano sulfonato) mostraba un efecto aditivo incrementando así la frecuencia de mutantes.

Una mayor efectividad mutagénica puede también obtenerse controlando el tiempo de prelavado antes de aplicar el mutágeno químico; Mikaelson (1969), Yamaguchi (1976), encuentran que cuando las semillas de cebada eran remojadas en agua durante 15 a 20 hs y posteriormente tratadas con EMS o DES (dietil sulfato), obtenían una mayor frecuencia de mutantes que cuando se aplicaba menor tiempo de prelavado, pues en este periodo se alcanzaba la etapa de síntesis (S) del ADN; donde era mayor la sensibilidad del material genético al mutágeno.

La eficiencia mutagénica es considerablemente limitada por el daño fisiológico sufrido por el material biológico sometido a radiaciones, por lo que es importante el uso de radioprotectores que lo disminuyen (Biswas y Matsuo, 1966, Conger, 1973, Radpath y Wilson, 1973).

Estas sustancias se aplican antes o en el momento de la irradiación, en general son agentes reductores cuyo mecanismo usual puede ser a través de su acción directa con moléculas que han sido blanco de las radiaciones como lípidos (Toppel, 1972), las bases púricas y pirimidicas (Schmidt y Borg, 1976), o con enzimas (Gorelik, *et. al.*, 1977) o mediante su efecto indirecto que produce radicales libres peroxido, como resultado de interaccionar con las moléculas de agua intracelular, que atacan a otras biomoléculas, provocando daños irreversibles (Lehninger, 1975). Los radicales libres son fuertemente oxidantes. Existen una serie de compuestos químicos que tienen una función antioxidante como el ácido ascórbico, probada por Radpath y Wilson (1973), cuya acción radioprotectora ha sido demostrada por Pitillo (1967), en *Escherichia coli* aún usando sensibilizantes. En plantas superiores Conger (1973 y 1975), prueba su efecto protector en cebada, sin embargo esta protección sólo se hacía aparente cuando la sustancia se aplicaba como pretratamiento de 18 hs y a 0°C.

El objetivo de este trabajo fue conocer el efecto protector del ácido ascórbico en semillas de *Triticale*, sometidas a radiaciones ionizantes (radiaciones gamma) y al mutágeno químico metilmerano sulfonato (MMS), a través de los parámetros: supervivencia, velocidad de germinación y longitud del coleóptilo y plántula al término de su crecimiento, bajo condiciones controladas en laboratorio.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron semillas de *Triticale hexaploide* L. var. Bacum con un contenido de humedad de 7% medido por el método por Destilación con tolueno (Zeleny, 1969).

Se utilizó el ácido ascórbico (Merck) como sustancia radioprotectora y el agente alquilante metilmetano sulfonato (MMS Merck) como agente mutagénico además de las radiaciones gamma del Co 60 aplicadas a partir de una fuente gamma cell 200 (Atomic Energy Canada Ltd) colocada en el centro de estudios nucleares de la UNAM. Lo dosimetría se efectuó por el método de termoluminiscencia con fluoruro de litio (Uribe y de la Piedad, 1976). La razón de dosis promedio calculada fue de 1 Kr/min.

El material se ordenó en tres grupos, el primero para ser irradiado en seco (grupo A) y los otros para ser sometidos a un pretratamiento durante una hora con agua (grupo B) y con ácido ascórbico (grupo C), a una concentración de 0.8 M; esta concentración se estableció previamente y fue la máxima no tóxica tolerada por el material biológico, ya que se ha demostrado que la acción protectora de esta sustancia está en función directa con la concentración utilizada (Conger, 1975).

De cada grupo se hicieron tres lotes de 100 semillas cada uno, el primero utilizado como testigo (0 Kr) y los otros dos irradiados con dosis de 10 y 20 Kr respectivamente (grupos I, II y III de la Tabla 1); efectuándose tres repeticiones en cada caso. Posteriormente se descontaminaron con hipoclorito de sodio a 4.5% con agitación constante durante 1 min, luego se lavaron en agua corriente durante 5 minutos para eliminar el exceso del fungicida, en seguida las semillas se colocan en tubos de ensayo que contenían 50 ml de agua desionizada y desmineralizada y se burbujearon con aire en baño María a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 17 horas para alcanzar de esta manera la etapa de síntesis (S) del ADN (Kaltsikes, 1971).

En seguida las semillas se pusieron en soluciones frescas de MMS a 0.0, 0.1 y 0.3% p/vol durante 1 hora a 20°C (casillas 1, 2 y 3 de la Tabla 1) y en burbujeo continuo, después se lavaron en agua por 5 minutos. Finalmente las semillas fueron sembradas en palanganas de polietileno de 25 x 33 cm de superficie y 13 cm de profundidad sobre una capa de algodón y papel filtro esterilizados humedecidos con 450 ml de agua, para mantener la humedad, las cajas se cubrieron con un armazón de bronce recubierto con polietileno transparente con 8 perforaciones de 1 cm de diámetro cada una. Las palanganas se colocaron en una cámara de germinación a temperatura controlada de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y en la obscuridad.

Para evaluar la interacción de los rayos gamma y el MMS, bajo las tres diferentes condiciones de tratamiento, se realizó un análisis factorial de $3 \times 3 \times 3$ dando lugar a 27 tratamientos cada uno se repitió 3 veces, realizándose 100 observaciones en cada caso siguiendo un diseño factorial completamente al azar. Todos los datos se computaron en el IIMASS utilizando el paquete SPSS (1974). Para la comparación múltiple de medias de los promedios de las longitudes de coleóptilos y plántulas, se empleó el método de Tukey (Méndez, 1976). Los valores de supervivencia se normalizaron usando la transformación a valores angulares (arco seno).

Los parámetros medidos para todos los casos, fueron: la supervivencia o germinación, la velocidad de germinación y la altura del coleóptilo y la plántula, al término de su crecimiento.

La supervivencia se estimó por el número de semillas germinadas al término del experimento (15 días a partir de la siembra).

TABLA 1. Media de tres repeticiones de la supervivencia, la velocidad de germinación, la longitud del coleóptilo y la plántula de semillas de *Triticale hexaploide* L. (var. *Bacum*) tratadas con radiación gamma, MMS y diferentes pretratamientos.

		A Tratamiento en seco			B Pretratamiento con una hora en agua			C Pretratamiento con una hora en ácido ascórbico		
MMS	%/p/v	1	2	3	1	2	3	1	2	3
RADIACION GAMMA (Kr)		0	0.1	0.3	0	0.1	0.3	0	0.1	0.3
	S	100	97	98	99	97	98	98	97	96
	I VG	4.84± .04	2.90± .02	0.89± 0.1	3.76± .03	2.57± .01	0.58± .01	2.39± .01	0.62± .02	0.29± .01
	C	4.13± .03	2.90± .05	2.64± .04	4.5 ±0.11	3.54± .06	2.73± .01	4.15± .06	4.12± .06	4.00± .03
	0 P	16.36±1.02	9.57±1.38	5.21±1.35	16.74±1.18	11.84±0.19	8.09±0.31	14.53±1.70	10.77±0.49	7.60±0.35
	S	99	97	98	96	97	96	98	97	96
	II VG	3.78± .04	2.77± .03	1.13± .02	3.35± .01	2.55± .02	1.15± .01	1.21± .01	0.80± .01	0.35± .01
	C	3.75± 0.3	2.94± .01	2.49± .07	3.92± .04	3.33± .07	2.76± .05	4.05± .04	4.12± .03	4.11± .04
	10 P	14.06± .94	8.93±0.91	5.66±1.29	13.89±0.95	10.14±0.87	8.12±0.31	14.52±0.31	11.37±0.07	7.26±0.67
	S	96	98	97	96	97	99	96	98	99
	III VG	3.23± .04	1.83± .02	0.80± .01	2.80± .03	2.07± .02	0.95± .01	1.17± .03	0.51± .02	0.25± .01
	C	2.58± .01	2.51± .05	2.42± .03	2.64± .01	2.68± .05	2.41± .03	2.80± .16	3.72± .04	3.87± .03
	20 P	9.53±0.60	6.8 ±0.71	3.39±0.20	8.38±0.73	8.33±0.68	5.53±0.64	10.04±1.20	8.91±2.41	5.44±0.33

S = Supervivencia
 VG = Velocidad de germinación
 C = Longitud del coleóptilo (mm)
 P = Longitud de la plántula (mm)

La velocidad de germinación fue determinada por el método descrito por Czabator (1962), iniciando las lecturas a las 26 horas después del sembrado de las semillas efectuándolas cada 2 horas durante las primeras 48 horas y después cada 12 horas hasta que la germinación concluía, el criterio adoptado fue de 3 lecturas iguales para los testigos y 6 para los tratados. Las alturas de los coleóptilos fueron medidas a las 168 horas y de las plántulas a las 360 después del sembrado, tiempo en que éstas estructuras detuvieron su crecimiento en el laboratorio.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados del experimento que se resumen en la Tabla 1, fueron analizados a través de un análisis de varianza factorial de $3 \times 3 \times 3$, indicado previamente y que se muestra en la Tabla 2, así como por la comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey (Tabla 3), a fin de determinar el efecto protector del ácido ascórbico.

Los valores de F obtenidos del análisis de varianza (Tabla 2) para la sobrevivencia (semillas germinadas), muestran que no hubo diferencia significativa entre los diferentes tratamientos (grupos A, B y C), en el laboratorio.

Cabe señalar que en un programa paralelo Rubluo *et. al.*, (en prensa), observaron una alta protección del ácido ascórbico en relación a la supervivencia de la generación M1 en el campo.

Palomino (1982), utilizando AET y L-cisteína, sustancias que actúan por mecanismos protectores similares al del ácido ascórbico, encontró protección a nivel de la supervivencia en semillas de cebada irradiadas con rayos gamma.

TABLA 2. Valores de F obtenidos en un análisis de la varianza factorial de $3 \times 3 \times 3$ con 3 repeticiones para un diseño completamente al azar para determinar el efecto del MMS, de las radiaciones gamma y pretratamientos con ácido ascórbico sobre la germinación o supervivencia, la velocidad de germinación, la longitud del coleóptilo y de la plántula, de semillas de *Triticale beta-ploide* L. (var. Bacum).

FUENTE DE VARIACION	gl	Velocidad de germinación	Germinación o supervivencia	Altura del coleóptilo	Altura de la plántula
Pretratamiento	2	11.118*	0.914	31.759*	2.049
MMS	2	15.520*	1.312	21.435*	16.099*
RADIACION	2	0.830	1.526	29.491*	33.031*
Pretratamiento x MMS	4	1.721*	0.734	21.124*	14.259*
Pretratamiento x Radiación	4	0.345	0.826	1.296	0.294
Radiación x MMS	4	0.284	1.401	1.81	0.396
Pretrat. x MMS x Radiación	8	0.372	1.312	30.418*	32.019
Error	54	0.652	0.627	0.216	6.858
TOTAL	80				

* Diferencia significativa al 1%.

TABLA 3. Comparación múltiple de medias por la prueba de Tukey para determinar el efecto protector del ácido ascórbico sobre semillas de *Triuncle hexaploide* L. (var. Bacum) tratadas con MMS, radiaciones gamma y diferentes pretratamientos.

Medias comparadas	Parámetro evaluado	Velocidad de germinación	Altura de los coleóptilos (mm)
AII ₃ — CII ₃		*	*
AIII ₃ — CIII ₃		*	*
BII ₃ — CII ₃		*	*
BIII ₃ — CIII ₃		*	*

* Diferencia significativa al 1%.

El análisis de la velocidad de germinación (VG, Tablas 2 y 3), muestra que no fue afectada por las diferentes dosis de rayos gamma pero sí lo fue en cambio por el MMS, disminuyendo la velocidad con las más altas concentraciones. El ácido ascórbico contrariamente a lo esperado, no mostró protección e incluso, la velocidad de germinación, se vio disminuida significativamente en los lotes tratados con éste. Estos efectos se atribuyen a la formación de compuestos residuales tóxicos, que pudieron incrementar el daño celular. El crecimiento de los coleóptilos y las plántulas se mostraron distintos en cuanto al efecto protector del ácido ascórbico, pues mientras en las plántulas no hubo diferencias significativas entre los grupos, sí lo hubo para los coleóptilos; esto es evidente en la Tabla 3, al comparar los tratamientos con altas concentraciones de mutágeno tales como son el AIII₃ (en seco, con 20 Kr y 0.3% de MMS) contra el CIII₃ (pretratamiento de una hora con ácido ascórbico, 20 Kr y 0.3% de MMS).

La diferencia en el desarrollo de estas 2 estructuras, se debe a que mientras que el crecimiento del coleóptilo involucra independientemente de la división celular un mayor efecto de la elongación celular, el aumento en la longitud de la plántula se debe más a la división que a la elongación (Cercek *et. al.*, 1971, Liptay y Davidson, 1972 y Palomino, 1982). Palomino (1982) al irradiar semillas de cebada pretratadas con AET y L-cisteína, encontró protección, reflejada en una mayor longitud de los coleóptilos, los cuales tuvieron células más anchas y largas en comparación a los pretratados con agua, concluyendo que era a nivel de la elongación celular donde se obtenía la protección.

La protección a nivel de la elongación celular, puede entenderse como resultado de dos hechos, el primero que las auxinas precursoras de la división celular son más sensibles a las radiaciones gamma, en relación a las que preceden la elongación celular (Cercek *et. al.*, 1971) y segundo por la capacidad de los protectores para capturar radicales libres los cuales son altamente dañinos a biomoléculas como enzimas, auxinas, etc. (Bacq, 1975).

En nuestros resultados, las alturas de los coleóptilos y las plántulas disminuyeron por la acción del MMS y de las radiaciones gamma, los cuales están acordes con los obtenidos por Rahman y Soriano (1972), quienes encuentran al tratar arroz con este

mutágeno, una reducción en el tamaño de la planta y una disminución en la supervivencia. También Padova y Ashri (1977), al interaccionar el mutágeno químico EMS y los rayos gamma obtienen una reducción en las raíces de la plántula de cacahuete, pero sólo en altas dosis.

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa su reconocimiento a los M. en C. Roberto Uribe y Anibal de la Piedad por su colaboración en la dosimetría, al Centro de Estudios Nucleares de la UNAM por las facilidades en el uso de la fuente de irradiación y gamma, cell 200 y al Instituto de Investigaciones en Máquinas y Sistemas de la UNAM por la posibilidad en el procesamiento de los datos obtenidos de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- ANSTROM, G. 1977. En: **Manual in Mutation Breeding**. 2nd. ed. IAEA. Tech. Rep. Ser. 119. Vienna: 21-27.
- APPA RAO Y M. K. JANNA. 1976. Leaf mutations induced in black gram by X rays and EMS. **Env. and Exp. Bot.** 16: 151-154.
- BACQ, Z. M. 1975. ed. Bacq, Z. M. **Sulfur-containing radioprotective agents**. Pergamon Press. Oxford.
- BISWAS, S. y I. MATSUO. 1966. Protective and recovery effects chemicals on plant growth chromosome aberrations and mutation in irradiated seeds of crop plant. **Radiat. Bot.** 6: 575-587.
- CERCEK, L., M. EBERT y D. BREENE. 1971. A difference in the effects of 14 Mev neutrons and low LET radiations on cell elongation growth in barley, **Int. J. Radiat. Biol.** 20: 485-491.
- CONGER, B. V. 1973. The effect of ascorbic acid and sodium azide on seedling growth of irradiated and non-irradiated barley seeds. **Radiat. Bot.** 13: 375-379.
- CONGER, B. V. 1975. Radioprotective effects of ascorbic acid in barley seeds. **Radiat. Bot.** 15: 39-48.
- CZABATOR, F. J. 1962. Germination value: On index combining speed and completeness of pine seed germination. **Forest Science** 8: 386.
- DOLL H. y J. SANDFER. 1969. Mutagenic effect of gamma rays, diethy sulphate, ethyl methanesulphonate and various combinations of gamma rays and the chemicals. En: **Induced mutations in plants**. Proc. Symp. Pullman. IAEA. Vienna: 195-205.
- GAUL, H. 1959. Determination of the suitable radiation dose in mutation experiments. En: Proc. 2nd. Congr. European Association for Research on Plant Breeding, Cologne: 65-69.
- GAUL, H. 1977. Mutagen effects in the first generation after seed treatment. En. **Manual in Mutation Breeding** 2a. ed. IAEA. Tech. Rep. Ser. 119. Vienna: 87-115.
- GORELIK, Yu Ya, A. M. RUSANOV, G. N. KRUTOVS y G. F. GORNAEVA. 1977. **Radiobiologiya** 17 (6): 897-900.
- HUSSEIN, H. A. S. y M. F. ABDALLA. 1979. Gamma ray and EMS induced mutations in Vicia faba. En: **seed proteins Improvement in cereals and grain legumes**. II IAEA: 23-31.

- KALTSIKES, P. J. 1971. The mitotic cycle in an amphyploid (*Triticale*) and its parent species, *Can. J. Genet. Cytol.* 13: 656-662.
- KAWAI, T. 1969. Relative effectiveness of physical and chemical mutagens. En: **Induced mutations in plants**. Proc. Symp. Pullman. IAEA. Vienna: 195-205.
- KHALATKAR, A. S. y C. R. BATHIA. 1975. Synergistic effect of combined treatments of gamma radiation and EMS in barley. *Radiat. Bot.* 15: 223-226.
- LEHNINGER, A. L. 1975. **Biochemistry (The Molecular Basis of Cell Structure and Function)**. 2nd. Ed Worth Publ. Inc. New York.
- LIPTAY, A. y D. DAVIDSON. 1972. Growth of the barley coleoptile. I. Its relationship to cell number and length in normal and irradiated seedling. *Am. J. Bot.* 59: 266-269.
- MENDEZ, I. 1976. **Comunicaciones Tecnicas**. Serie Azul. Monografías. No. 17. IIMASS. U.N.A.M.
- MIKAELSEN, K. 1969. Influence of mitotic stage on the effectiveness of mutagen treatments. En: **Induced mutations in plants**. Proc. Symp. Pullman. IAEA. Vienna: 245-249.
- PADOVA, R. y A. ASHRI. 1977. Evaluation of some indicators of seedling injury following gamma and EMS treatments in peanuts. *Env. and Exp. Bot.* 17: 167-171.
- PALOMINO G., F. NEPOMUCENO y R. VILLALOBOS-PIETRINI. 1979. A general description of barley coleoptile growth behavior under low LET radiations. 19: 105-115.
- PALOMINO, H. G. 1982. **Efecto protector de la AET (aminoetil isotiourea) y de la L-cisteína en semillas de cebada sometidas a la irradiación gamma del 60 Co. Evaluación de los siguientes parámetros, utilizando plántulas de la generación M1: proporción de semillas germinadas, altura de la plántula, altura del coleóptilo, número y tamaño de las células de los coleóptilos**. Tesis doctoral. Fac. Ciencias, U.N.A.M.
- PITILLO, R. F. y M. L. LUCAS. 1967. Ascorbic acid protection of *Escherichia coli* against radiation lethality in the presence of tetra-cyclines and other radiosensitizers. *Radiat. Res.* 31: 36-46.
- RADPATH, J. L. y R. L. WILSON. 1973. Reducing Compounds in radioprotection and radiosensitization. *Int. J. Radiat. Biol.* 23: 51-65.
- RAHMAN, M. M. y J. D. SORIANO. 1972. Mutagenic effects of some monofunctional alkylating agents in rice. *Rad. Bot.* 12: 291-295.
- RUBLUO, I. A., CH. R. SOSA, M. SOSA y PALOMINO, H. G. 1983. **Análisis de la interacción entre radiaciones gamma y Metil Metanosulfonato sobre semillas de Triticale con diferentes pretratamientos**. Memorias del VIII Congreso Nacional de Fitotecnia. México. En prensa.
- SCHMIDT, J. y C. D. BORG. 1976. Free radicals from purine nucleosides after hydroxyl radical attack. *Radiat. Res.* 65: 220-237.
- SHARMA, R. P. 1970. Increased mutation frequency and wider mutation spectrum in barley induced by combinig gamma rays with EMS. *Ind. J. of Genetics and Plant breeding.* 30: 180-186.
- SIGURBJORNSSON, B. y A. MICKÉ. 1974. Poliploidy and induced mutation in plant breeding. IAEA. Vienna. 303-343.

- SPSS. NIE, N. H., H. HULLC, J. G. JENKIS, K. STREINBRENNER y D. H. BENT. 1975. **Statistical Package for the Social Sciences**. 2nd. Ed. Mc. Graw Hill. New York.
- TAPPEL, A. L. 1972. Vitamin E and free radical peroxidations of lipids. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 203: 12-28.
- URIBE, R. M. y DE LA PIEDAD B. A. 1976. Calibración del TLD-100 como dosimetría en la irradiación de maíz a granel con electrones. **Inst. fis. Univ. Nal. Autón. de Mexico.** 211: 1-6.
- WALTER, H. y K. H. SEIBOLD. 1979. En: **Protein improvement in cereals and grain legume**. II IAEA. Vienna.
- YAMAGUCHI, H. 1976. Mutations induced in presoaked barley seeds by diethyl sulfate and 5-bromodeoxyuridine. **Env. and Exp. Bot.** 16: 145-149.
- ZELENY, L. 1969. Medio para determinar la humedad de las semillas. En: **Semillas**. Ed Continental. México: 797-795.