

DETERMINACIÓN DE LA DOSIS ÓPTIMA DEL MUTÁGENO QUÍMICO ETILMETANOSULFONATO (EMS) PARA EL TRATAMIENTO DE MERISTEMOS DE PLÁTANO HARTÓN COMÚN Y DOMINICO HARTÓN (Musa AAB Simmonds)

DETERMINATION OF AN OPTIMAL DOSAGE OF THE CHEMICAL MUTAGEN ETHYLMETHANESULPHONATE (EMS) FOR MERISTEM TREATMENT OF PLANTAIN "HARTÓN COMÚN" AND "DOMINICO HARTÓN" (Musa AAB SIMMONDS)

JUAN A. VARGAS MATEUS*
 STELLA GOMEZ TELLEZ**
 LUIS HERNANDO ESTUPIÑAN***

RESUMEN

Mediante el uso de la técnica de los sistemas in vitro, se estudió los efectos del EMS en meristemos de plátano Dominico Hartón y Hartón Común con el propósito de buscar la dosis óptima y realizar finalmente un tratamiento masivo en los meristemos de estos clones. Se elaboró un diseño completamente al azar (igual número de tratamientos a variedades por dosis), haciendo un análisis descriptivo y no estadístico de los resultados obtenidos. Se evaluaron 192 meristemos tanto de Dominico Hartón y de Hartón Común utilizando concentraciones de 0%, 0.30%, 0.60%, 0.90%, 1.20%, y 1.50% EMS. Se llevaron a cabo 4 evaluaciones. Las variables a estudiar fueron el número de meristemos sobrevivientes, incremento en el número de brotes y peso fresco. Para obtener la dosis óptima del EMS se tuvo en cuenta aquella dosis que redujera en un 50% el incremento del peso fresco con respecto al testigo. Los resultados obtenidos indican que la dosis óptima para el Dominico Hartón según las curvas de quimiosensibilidad fue de 0.60% EMS a 2 horas de exposición y la dosis letal fue de 0.90%. Para el Hartón Común la dosis óptima fue de 0.90% EMS a 4 horas de exposición según las curvas de quimiosensibilidad y la dosis letal fue de 1.20% EMS.

* Ingeniero Agrónomo U.D.C.A. (A.A. 51410 Bogotá. iajuan@latinmail.com)

** Bióloga Investigadora. Directora Lab. Biotecnología Vegetal INEA (1997)

*** Biólogo. Docente-Investigador. U.D.C.A

SUMMARY

By means of in vitro technique, with the purpose of obtaining an optimal dosage and realize later on massive treatments, the effect of EMS on the plantain clones "Hartón Común" and "Dominico Hartón" meristems were studied. A completely randomized design was employed, realizing a descriptive analysis of the results. A total of 192 meristems of each clone were evaluated, using concentrations of 0%, 0.30%, 0.60%, 0.90%, 1.20% and 1.50% of EMS. Four evaluations were executed.

The parameters studied were: number of surviving mersistems, increase in number of flushes and of the fresh weight. The optimal dosage of EMS was estimated taking into account the dosage that caused a reduction of 50% of the fresh weight, compared with the control. The results obtained indicate as optimal dosage for Dominico Hartón, based on the chemiosensitive curve, a concentration of 0,60% EMS, at two hours of exposure, being the lethal dosage the concentration of 0,90%. For Hartón Común this dosage corresponded to the concentration of 0.90% EMS at four hours of exposure, with a lethal dosage of 1.20%.

INTRODUCCIÓN

Los plátanos y bananos se cultivan en 120 países con una producción total de aproximadamente 75×10^6 toneladas de frutos, concentrándose la misma en 56 de ellos. El 90% de esa producción constituye una fuente significativa de

alimentos para más de 400 millones de personas de países tropicales y el resto se exporta a los países desarrollados. Aproximadamente 1/3 del volumen que se produce, corresponde a los plátanos y el resto a los bananos; África produce alrededor del 50% del plátano del mundo, Sur América el 25%, Asia el 15% y América Central el 10% (Swennen, 1995).

El plátano en Colombia es un cultivo que tiene no solo una importancia estratégica dentro del sector rural, sino que ocupa un lugar destacado en el suministro de alimentos. El área sembrada en Colombia es aproximadamente de 400.000 hectáreas, con una producción de 2.5 millones de toneladas anuales, destinadas en un 96% al mercado interno y el resto a la exportación (Belalcazar, 1992).

Las enfermedades conjuntamente con las plagas y malezas, conforman el trío de riesgos naturales que debe afrontar cualquier especie cultivada. El cultivo de plátano está seriamente amenazado por los ataques de bacterias, hongos, nemátodos y virus, los cuales no solo ocasiona reducción de la producción, sino también afectan su calidad, cuya consecuencia es la de incrementar los problemas sociales y económicos. Solo los países de la UPEB gastan más de 20 millones de dólares en el control de la Sigatoka Negra y Amarilla.

Estas especies, *Musa* spp no están libres de limitantes productivas como las enfermedades Sigatoka Negra, marchitamiento por *Fusarium oxysporium* L., los problemas virales como el Mosaico Virus del Pepino (MVP) entre otros y plagas como los nemátodos y el picudo negro, factores adversos para la obtención de altos rendimientos (Sandoval y Acuña, 1996).

Lograr una base clonal relativamente amplia resulta sumamente importante, entre otras cosas para evitar que el exceso de uniformidad genética haga vulnerable el cultivo al ataque de una nueva enfermedad, plaga o a razas más virulentas (Ventura, 1993).

Los esfuerzos en el mejoramiento de *Musa* spp. para la resistencia a enfermedades usando métodos convencionales, están cargados de obstáculos producto de sus complejidades: partenocarpia, esterilidad, poliploidia, propagación vegetativa (Persley y De Lange, 1987; Vuylsteke y Swennen, 1991). Estas son probablemente las razones por las que el mejoramiento convencional ha fracasado en producir un simple cultivar que sustituya las variedades establecidas (Stover y Buddenhagen, 1986). El mejoramiento por mutación puede ser particularmente importante para las especies estériles de *Musa* spp, donde no existe la reproducción sexual que pudiera generar variación genética (De Langhe, 1969; Cronauer y Krikorian, 1984).

El sistema de mejoramiento que ha sido desarrollado está basado en las técnicas in vitro para inducir las mutaciones (Novak et al, 1987; Ventura, 1993 y Ventura et al, 1996). La técnica de los cultivos in vitro se presenta como una alternativa a ser utilizada en asociación con los agentes mutagénicos químicos y físicos, con el fin de reducir el periodo de crecimiento entre la inducción de mutaciones y la época de selección. El asociar de estas dos técnicas conlleva a obtener una gran variabilidad genética a evaluar en donde por los cambios genéticos producidos por el mutágeno químico se espera obtener variedades resistentes y/o tolerantes a las diferentes enfermedades que afectan este cultivo.

Las primeras aplicaciones del cultivo in vitro en *Musa* spp, fueron reportadas por Cox et al. (1960) quienes exitosamente cultivaron embriones zigóticos. Esta técnica in vitro fue desarrollada para superar la errática y generalmente baja germinación de las semillas de plátano.

Ma y Shii, (1972) en Taiwan, reportaron la primera propagación clonal in vitro. La alta incidencia de marchitez por *Fusarium oxysporium* L. en ese país y la necesidad de replantar grandes áreas anualmente necesitó del uso de un material de plantación limpio. Berg y Bustamante, citados por Ventura et al (1996), reportaron en 1974 éxitos en la erradicación del Virus del Mosaico del Pepino (VPM) a partir del banano mediante la combinación de la terapia a calor y el cultivo in vitro de meristemas. De Guzmán, y de Guzmán et al, citados por Ventura et al (1996), cultivaron in vitro en 1975 y 1976 respectivamente, ápices de plátano irradiados, iniciando la inducción de mutaciones en *Musa* spp. A partir de este trabajo preliminar, se ha acumulado mucha información acerca del cultivo in vitro en *Musa*: Cronauer y Krikorian, (1984); Vuylsteke y Swennen (1991); Escalant y Teisson, (1989); Arias y Valverde, (1987).

Para la mayoría de las técnicas de cultivo in vitro así como para las técnicas de ingeniería genética, la embriogénesis somática es de mucha utilidad. Estas dependen en gran parte de una vía de regeneración de plantas completas a partir de células somáticas o protoplastos, que la embriogénesis somática le provee (Dhed'A y col, 1991).

En los trabajos más recientes en *Musa* spp, se ha logrado una embriogénesis eficiente y se han realizado estudios histológicos que confirman la diferenciación de embriones somáticos. También se ha reportado la obtención de embriones somáticos a partir de callos formados de embriones zigóticos inmaduros, lográndose una embriogénesis completa con estudios histológicos y regeneración de plantas completas (Cronauer y Krikorian, 1986; Escalant y Teisson, 1989; Marroquín et al, 1993).

En plátanos y bananos se vienen reportando resultados de trabajo con protoplastos desde que Bakry (1984), obtuvo protoplastos partiendo de callos de inflorescencia. Wen y Zu, (1985), lograron protoplastos así como la fusión de los mismos, manteniéndolos vivos por 15 días, pero no lograron que regenerara la pared celular. Matsumoto, et al (1985), alcanzó protoplastos de brácteas jóvenes, observando las primeras divisiones a los 5 días de cultivo.

Megía et al, (1992) lograron la obtención de protoplastos, partiendo de suspensiones celulares iniciadas de callos formados de embriones cigóticos inmaduros; emplearon el diploide *Musa acuminata* (AA) ssp. burmánica. También lograron que los protoplastos regeneraran la pared, se dividieran y formaran callos. En este trabajo se probaron diferentes métodos para el cultivo de protoplastos como es el uso de células nodrizas, diferentes estados y tipos de barreras entre las células nodrizas y los protoplastos.

Se han realizado estudios sobre la acción del EMS in vitro en bananos con los clones SH-3362, un diploide (AA) con un alto nivel de resistencia a la Sigatoka Negra y caracterizado por sus manojos grandes de frutas; un segundo clon el GN-60Gy, mutante proveniente del Cavendish, cultivar "Grand Nain" del grupo de los triploides (AAA). Estos estudios llegaron a la conclusión que la eficiencia del mutágeno era diferente en ambos genotipos.

El diploide SH-3362 mostró una eficiencia de captación en presencia del Dimetilsulfoxido (DMSO) 26 veces más alta que en el triploide GN-60Gy. La captación del mutágeno se reduce a 16 veces cuando no hay presencia del DMSO. También se concluyó que las concentraciones más apropiadas para ambos genotipos fue del 0.2% con una exposición de 3 horas.

Las concentraciones apropiadas y el tiempo requerido de exposición del EMS sobre los meristemos apicales debe establecerse para cada clon o cada grupo que se desee estudiar mediante la experimentación (Omar et al 1989).

Después del tratamiento, utilizando mutágenos observa una considerable variación fenotípica en las plántulas regeneradas en los estados iniciales del crecimiento, observándose alteraciones en la emergencia de las hojas jóvenes, otros cambios morfológicos en el tallo y la lámina foliar. Entre los cambios inducidos por este método se han observado:

1. Plantas altas con entrenudos largos
2. Plantas enanas con entrenudos cortos
3. Hojas angostas
4. Formas irregulares en la lámina foliar

5. 3-4 pseudotallos a partir de un cormo
6. Cambios en el color de las hojas (mutaciones clorofílicas), hojas con amarillo verde, manchas de antocianina.
7. Cambios en el número de dedos por mano (más y menos)
8. Aparición temprana de flores y frutos.
9. Cambios en el número de manos por racimo (más y menos)

En Musáceas se observó una planta mutada, derivada del clon Cavendish (Grand Naine (AAA) de gran vigor con aparición temprana de flores y frutos a los nueve meses de edad, la cual fue seleccionada y ahora se propaga in vitro para la evaluación en zonas bananeras (Perea y Novak 1988).

Este proyecto de investigación hizo parte y abarcó un 30% del macro proyecto titulado "Mejoramiento de Plátano por Inducción de Mutaciones", que se inició en 1995 en los laboratorios de Biotecnología Vegetal del Instituto de Ciencias Nucleares y Energías Alternativas INEA, con el auspicio del Organismo Internacional de Energía Atómica OIEA. El 70% restante correspondió a la micropropagación in vitro de ápices meristemáticos de los clones de plátano Dominico Hartón y Hartón Común *Musa* AAB Simonds los cuales se trataron con mutágenos físicos, usando rayos Gamma en la fuente de Co60.

El propósito de esta investigación consistió en determinar la dosis óptima del mutágeno químico Etilmetanosulfonato (EMS) en los meristemos de los clones de plátano Dominico Hartón y Hartón Común (*Musa* AAB Simmonds); para esto, en primer lugar, se propagaron in vitro ápices meristemáticos de los clones de plátano Dominico Hartón y Hartón Común y se trataron con el mutágeno químico antes mencionado en concentraciones previamente establecidas.

Se elaboraron dos curvas de quimiosensibilidad para definir las dosis óptimas que se aplicaran a estos clones. Los meristemos apicales se llevaron hasta la generación MVI

MATERIALES Y METODOS

Para el desarrollo de esta investigación inicialmente se utilizaron 50 cormos de plátano Dominico Hartón y Hartón Común, provenientes de las Universidades de Caldas y Magdalena. Las características del material vegetal de donde se obtuvieron los cormos se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Características del material vegetal utilizado en la investigación

Variedad	Siembram. s.n.m.	Ciclo veget.	Genom	Altura	Diametro delseudotallo	Long. del fruto	Diametro del fruto	Peso promedio del fruto
D.H.	0-1500	10-12 meses a 20 msnm 16-18 meses a 1360 msnm	AAB	3.3 m	18 cm.	30.8 cm	4.58 cm	295 gr.
H.C.	0-1000	10-12 meses a 20 msnm 14-15 meses a 1000 msnm	AAB	3.78 m	18 cm.	33.5 cm	4.77 cm	335 gr.

Con un tamaño de 15 cm de largo y plántulas de Hartón Común obtenidas en el laboratorio de Biotecnología Vegetal e invernaderos del INEA, con una altura de 20 cms y con 4 o 5 hojas bien definidas, adaptadas en suelo desinfectado con formaldehído. En cuanto a equipos de laboratorio se utilizaron como autoclaves, esterilizadores para instrumentación, estufas de secado Cabinas de flujo laminar y de extracción de vapores para el manejo de mutágenos químicos, cuartos de crecimiento con temperatura y luz controlados, reactivos como Etilmetanosulfonato (EMS), Dimetilsulfoxido DMSO), sales de M&S (1974), hormonas y vitaminas de Morel. Vidrieria, Instrumentación, Zona de laboratorio en general e Invernadero.

Se seleccionaron plantas representativas, que han tenido una buena producción por varios ciclos. han producido racimos sanos, bien formados con buenos frutos y a las cuales se les ha mantenido una estricta vigilancia en cuanto a sanidad se refiere. En el campo se seleccionaron hijuelos de espada con una altura entre 50 y 70 cm, de estos se obtuvieron los cormos que fueron transportados hasta el laboratorio de Biotecnología Vegetal del INEA. A este material se le eliminaron las partes externas del cormo y las vainas foliares, hasta obtener secciones de aproximadamente 5 cm de largo y 3 cm de diámetro, que encierra el ápice vegetativo. El material recibió una primera esterilización con una solución

de clorox al 40% por 30 minutos; luego se llevó a alcohol al 70% por 5 minutos para sacar los residuos de clorox; posteriormente se realizaron tres lavados por 10 minutos cada uno, con agua destilada estéril, para seguir eliminando problemas de toxicidad por los residuos del alcohol (Sandoval, 1985; Ventura, 1993.)

Se redujeron los cormos hasta alcanzar 2 cm y se llevó a cabo una segunda esterilización con una solución de clorox al 20% por 15 minutos. Se hicieron tres lavados por 10 minutos con agua destilada estéril. Nuevamente se redujo cada explante hasta alcanzar de 3 a 5 mm., colocándolos luego en secado con papel absorbente estéril y se procedió a llevarlos a un medio de iniciación. Para evitar la oxidación se adicionó L-Cisteina al medio de iniciación, de acuerdo a lo recomendado por Sandoval, (1985) ; Navarro y Perea (1996). El explante fue colocado en el medio de iniciación y mantenido a una temperatura de 28°C, con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad por 28 días para obtener la diferenciación del meristemo.

La formación de brotes múltiples se indujo mediante la supresión de la dominancia apical en un medio de multiplicación. Este efecto se produce al realizar un corte en la región apical del explante, el corte incluye aproximadamente 2/3 de la longitud del ápice meristemático (Murashige y Skoog

1974). Esta operación puede realizarse unas 4 semanas después de la iniciación. Las condiciones de cultivo son las mismas que para la iniciación (16 horas luz, y 28°).

Para las siguientes fases de la investigación se adoptaron las metodologías desarrolladas en el OIEA y el INEA. Después de dos subcultivos se obtuvieron suficientes explantes (brotes) para el tratamiento mutagénico. Es de anotar que cualquiera que sea el mutágeno utilizado, el tamaño y método de obtención de explantes es similar. Brotes

de cada uno de los explantes se individualizaron, manteniendo una parte basal de tejido del cormo. La región meristemática se redujo hasta alcanzar un tamaño de 2-3 mm, (el domo conteniendo pocas células y 2-3 pares de primordios foliares). Mientras se preparaban las soluciones con el EMS los meristemas se mantuvieron en medio de multiplicación para evitar su deshidratación.

Se prepararon inicialmente 500 ml del medio M&S líquido sin hormonas y se distribuyó de la siguiente forma:

Cantidad Medio	Tiempo exposición	Variedad de plátano	Actividad
47 ml M&S	2 y 4 horas	Dominico Hartón y Hartón Común	Autoclavar
44 ml M&S	2 y 4 horas	Dominico Hartón y Hartón Común	Autoclavar
41 ml M&S	2 y 4 horas	Dominico Hartón y Hartón Común	Autoclavar
38 ml M&S	2 y 4 horas	Dominico Hartón y Hartón Común	Autoclavar
35 ml M&S	2 y 4 horas	Dominico Hartón y Hartón Común	Autoclavar

100 ml del medio M&S líquido sin hormonas autoclavar (EMS al 5% + DMSO* al 2%), a fin de lograr mayor absorción y penetración del mutágeno químico en los tejidos de los meristemas.

EMS (la manipulación del mutágeno se realizó en la cabina de tratamiento de gases, y se agregaron en el frasco que contenían los 100 ml del medio M&S líquido, a través de esterilización por filtro. Una vez hecha la mezcla se adicionó esta solución patrón a los frascos previamente marcados con los diferentes tratamientos así:

Después de esterilizar los frascos con las soluciones de M&S se llevaron a la cabina de flujo laminar. Se tomaron 5 ml de

TRATAMIENTO Concentración	Soluciones EMS Stock Cantidad	Medio M&S Cantidad
0.30% EMS	3 ml	47 ml
0.60% EMS	6 ml	44 ml
0,90% EMS	9 ml	41 ml
1.20% EMS	12 ml	38 ml
1.50% EMS	15 ml	35ml

Después de preparadas las concentraciones del EMS se procedió a sumergir los meristemas en sus respectivas concentraciones, anotando en cada concentración la hora en que se sumergieron para llevar control estricto del tiempo de 2 y de 4 horas. Luego del tratamiento se realizaron tres lavados de los meristemas con agua destilada estéril, cada uno por 10 minutos para sacar los residuos del EMS. Inmediatamente estos meristemas se sembraron en el medio de propagación (25 ml del medio con 4 meristemas/frasco). Los frascos fueron previamente etiquetados con nombre de la variedad a tratar, número de la repetición, tiempo del

tratamiento, clase de concentración, fecha de siembra. Terminado este paso se llevaron los frascos al cuarto de crecimiento, y se hicieron 4 evaluaciones cada 10 días. Por cada evaluación realizada, los explantes se colocaron en un nuevo medio.

Desde el momento en que se adicionó el EMS a las soluciones líquidas de M&S, el material fue trabajado en completa asepsia. Las variables que se estudiaron fueron número de meristemas sobrevivientes, incremento del peso fresco del explante, tasa de proliferación de brotes o número de brotes

nuevos. En este paso se tuvieron en cuenta aquellos brotes en donde se observó color verde ya que esto nos indicaba la aparición de un nuevo explante. La metodología que se usó para el análisis de esta investigación fue completamente aleatorizada con 6 tratamientos y cada uno con 4 repeticiones y cada repetición con 4 meristemos apicales, para 2 y 4 horas en Dominico Hartón y Hartón Común. Para la obtención de la dosis se realizó un análisis descriptivo y no estadístico de los resultados obtenidos, siguiendo la metodología de

los Laboratorios de Seibersdorf del O.I.E.A. (Viena, Austria) y Laboratorios de Biotecnología Vegetal del INEA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis y discusión de los resultados se hace con base en lo reportado en la Tabla No.2, teniendo en cuenta lo encontrado para cada clon.

Tabla 2. Valores de los diferentes parámetros obtenidos, correspondientes a cada tratamiento para los clones evaluados.

EMS. Concen. (%)	No. Merit. semb.		Sobrevivi. (%)		Nuevos brotes (%)		peso fresco (grs.)													
	2 horas	4 horas	2 horas	4 horas	2 horas	4 horas	10 días		20 días		30 días		40 días							
Dominico Hartón													2 h.	4 h	2 h	4 h	2 h	4 h	2 h	4 h
0% Testigo	4	4	12(100%)	10(100%)	8(100%)	6(100%)	0.52	0.20	1.16	0.85	3.34	3.60	5.79	5.10						
0.30%	4	4	8(66%)	8(80%)	4(50%)	4(66%)	0.19	0.18	0.43	0.42	0.91	0.75	2.01	1.30						
0.60%	4	4	12(100%)	7(70%)	8(100%)	3(50%)	0.38	0.23	0.90	0.43	1.59	0.70	2.96	1.02						
0.90%	4	4	0(0%)	4(40%)	0(0%)	0(0%)	0.061	0.12	0.11	0.13	0.15	0.12	0.00	0.12						
1.20%	4	4	5(41%)	4(40%)	1(12.5%)	0(0%)	0.12	0.17	0.18	0.17	0.22	0.16	0.32	0.17						
1.50%	4	4	4(33%)	2(20%)	0(0%)	0(0%)	0.102	0.116	0.11	0.08	0.10	0.07	0.10	0.07						
Hartón Común													2 h.	4 h	2 h	4 h	2 h	4 h	2 h	4 h
0% Testigo	4	4	10(100%)	13(100%)	6(100%)	9(100%)	0.37	0.60	0.84	1.32	0.28	2.26	2.03	3.52						
0.30%	4	4	17(170%)	14(107%)	13(216%)	10(111%)	0.85	0.70	1.56	1.37	2.41	2.30	3.60	3.72						
0.60%	4	4	14(140%)	15(115%)	10(166%)	11(122%)	0.74	0.52	1.33	1.28	2.05	2.13	3.13	3.52						
0.90%	4	4	14(140%)	9(69%)	10(166%)	5(55%)	0.57	0.26	0.12	0.56	1.88	1.01	2.90	1.83						
1.20%	4	4	14(140%)	6(46%)	10(166%)	2(22%)	0.47	0.15	1.12	0.31	2.10	0.47	3.47	0.70						
1.50%	4	4	15(150%)	2(15%)	11(183%)	0(0%)	0.61	0.21	1.34	0.30	2.47	0.36	3.72	0.30						

Dominico Hartón 2 horas

En la tabla 2 se observa la interacción de las diferentes dosis de EMS sobre las variables estudiadas a los 10, 20, 30 y 40 días. En el testigo (0% EMS) durante los 40 días de evaluación, los meristemos sobrevivieron en un 100%, su peso fresco se incrementó de 0.52 g (10 días) a 5.79 g (40 días) lo que significa un aumento de 5.27 g, valor que se toma de referencia como el 100%. En cuanto al número de brotes se obtuvo en promedio de 3 en 10 días, hasta 8 en 40 días. En las concentraciones de 0.30% a 1.50% de EMS, se observaron los efectos fisiológicos (reducción del crecimiento de los explantes, sobrevivencia de los explantes, incremento del peso fresco) y a medida que pasaron los días, la sobrevivencia de los meristemos se empezó a reducir notablemente. El caso más severo se presentó en la concentración 0.90% de EMS, ya que en la primera evaluación (10 días) se observó una pérdida del 50% (2 sobrevivientes) y a los 40 días todos los meristemos se hallaban totalmente necrosados. Con respecto al peso fresco éste se incrementó, pero no en la misma proporción con el testigo. El peso fresco en las concentraciones 0.30% y 0.60% de EMS, se

incrementó en un 34.71% y 51.12% respectivamente, mientras que en las concentraciones 0.90%, 1.20% y 1.50% el incremento del peso fresco se redujo a menos del 10%

El número de brotes en las concentraciones 0.30% disminuyó en un 50% con respecto al testigo y en la concentración 0.60% se mantuvo en un 100% con respecto al testigo. En la concentración del 0.90% a los 40 días todos los meristemos se necrosaron; en la concentración del 1.20% el incremento fue del 12.5% y en la concentración del 1.50% no hubo presencia de brotes nuevos.

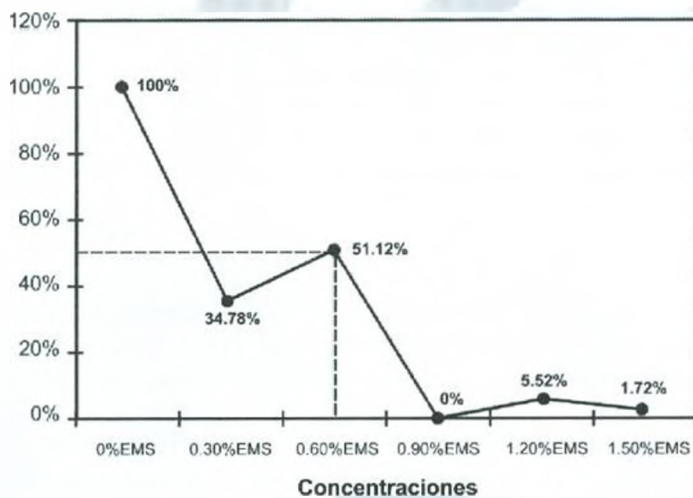
En la figura 1 se presenta la curva de quimiosensibilidad para la cual se tomó como 100% del peso fresco obtenido en el control; con base en esta se escogió aquella dosis que presentó una sobrevivencia del 50%.

Dominico Hartón 4 horas

En la Tabla 2 se observa la interacción de las diferentes

dosis del EMS sobre los meristemas tratados a los 10, 20, 30, y 40 días. En este caso sucedió algo particular, ya que en todas las concentraciones los meristemas sobrevivieron en más del 50% a excepción de la concentración del 1.50%, en donde a partir de los 20 días su sobrevivencia se redujo en un 50%. A pesar de que todos los meristemas sobrevivieron, el incremento del peso fresco en la concentración 0.30% fué del 25,49%, en la concentración 0.60% fué del 20%, y en las concentraciones de 0.90% en adelante estuvo por debajo del 5. En cuanto al número de brotes nuevos las proporciones más altas se obtuvieron en las concentraciones 0.30% y 0.60% de EMS con un 66% y 50% respectivamente. En las concentraciones 0.90, 1.20 y 1.50% de EMS no hubo presencia de brotes nuevos, lo que indica que en estas concentraciones a partir de los 20 días se detuvo el incremento de peso fresco por lo tanto se deduce que el tiempo de exposición a 4 horas en las concentraciones más altas es letal para los meristemas apicales de la variedad Dominico Hartón ya que el porcentaje de mortalidad superó al 75%.

Figura 1. Curva de quimiosensibilidad con los efectos del EMS en el porcentaje de incremento del peso fresco en Dominico Hartón, 2 horas



Hartón Común 2 horas

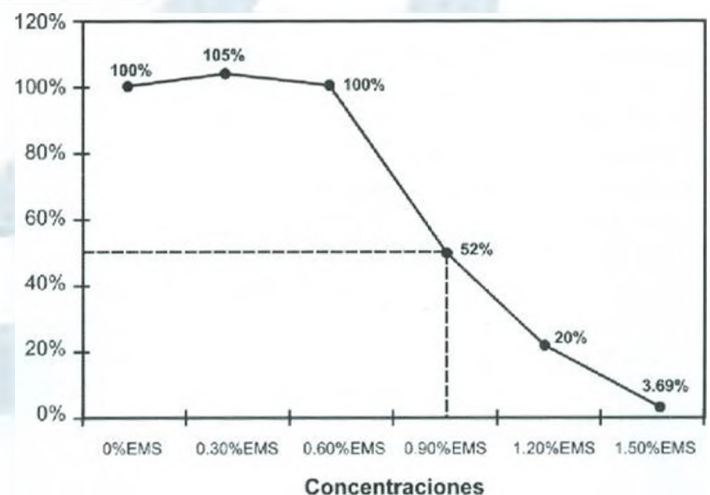
En la tabla 2 se observa también que en todas las concentraciones y en cada una de las evaluaciones realizadas que los meristemas sobrevivieron en un 100% con respecto al testigo. En cuanto al peso fresco, éste se incrementó considerablemente en todas las concentraciones superando al testigo. En el número de brotes también hubo un incremento considerable superando al testigo en más del 100%. Todo esto indica que la acción del EMS a 2 horas en esta variedad no fue efectiva, por que en ningún momento se produjo reducción en las variables estudiadas lo que nos permite descartar este tiempo de exposición.

Hartón Común 4 horas

Se observa que el número de meristemas sobrevivientes en las 3 primeras dosis fue del 100%, pero éstos comenzaron a decrecer a partir de la dosis 0.90% de EMS. De igual forma el peso fresco en las concentraciones 0.30% superó al testigo. En la concentración de 0.60% se mantiene con respecto a este, y en la concentración de 0.90% en adelante comienza a reducirse por debajo del 50%. A partir de esta misma concentración 0.90% la producción de brotes nuevos disminuyó por debajo de un 60%,.

En la figura 2 se presenta la curva de quimiosensibilidad tomando como 100% el porcentaje de peso fresco obtenido en el control. Con base en este dato se escogió aquella dosis que presentó hasta una reducción del 50%. Con lo anterior se comprueba lo dicho por otros investigadores, haciendo referencia a la escogencia de la dosis adecuada para esta clase de investigaciones. Broertjes y Van Harten, (1988), afirman que las dosis aplicadas para determinar por exposición al mutágeno seguido por el cultivo in vitro pueden evaluarse mediante el porcentaje de sobrevivencia y material fresco o seco desarrollado, comparándose con el material no expuesto. Gaul, 1977 y Tulman, 1986, (citados por Quevedo, 1994), concuerdan que los mutagénicos pueden producir efectos fisiológicos observables en la generación M1.

Figura 2. Curva de quimiosensibilidad con los efectos del EMS en el porcentaje de incremento del peso fresco en Hartón Común, 4 horas



Estos efectos pueden ser utilizados para escoger la dosis a ser empleada en el tratamiento. Dichos efectos pueden ser cuantificados de varias maneras en la reducción de altura de plántulas, emergencia en condiciones de campo o germinación en condiciones de laboratorio, y sobrevivencia,

entre otras. Según Tulman, 1986 (citado por Quevedo, 1994) en este tipo de investigaciones los materiales se tratan primero con dosis crecientes del mutagénico, analizando los efectos fisiológicos para cada una de las dosis, para posteriormente escoger una de ellas. Algunos autores sugieren que se deben escoger dosis que causen una reducción en la sobrevivencia del 20 al 30%. Otros autores prefieren la utilización de dosis más altas en donde se genere una sobrevivencia hasta del 50% (altos daños fisiológicos en la generación M1).

Gaul, (1977), sostiene que los efectos fisiológicos son un límite práctico para el aumento de la dosis, evidentemente el punto final estará alcanzado con un 100% de letalidad debido al tratamiento. Con respecto a la inhibición en la germinación y reducción de crecimiento (entre otras variables) en plantas de generación M1, éstas se deben a una demora en la producción de ATP, lo que causaría un atraso en la síntesis del DNA (Pearson et al. 1975). Gaul, (1963), por su parte, menciona que los efectos fisiológicos que se observan en los tratamientos de las dosis tiene una respuesta sigmoidea. Esto lo comprobamos en las curvas de quimiosensitividad.

Existió aumento en los efectos fisiológicos a medida que se incrementaron las concentraciones del EMS, lo cual concuerda con lo expuesto por Ichikawa et al., (1970, citados por Broertjes y Van Harten, 1988), quienes afirman que la observación de efectos causados por la radiación o cualquier agente mutagénico depende directamente de la dosis suministrada. Al realizar una comparación entre los genotipos Dominico Hartón y Hartón Común, se resalta que el Hartón Común es más resistente a los efectos del EMS en una exposición de 2 horas. Dicha interacción nos indica que se ponen de manifiesto diferencias existentes respecto a la sensibilidad dentro de los genotipos de una misma especie, lo cual está altamente correlacionado con las características morfológicas de los genotipos descritos en la Tabla No.1. Se puede generalizar que con este comportamiento es posible agrupar variedades de una misma especie en sensibles, tolerantes o resistentes.

CONCLUSIONES

La dosis óptima del mutágeno químico en Dominico Hartón es de 0.60% de concentración para un tiempo de 2 horas, mientras que la dosis óptima para el Hartón Común es de 0.90% de concentración para un tiempo de 4 horas de exposición.

Las dosis letales del Dominico Hartón son de 0.90% en

adelante en 2 horas y de 0.30% en adelante para 4 horas. Las dosis letales para el Hartón Común son de 1.20% de concentración en adelante para 4 horas.

Los cambios fisiológicos observados y las dosis óptimas variaron considerablemente a medida que se aumentaban las concentraciones y el tiempo de exposición.

Las curvas de quimiosensitividad presentan una tendencia de tipo lineal e inversamente proporcional, o sea que a mayor dosis del EMS se produce reducción en el valor de las variables.

El Hartón Común es más resistente a los efectos del EMS en una exposición de 2 horas en relación con el Dominico Hartón.

Para las concentraciones altas de EMS, cuando se presentan meristemas sobrevivientes no hay formación de brotes nuevos ni incremento de peso fresco.

RECOMENDACIONES

Para establecer la dosis adecuada del mutágeno químico EMS de los clones estudiados en esta investigación, se recomienda tener en cuenta los valores promedios que arroja la última evaluación (40 días) ya que en este tiempo los explantes se han desarrollado completamente mostrando de una forma clara los efectos fisiológicos causados por el agente mutagénico.

A pesar de que se estudiaron tres variables (incremento del peso fresco, meristemas sobrevivientes e incremento de brotes nuevos), se recomienda que en futuras investigaciones en este tema, se tenga en cuenta el incremento del peso fresco, ya que de este dependen las demás variables.

BIBLIOGRAFIA

- BAKRY, F. 1984. Diferentes materiales empleados para el aislamiento de protoplastos de banano. *Fruits* (Costa Rica) Vol.39, No.7-8.
- BELALCAZAR, S. 1992. El Cultivo del Plátano, (Musa AAB Simmonds) en el Trópico. ICA.(Colombia) Manual de Asistencia Técnica No.50
- BROERTJES J., VAN HARTEN, A.M. 1988. Applied mutation breeding for vegetatively propagated crops. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier. 345 p
- COX, E.A.; STOTZKY, G.; GOOS, R.D. 1960. In vitro culture

- of *Musa balbisiana* Colla embryos. *Nature* 185. p 403
- CRONAUER, S.S., KRIKORIAN, A.D. 1984. Aseptic culture techniques for bananas and plantain improvement. *Economic Botany* 38: p 322-331
- DE LANGE, E. 1969. Bananas *Musa* spp. In: *Outlines of Perennial Crop Breeding in the Tropics*, The Netherland. p 53-78.
- ESCALANT, J.V. TEISSON, C. 1989. *Plant Cell Report*. 7: p 665-668.
- GAUL, H. 1963. Mutation in der Pflanzenzüchtung, Z. Plazenzucht. 50. p 194-307
- GAUL, H. 1977. Plant injury and lethaly. In: *International Atomic Energy Agency. Manual on Mutation Breeding*. Vienna. p. 87-91
- MA, S.S. ;SHII, C.T. 1972. In vitro formation of adventitious buds in banana shoot apex following decapitation. *J. Chinese Soc.Hort. Sci.*, 18. p 135-142.
- MARROQUIN, G.C. et al. 1993. LP-In vitro Plant, art.# V91050P. CATIE. Turrialba Costa Rica. p 1-4.
- MATSUMOTO, K. et al. 1985. Aislamiento y cultivo de protoplastos de brácteas de plátano. Abstracts.
- MEGIA, R. et al. 1992. Formación de callos a partir de protoplastos de bananos (*Musa* sp.). *Plant Science*, 85: 91-98.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. 1974. A Revised medium for rapid growth and Bioassays with Tobacco tissue, *Culture Physiologia Plantarum*. 15: 473-479.
- NAVARRO, A.W.; PEREA, D.M. 1996. Técnicas In vitro para la producción y mejoramiento de las plantas. Universidad Nacional. Colombia. p 66-82
- NOVAK, F.J. et al. 1987. Micropropagation and radiation sensitivity in shott tip culture of banana and plantain. *Inter. Symp. on Nuclear Techn. on In vitro Culture for Plant Improv. Vienna*. 1:12
- OMAR, M.S.;NOVAK, F.J.; BRÜNNER,H. 1989 In vitro action of Ethylmethanesulphonate on banana shoot tips. *Scientia Horticulture*, 40. p 283-295.
- PEARSON, O.W.; SANDER, C.; NILAN, R.A. 1975. The effects of sodium azide on cell processes in the embrionic barley shoot. *Radiation Botany*. New york. p 315-322.
- PEREA, D.M., NOVAK, F.D. 1988. Resultados promisorios en el mejoramiento genetico a traves de mutagenesis y regeneracion de plantas de *Musa* spp via Embriogenesis somatica. *Revista de Acevic*. Bogotá, Colombia. No.3. p 29-32
- PERSLEY, G.J., DE LANGE, E.A. 1987. *ACIAR. Proceedings*. 21. 187 p.
- QUEVEDO, L.A.. 1994. Comparación de los efectos fisiologicos y geneticos causados por las radiaciones gamma y la azida sodica (NaN₃) en cuatro genotipos de trigo (*Triticum aestivum*, L.). Santafé de Bogotá. Tesis Magister Scientiae en Genetica y Fitomejoramiento. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomia. p. 14-32
- SANDOVAL, J.A. 1985. Micropropagacion en Musaceas. *Revista de la Asociacion Bananera Nacional ASBANA*. (Costa Rica) 9(24): 21-23
- SANDOVAL, J.A. y ACUÑA, P. 1996. Prospectivas de la nueva biotecnologia en el cultivo del banano. *CORBANA* 21:63-65.
- STOVER, R.H., BUDDENHAGEN, B. 1986. Banana breeding, polyploidy, disease resistance and productivity. *Fruits* 41: p 175-191.
- SWENNEN, R. 1995. Phenotypic diversity and patterns of variation in west and central african plantains (*Musa* spp), AAB Group. *Economic Botany*. p 49.
- VENTURA, M.J. 1993. El Mejoramiento genetico del plátano (*Musa* spp.) en Cuba y su repercusión social. Santo Domingo: INIVIT. 28.p.
- VENTURA, M.J. et al., 1996. Uso de las radiaciones ionizantes en el mejoramiento genetico de *Musa* spp. Santo Domingo: INIVIT. 8.p.
- VUJLSTEKE, D. y SWENNEN, E. 1991. Enhancing research on tropical crops in Africa. *Biotechnology*: 143-150
- WEN HUEI CHEN., ZU CHI KU. 1985. Aislamiento de células de mesófilo y protoplastos, y fusión y cultivo de protoplastos en bananos. *J Agricultural Assoc. China*. p. 129