

Inducción de mutantes en arroz ("*Oriza sativa* L.")

G. KOTVICS, I. URRAH Y R. ALVAREZ

*Genética Vegetal, Dpto. de Botánica, C.N.I.C. Estación Experimental de Arroz,
Universidad de la Habana, Guanamón.*

ABSTRACT. A program of mutation induction in rice was begun in 1969. Seeds of the variety IR-8-283-3, containing 12.5% percent moisture, were irradiated with gamma ray Cobalto 60 at acute exposure. The dose applied was 25.000 r; the dose rate 2.500 r/min. In order to increase the effectivity of irradiation, the seeds were treated with Thiamine, 0.01%, and Colchichine 0.25% during 8 hours after the irradiation. The treatments were as follows: 1. Control, 2. Irradiation alone with 25.000 r, 3. Irradiation followed by Thiamine treatment, 4. Irradiation followed by Colchicine treatment, 5. Irradiation followed by Colchicine and Thiamine treatments. This papers reports the results of investigation of the physiological effects of irradiation on germination plant height 15 days after sowing, survival percentage and recovery index, cytological observations, plant fertility, and metamorphological and chlorophilic changes in the M_1 generation. Some mutants were selected from the M_2 generation: early maturing plants, dwarf plant, plants with hypersensitivity to disease under field conditions. Irradiation did not produce any real difference in seed germination, but decreased plant height, survival percentage, recovery index at 15 days after sowing, and fertility of the plants. It also increased the chromosomal aberrations in the M_1 generations. The post-irradiation Thiamine treatment showed a positive effect on the survival percentage and recovery index. The post-irradiation Colchicine treatment increased the frequency of chromosomal aberrations in the Mitose, decreased plant fertility, and produced a higher frequency of metamorphologic and chlorophilic changes in comparison to irradiation alone.

RESUMEN. En el año 1969 empezamos un programa de inducción de mutaciones en arroz. Utilizamos rayos gamma de Co^{60} aguda con dosis de 25,000 r. La dosis promedio fue de 2,500 r/min. Irradiamos las semillas secas (con 12,5% humedad) de la variedad IR-8-288-3. Para aumentar la efectividad de la irradiación, aplicamos post-tratamiento con Tiamina al 0.01% y Colchicina al 0.25%, durante 8 horas después de la irradiación. Los tratamientos fueron los siguientes: 1. Control, 2. 25.000 r, 3. 25 000 r + Tiamina, 4. 25.000 r + Colchicina, 5. 25.000 r + Colchicina + Tiamina. En este informe presentamos los resultados de las investigaciones sobre el efecto fisiológico de la irradiación sobre la germinación, la altura de las plantas a los 15 días después de la siembra, la supervivencia y el índice de la recuperación), las observaciones citológicas, la fertilidad de las plantas, los cambios mutamorfológicos y clorofilicos en la generación M_1 y algunos mutantes, seleccionados en la generación M_2 (precoces, enanos, hipersensibles a las enfermedades en las condiciones del campo). La irradiación de 25.000 r no tuvo efecto sobre la germinación, disminuyó la altura de las plantas, la supervivencia, el índice de la recuperación, la fertilidad, y aumentó las aberraciones cromosómicas en la generación M_1 . La Tiamina tuvo efecto positivo sobre la supervivencia y el índice de la recuperación. La Colchicina aumentó la frecuencia de aberraciones cromosómicas en la Mitosis, disminuyó la fertilidad de las plantas y resultó en una mayor frecuencia de cambios mutamorfológicos y clorofilicos que la irradiación.

INTRODUCCION

El primer mutante en arroz fue obtenido en el año 1934 por Ichijima (*Chandra-ratna 1963*).

La mayoría de los mutantes registrados en la literatura hasta el momento tienen importancia principalmene teórica, y sólo una pequeña parte de ellos son de interés práctico, por ejemplo, mutantes con el tallo corto, mutantes con el grano largo obtenidos en el año 1952 por Nishimura y Kurakami, mutantes resistentes a la *Cercospora oryzae* en el año 1660 por Lin y Lin, mutantes resistentes a la *Piricularia oryzae* en el año 1961 por Bekendam.

En los últimos 10 años se ha extendido la utilización del método de mutación en el mejoramiento del arroz.

Los objetivos de estos trabajos se pueden resumir en los siguientes: aumentar la variabilidad genética de los caracteres cuantitativos y cualitativos, aumentar la frecuencia de las recombinaciones en una población híbrida, y obtener mutantes resistentes a las enfermedades.

Nosotros, con este último objetivo, empezamos un programa de inducción de mutaciones en arroz en el año 1969.

MATERIALES Y METODOS

Para inducir mutantes, utilizamos rayos gamma de Co⁶⁰ en irradiación aguda con dosis de 25,000 r. La dosis promedio fue de 2500 r/min. Irradiamos las semillas secas (la humedad 12,5%) de la variedad IR-8-288-3, que representa el 86% de la producción, tiene buena productividad, pero es necesario el mejoramiento en la resistencia a las enfermedades.

Para aumntar la efectividad de la irradiación, aplicamos post-tratamientos con solución de Tiamina al 0.01% y de Colchicina al 0.25%, durante 8 horas en condiciones ambientales. Los tratamientos fueron los siguientes:

1. Control
2. 25.000 r
3. 25.000 r + Tiamina 0,01%
4. 25.000 r + Colchicina 0,25%
5. 25.000 r + Colchicina 0,25% + Tiamina 0,01%

Las dosis óptimas de los tratamientos de irradiación, de Colchicina y de Tiamina fueron determinadas anteriormente en nuestro laboratorio.

Para comparar el efecto de los diferentes tratamientos, en la generación M_1 (generación tratada) investigamos:

1. El efecto fisiológico de la irradiación.
2. Las aberraciones citológicas.
3. La fertilidad de las plantas.
4. Los cambios mutamorfológicos y clorofílicos.

En la generación M_2 analizamos la segregación de los caracteres económicos y los mutantes morfológicos y clorofílicos. En este lugar presentamos solamente algunos mutantes seleccionados.

RESULTADOS

Para expresar el efecto fisiológico de la irradiación utilizamos los índices siguientes:

1. La germinación de las semillas a los 8 días.
2. Altura de las plantas a los 15 días después de la siembra.
3. La supervivencia y el índice de la recuperación a los 15 días después de la siembra.

Los datos de la germinación se observan en la (Tabla 1).

La germinación del control fue 92,92%. La diferencia entre el control y el tratamiento 2 no fue significativa. Eso muestra, que la irradiación no tuvo efecto sobre la germinación. La diferencia entre el tratamiento 2 y 3, y 2 y 4, tampoco fue significativa, por eso se puede decir, que ni la Tiamina, ni la Colchicina, tuvieron efecto sobre la germinación. Se puede observar una diferencia significativa entre el tratamiento 5 y los otros tratamientos combinados: probablemente por la interacción entre la Tiamina y Colchicina.

El daño fisiológico de la irradiación se expresa mejor por la disminución de la altura de las plantas (Tabla 2).

La altura del control fue 15.03 cm. Si consideramos la altura del control como 100%, en este caso la altura de las plantas irradiadas es 62,01%, la diferencia es 5.71 y altamente significativa. La diferencia entre el tratamiento 2 y 3 no es significativa y entre el 4 y 5 tampoco. Así, podemos concluir que la Tiamina no tuvo efecto sobre la altura de las plantas irradiadas. La Colchicina disminuyó la altura significativamente, la diferencia entre el tratamiento 2 y 4, y entre el 3 y 5 fue significativa.

TABLA 1
PORCIENTO DE LA GERMINACION A LOS 8 DIAS DESPUES
DE LA SIEMBRA

PROYECTO II. GUANAMON, 1970

Tratamiento	Media \bar{x}	$S\bar{x}$	% de control	C.V.	Dife- rencia	Diferencia significativa / 5% /	
						control	otros tratamientos
1. Control	92,92	$\pm 1,58$	100,00	3,39	—	—	
2. 25.000 r	93,55	$\pm 1,49$	100,68	3,18	0,63	3,94	
3. 25.000 r + T	92,06	$\pm 0,78$	99,07	1,20	-0,86	3,75	
4. 25.000 r + C	93,01	$\pm 1,77$	100,10	3,81	0,09	5,05	
5. 25.000 r + C + T	97,46	$\pm 0,51$	104,89	1,03	4,54	3,53	

T = Thiamina C = Colchicina

TABLA 2
ALTURA DE LAS PLANTAS A LOS 15 DIAS DESPUES DE LA SIEMBRA
PROYECTO II. GUANAMON, 1970

Tratamiento	\bar{x} "cm"	$S\bar{x}$	% de control	C.V.	Dife- rencia	Diferencia significativa / 5% /	
						control	otros tratamientos
1. Control	15,03	$\pm 0,23$	100,00	22,32	—	—	
2. 25.000 r	9,32	$\pm 0,31$	62,01	47,90	-5,71	0,63	
3. 25.000 r + T	9,86	$\pm 0,31$	65,60	57,47	-5,17	0,63	
4. 25.000 r + C	7,99	$\pm 0,19$	53,16	34,36	-7,04	0,49	
5. 25.000 r + C + T	7,83	$\pm 0,29$	52,10	49,79	-7,20	0,61	

T = Thiamina C = Colchicina

El otro índice, con que se puede expresar el daño fisiológico es el número de las plantas sobrevivientes a la irradiación y el índice de recuperación (Tabla 3). El tratamiento 5 fue más drástico, donde el índice de la recuperación fue el menor. El índice de la recuperación fue el mayor en el tratamiento 3; así, se puede decir, que la Tiamina tuvo efecto positivo.

Aparte de los daños fisiológicos hemos observado las aberraciones citológicas en la Anafase de la Mitosis (Tabla 4).

TABLA 3
LA SUPERVIVENCIA Y EL INDICE DE LA RECUPERACION
A LOS 15 DIAS DE LA SIEMBRA

Tratamientos	Número de las plantas	Super-vivencia en %	Altura en cm \bar{x}	Indice de la recuperación			
				Indice	% de		
					control	otros tratamientos	
1. Control	219	91,25	15,03	1371,49	100,00	—	—
2. 25.000 r	208	86,66	9,32	806,67	58,82	100,00	—
3. 25.000 r + T	219	91,25	9,86	909,73	66,33	112,78	100,00
4. 25.000 r + C	211	87,92	7,99	702,48	51,22	87,08	— 100,00
5. 25.000 r + C + T	176	73,33	7,83	574,17	41,86	71,18	63,11 81,73

T = Tiamina
C = Colchicina

TABLA 4
ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN MITOSIS
EN LA GENERACION M_1

Tratamientos	Número de las anafases observaciones	Anafases con aberraciones		Las distribuciones de las aberraciones en %		
		No.	%	frag-mentos	puentes	fragmentes + puentes
1. Control	300	2	0,66	100,00	—	—
2. 25.000 r	300	93	31,00	59,14	19,35	21,51
3. 25.000 r + T	300	88	29,33	57,95	18,18	23,86
4. 25.000 r + C	300	190	36,33	10,09	72,48	17,43
5. 25.000 r C + T	300	111	37,00	13,51	70,27	16,22

T = Tiamina
C = Colchicina

En la (Tabla 4), podemos observar que la irradiación resultó en un 31% de aberraciones cromosómicas y la mayoría de las aberraciones fueron fragmentos. La Tiamina no tuvo efecto considerable. La Colchicina aumentó las aberraciones en comparación con el tratamiento 2 y 3, y la mayoría de ellos fueron puentes. Comparando estos datos con la fertilidad de las plantas (Tabla 5), no obtuvimos una buena coincidencia, por ejemplo, en el tratamiento 3. Eso indica que la causa de la esterilidad en la generación M_1 es muy compleja, y no es sólo debida a una aberración cromosómica. La irradiación disminuyó considerablemente la fertilidad de las plantas (60.26%) respecto al control. El menor valor de la fertilidad se encontró en el tratamiento 3. La Colchicina disminuyó la fertilidad considerablemente.

En la generación M_1 analizamos los cambios mutamorfológicos y clorofilicos (Tabla 6). La irradiación resultó 38% modificaciones y 21% daños clorofilicos. La mayor frecuencia de los cambios morfológicos y clorofilicos se encontraron en los tratamientos 4 y 5. La irradiación en combinación con el post tratamiento de Tiamina, resultó en una mayor frecuencia en los cambios morfológicos y en un menor % en los daños clorofilicos en comparación con el tratamiento 2. (Figs. 1, 2, 3 y 4).

En la generación M_1 encontramos los cambios mutamorfológicos siguientes:

1. Ramificación del tallo
2. La espiga compacta
3. La espiguilla compacta
4. La espiga con los granos espaciados
5. La semilla geotrópica y estéril
6. La semilla geotrópica y fértil
7. La semilla geotrópica, estéril y albina
8. Las semillas con aristas
9. Las semillas largas
10. Las semillas cortas y redondas
11. La glumela interior doble
12. Las glumas estériles largas
13. La lema es más larga que la pálea y curva ("beaked hull").
14. Espigas desgranadas
15. La espiga estéril completamente
16. La espiga semiestéril
17. La semilla con subletalidad
18. La espiguilla albina

En la generación M_2 seleccionamos los mutantes precoces, enanos y las plantas con síntomas de hipersensitividad a las enfermedades. (Fig. 5-a y 5-b)

TABLA 5

FERTILIDAD DE LAS PLANTAS EN LA GERMINACION M_1
PROYECTO II. GUANAMON, 1970

<i>Tratamiento</i>	<i>Media en %</i>	<i>S\bar{x}</i>	<i>% de control</i>	<i>C V.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>Diferencia Significativa / 5% /</i>
1. Control	77,38	$\pm 1,18$	100,00	18,80	—	—
2. 25.000 r	57,53	$\pm 3,14$	60,26	52,12	—19,85	5,58
3. 25.000 r + T	50,68	$\pm 3,95$	48,34	66,66	—26,70	6,88
4. 25.000 r + C	52,33	$\pm 3,13$	56,95	55,50	—25,05	5,57
5. 25.000 r C + T	52,50	$\pm 3,29$	63,57	61,40	—24,88	5,81

T = Thiamina

C = Colchicina

TABLA 6

LA FRECUENCIA DE LOS CAMBIOS MUTAMORFOLOGICOS
Y CLOROFILICOS EN LA GENERACION M_1

PROYECTO II. GUANAMON, 1970

<i>Tratamiento</i>	<i>Número total</i>	<i>La frecuencia de los cambios</i>			
		<i>mutamorfologicos</i>		<i>clorofilicos</i>	
		<i>No.</i>	<i>%</i>	<i>No.</i>	<i>%</i>
1. Control	152	—	—	—	—
2. 25.000 r	103	38	38,89	22	21,36
3. 25.000 r + T	75	31	41,33	13	17,33
4. 25.000 r + C	117	93	79,15	39	33,33
5. 25.000 r + C + T	87	67	77,01	27	31,03

T = Thiamina

C = Colchicina

DISCUSION Y CONCLUSIONES

De los datos presentados anteriormente se puede concluir lo siguiente:

La irradiación de 25,000 r no tuvo efecto sobre la germinación de las semillas a los 8 días después de la siembra, disminuyó la altura de las plantas, la supervivencia y el índice de la recuperación a los 15 días después de la siembra. Estos resultados concuerdan bien con las observaciones de Viado y cols. (1970), en la que el efecto inhibidor de la irradiación (rayos gamma de Co^{60}) sobre la germinación de la variedad IR-8-288-3 empezó a los 60,000 r, la altura de las plantas y la supervivencia disminuyeron gradualmente con el aumento de las dosis de irradiación. Han sido obtenidos resultados similares por Miah y cols. (1970) en Pakistán y Ganashan, P. (1970) en Ceylán.

El daño fisiológico causado por la irradiación está relacionado con el proceso oxidativo en las células. Aquellas sustancias de las células que son sensibles a los procesos oxidativo, tienen mayor inestabilidad después de la irradiación. Entre estas sustancias están los aminoácidos, hormonas, coenzimas y vitaminas de las plantas (Knenokh M. A., Lapinskaya E.M. 1956, Morczek A., Mucke D. 1957, Groninger R. S. y Tappel A. L. 1957). Se conocen también numerosos resultados de experimentos sobre el efecto protector de diferentes sustancias químicas: proteínas, aminoácidos, vitaminas, etc. (Albert T. 1956, Mikaelson K., Redersen K. 1969 y Ando A. 1970).

Según lo dicho anteriormente, en los tratamientos combinados utilizamos la Tiamina como material protector. En los tratamientos combinados la Tiamina tuvo efecto positivo sobre la supervivencia y el índice de la recuperación.

Para aumenar la efectividad de la irradiación en los tratamientos combinados utilizamos la Colchicina (Fitzgerald P. H., Brehaut L. A. 1970). En los tratamientos 4 y 5 la colchicina aumentó la frecuencia de aberraciones cromosómicas en la Mitosis y entre éstas la frecuencia de los puentes, disminuyó la fertilidad de las plantas y aumentó la frecuencia de los cambios mutamorfológicos clorofílicos en la generación M_1 . Matsuo (1960) en su experimento (con el tratamiento combinado de rayos X y Colchicina de 0.05%) obtuvo un efecto positivo de la Colchicina sobre la fertilidad de las plantas en la generación M_1 . Esa contradicción se origina probablemente por la distinta concentración de la solución de Colchicina.

En la generación M_2 aparecieron los mutantes precoces, enanos y las plantas con síntomas de hipersensibilidad a las enfermedades en las condiciones del campo.

REFERENCIAS

- ALBERT T. The modification of damage caused by primary ionization of biological targets. *Rad. Res.* 5, 573, 1956.
- ANDO A. Mutation induction in rice by radiation combined with chemical protectants and mutagens. *Rice Breeding with Induced Mutation II*. IAEA Vienna, Techn. Reports Series No. 102, 1, 1970.
- BEKENDAM J. X-ray induced mutations in rice. Symposium on the Effects of Ionizing Radiation on Seed and Their Significance for Crop Improvement IAEA/FAO Karlsruhe, 609, 1961.
- CHANDRARTNA M. F. Genetic and breeding of rice p389, Longmans, London 1964.
- FRITZGERALD P. H. AND BREHAUT L. A. Depression of DNA synthesis and mitotic index by colchicine in cultured human Lymphocytes. *Exptl. Cell. Res.* 59, 1, 1970.
- GANASHAN P. Induced mutation studies with *Brachiaria brizantha* Stapf. and some indica rice varieties from Ceylan *Rice Breeding with Induced Mutation II*. IAEA, Vienna, Techn. Reports Series No. 102, 7, 1970.
- GRANNINGER H. S. and T. (\$5. A. L. The destruction of Thiamine in meats and in aqueous solution by gamma-radiation. *Food Res.* 22, 519, 1957.
- KHENOKH M. A. AND LAPINSKAYA E. M. The action of radioactive Cobalt (Co^{60}) gamma-radiation on proteins and amino acids. *Doklady Akad. Nauk SSSR*, 110, 1956.
- LIN K. M. AND LIN P. C. Radiation induced blast disease resistance in rice. *Jap. J. Breed.* 10, 19, 1960.
- MATSUO T. AND CNOZAWZ Y. Mutations induced in rice by ionizing radiations and chemicals Effect of ionizing radiations on seed IAEA, Vienna, 495, 1961.
- MAHA A. J., BHATTI I. M., AWAN A. AND BARI G. Improvement of rice varieties by induced mutations to increase yield per acre and desistance to diseases and to improve seed quality. *Rice breeding with induced mutations II*. IAEA Vienna, Techn. Reports Series No. 102, 69, 1970.
- MIKAELSEN K. AND REDERSEN K. Protective effectiveness of cysteine, xysteamine and cristamine against X-ray induced chromosome aberrations at different stages of mitosis *Hereditas*, 60, 399, 1969.
- MORCZEK A. AND MUCKE O. Action of ionizing radiations on the biological action of vitamins of the B-group. *Strahlentherapie*, 102, 535, 1957.
- MÜLLER H. J. Artificial transmutation of the gene. *Science*, 66, 84, 1927.
- NISHIMURA Y. AND KURAKAMI H. Mutations in rice induced by X-ray. *Jap. J. Breed.* 2, 65, 1952.
- VIADO G. B., SANTOS I. S., CADA E., ESCURO P. B. AND SORIANO J. D. Induction and utilization of mutations in rice. *Rice breeding with Induced Mutation II*. IAEA, Vienna, Techn. Reports Series 102, 85, 1970.

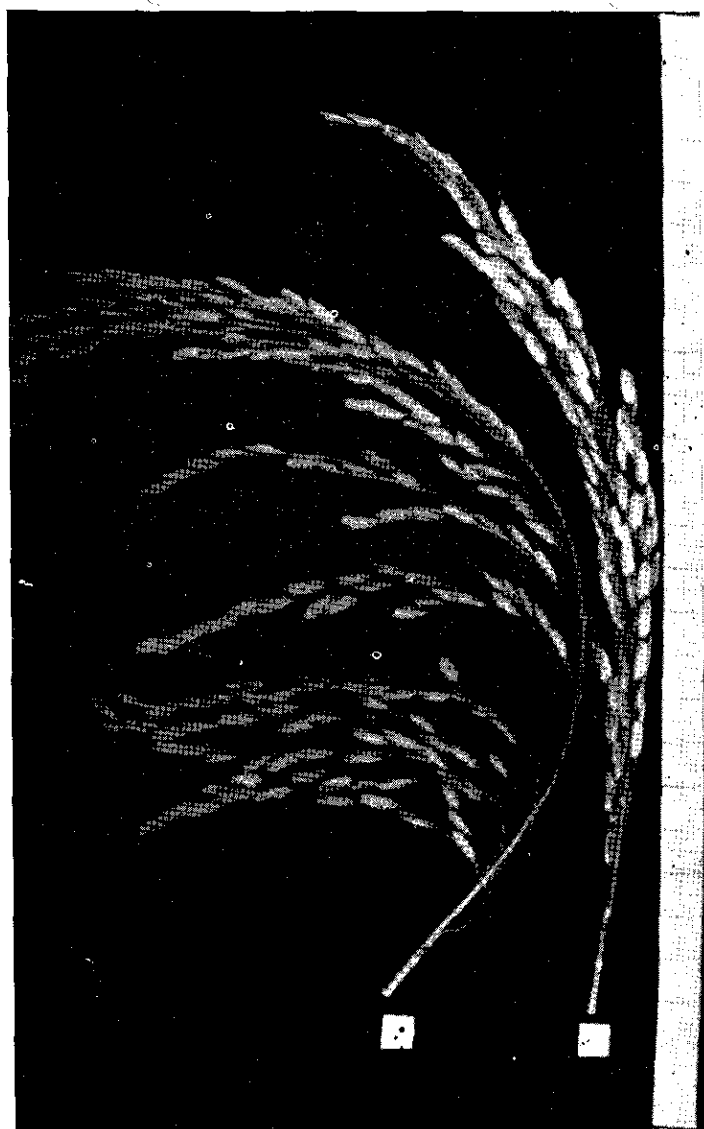


FIG. 1. Espiga normal del Control. Espiga compacta y semiestéril en la generación M_1 .

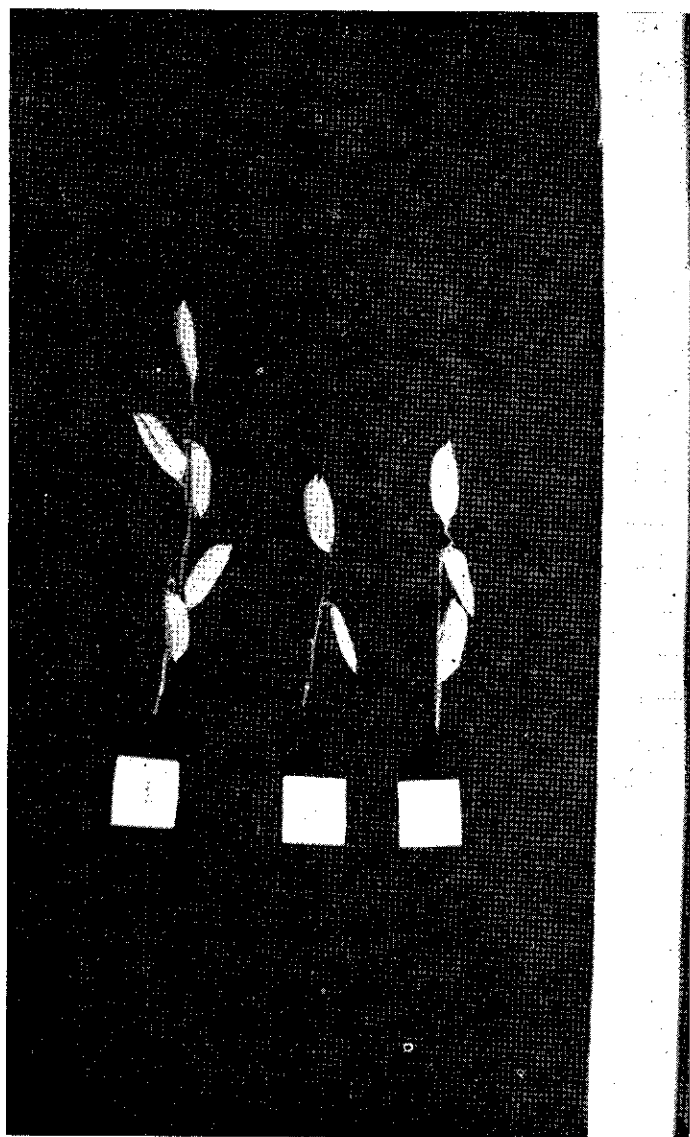


FIG. 2. Semillas geotrópicas en distintas posiciones en la generación M_1 .

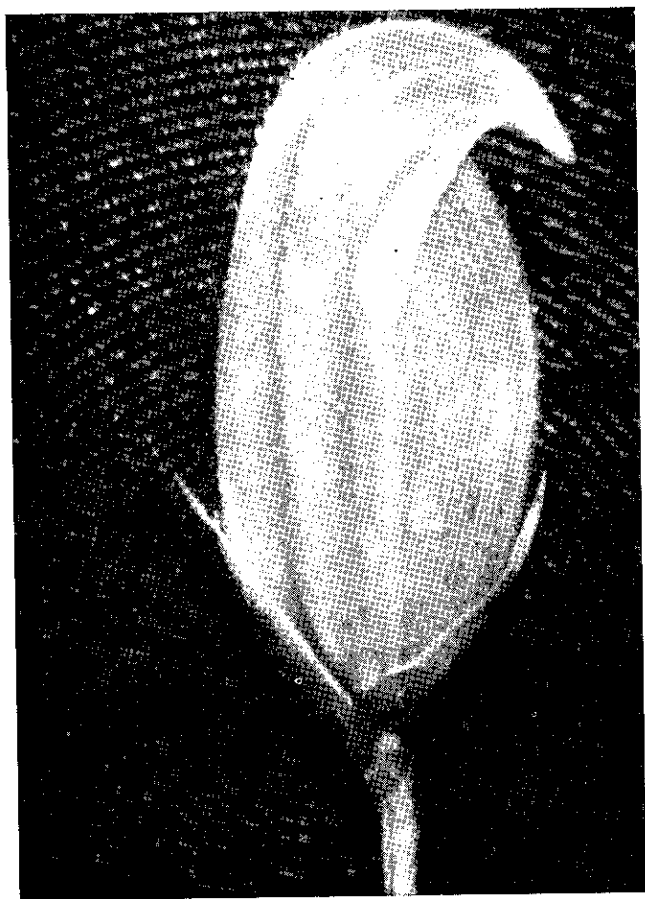


FIG. 3. La lema es más larga que la palea y curva/"broaked hull"/.

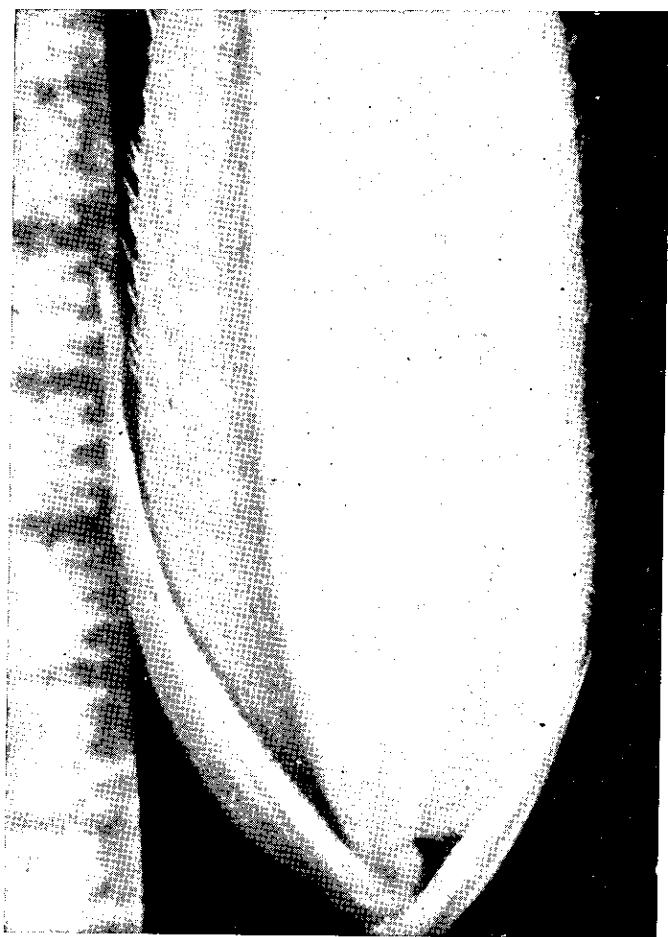


FIG. 4. La gluma estéril y larga.



FIG. 5a. Los mutantes enanos en la generación M_2 (Enano No. 428/9). 5b. Los mutantes enanos en la generación M_2 (Enano No. 428/11).