

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA**

**FACULTAD DE ZOOTECNIA Y ECOLOGÍA**

**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

---



**INDUCCIÓN DE VARIABILIDAD MEDIANTE IRRADIACIÓN**

**GAMMA EN PASTO AFRICANO (*Eragrostis lehmanniana*) Y**

**GARRAPATA (*Eragrostis superba*)**

**POR:**

**M. C. ALAN ÁLVAREZ HOLGUÍN**

**DISERTACIÓN PRESENTADA COMO REQUISITO PARA  
OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN PHILOSOPHIA CON**

**ÁREA MAYOR EN RECURSOS NATURALES**



Inducción de variabilidad mediante irradiación gamma en pasto africano (*Eragrostis lehmanniana*) y garrapata (*Eragrostis superba*), disertación presentada por Alan Álvarez Holguín como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Philosophia, ha sido aceptada y aprobada por:

---

Ph. D. Carlos Ortega Ochoa  
Director de la Facultad de Zootecnia y Ecología

---

Ph. D. Felipe Rodríguez Almeida  
Encargado del Despacho de la Secretaría de Investigación y Posgrado

---

D. Ph. Agustín Corral Luna  
Coordinador Académico

---

Dr. Carlos Raúl Morales Nieto  
Presidente

---

17 de agosto del 2018

Fecha

Comité:

Dr. Carlos Raúl Morales Nieto  
Dr. Carlos Hugo Avendaño Arrazate  
Dr. Eduardo Santellano Estrada  
D. Ph. María Eduvigis Burrola Barraza  
Ph. D. Alicia Melgoza Castillo

© Derechos Reservados

AUTOR: ALAN ÁLVAREZ  
HOLGUÍN

DIRECCIÓN: PERIFÉRICO  
FRANCISCO R. ALMADA KM. 1,  
CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO  
C.P. 31453

AGOSTO DEL 2018

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por sus bendiciones y por la oportunidad de cursar este Doctorado.

A mi esposa Lilibeth y mi hija Ana Paula por haber sido mi apoyo y motivación durante la duración de mis estudios.

A mi padre por su apoyo incondicional y a mi madre por seguir siendo un ejemplo para mí, aún desde el cielo.

A mis hermanas Ivette y Suheila, por sus consejos, ayuda, apoyo y motivación.

Al Dr. Carlos Raúl Morales Nieto por haber confiado en mí, su paciencia, disposición, dedicación, apoyo, orientación y amistad.

Al Dr. Carlos Avendaño por su apoyo y enseñanzas.

Al comité de grado Dr. Eduardo Santellano, D. Ph. Eduviges Burrola, Ph. D.

Alicia Melgoza Castillo, por el apoyo, orientación y tiempo brindaron.

A mi compañero y amigo D. Ph. Raúl Corrales Lerma, por su ayuda y los buenos momentos que pasamos juntos durante este periodo.

A mi compañero y amigo el M. C. Obed Gutiérrez por haberme acompañado en este viaje.

Al CONACYT por el apoyo económico brindado a través de la beca.

A la Universidad Autónoma de Chihuahua por haberme abierto sus puertas y permitirme cursar estos estudios.

Al Centro Experimental Rosario Izapa, Chiapas del INIFAP.

Al complejo MOSCAMED de SENASICA, Metapa de Domínguez, Chiapas.

Al CINVESTAV Irapuato, en especial a la Ph. D. June Simpson y a los M. C. Katia Gil y Natzul Santoyo por su apoyo.

## **DEDICATORIA**

A mi esposa Lilibeth y mi hija Ana Paula, por ser principal motivación durante esta etapa de mi vida.

A mi madre, hermano y amigo Luis Héctor que me impulsan en todo momento desde el cielo.

A mi padre, hermanas y sobrinos que fueron un factor muy importante para mí motivación de alcanzar este logro.

A la Facultad de Zootecnia y Ecología que me permitió ser parte de la institución.

A los maestros y compañeros que contribuyeron en alcanzar la meta de obtener el grado de Doctor.

## CURRICULUM VITAE

El autor nació el 19 de agosto de 1989 en la ciudad de Cuauhtémoc, Chihuahua, México.

- 2004-2007 Estudios medio superior en Informática en la preparatoria María Luisa Delgado López No. 8408.
- 2007-2011 Estudios de licenciatura con la carrera de Ingeniero Zootecnista en Sistemas de Producción, egresado de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la UACH. Titulado con mención especial.
- 2012-2014 Estudios de Maestría en Estrategia Educativa en la Universidad Regional del Norte.
- 2013-2015 Estudios de Maestría en Ciencias con Área Mayor en Recursos Naturales y línea de investigación en Manejo de Pastizales. Titulado con mención especial
- 2015-2018 Estudiante de Doctorado Philosophia con Área Mayor en Recursos Naturales y línea de investigación en Mejoramiento Genético de Pastos
- A la fecha Autor principal de cuatro artículos publicados en revistas indizadas y uno en arbitradas. Coautor en dos artículos publicados en revistas indizadas.
- A la fecha Participación como ponente en nueve congresos internacionales.

## RESUMEN GENERAL

INDUCCIÓN DE VARIABILIDAD MEDIANTE IRRADIACIÓN GAMMA EN  
PASTO AFRICANO (*Eragrostis lehmanniana*) Y GARRAPATA (*Eragrostis  
superba*)

POR:

M. C. ALAN ÁLVAREZ HOLGUÍN

Maestría en Ciencias en Producción Animal

Secretaría de Investigación y Posgrado

Facultad de Zootecnia y Ecología

Universidad Autónoma de Chihuahua

Presidente: Dr. Carlos Raúl Morales Nieto

La falta de diversidad genética de especies vegetales exóticas dificulta su mejoramiento y limita su aprovechamiento. Ante esto, la mutagénesis es una alternativa viable para el mejoramiento de estas especies, ya que ha demostrado ser una técnica efectiva para inducir variabilidad genética. El objetivo fue inducir diversidad mediante radiación gamma en pasto garrapata y africano, con fines de mejoramiento genético. Para ellos se realizaron cuatro estudios bajo condiciones de laboratorio e invernadero. El primer y segundo estudio consistieron en determinar la dosis óptima de irradiación gamma para el mejoramiento genético del pasto garrapata y africano, respectivamente. Esto se determinó mediante la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) y la reducción media del crecimiento ( $RG_{50}$ ). En el tercer estudio se caracterizó la diversidad morfológica, nutricional, estomática y molecular, inducida mediante radiación gamma en pasto garrapata. Por último, en el cuarto estudio se caracterizó la diversidad

morfológica y nutricional, inducida mediante radiación gamma en pasto africano. La dosis óptima de irradiación se determinó alrededor de 2486 Gy para el pasto garrapata y alrededor de 1533 Gy para el africano. Estas dosis pueden ser utilizadas para el mejoramiento genético por irradiación gamma en estas especies. En el pasto garrapata, la radiación gamma generó variabilidad fenotípica y genética, lo cual permitió seleccionar la primera generación de mutantes con mayor ( $P < 0.05$ ) contenido de proteína y menor ( $P < 0.05$ ) contenido de lignina. Estos mutantes presentaron diferencias ( $P < 0.05$ ) con los testigos en densidad y área estomática, lo cual tiene repercusiones en la resistencia al estrés hídrico. Además, los mutantes presentaron distancias genéticas considerables respecto al genotipo testigo (desde 0.25 hasta 0.42, coeficiente DICE). Así mismo, la radiación gamma generó variabilidad morfológica y nutricional en el pasto africano, lo cual permitió seleccionar la primera generación de mutantes. Tres de los mutantes seleccionados (200-6, 300-7 y 1400-10) presentaron menor contenido de lignina y mayor contenido de proteína ( $P < 0.05$ ). Por lo anterior, se recomienda evaluar la progenie de los mutantes seleccionados de ambas especies, hasta fijar los caracteres seleccionados. En caso de lograr fijar estas características se contará con nuevo material genético de interés agronómico y ecológico que pueda utilizarse para rehabilitar pastizales degradados.

## GENERAL ABSTRACT

### VARIABILITY INDUCTION ON LEHMANN (*ERAGROSTIS LEHMANNIANA*) AND WILMAN (*ERAGROSTIS SUPERBA*) LOVE GRASSES THROUGH GAMMA IRRADIATION

BY:

ALAN ÁLVAREZ HOLGUÍN

The lack of genetic diversity on alien plant species hinders its improvement and use. Thus, the mutagenesis is a viable breeding alternative on these species, since it has proven to be an effective technique inducing genetic variability. Therefore, the objective was to induce variability on Wilman (*Eragrostis superba*) and Lehmann (*Eragrostis lehmanniana*) love grasses through gamma radiation, for breeding purposes. For this, four studies under laboratory and greenhouse conditions were performed. The first and second studies were carry out to determine the optimal gamma irradiation dose for the Wilman and Lehmann love grasses breeding, respectively. This was determined by the median lethal ( $LD_{50}$ ) and growth reduction ( $GR_{50}$ ) doses. In the third study, the morphological, nutritional, stomatal and molecular diversity induced through gamma irradiation on Wilman lovegrass were characterized. Finally, the fourth study was carry out to characterize the morphological and nutritional variability induced by gamma irradiation on Lehmann lovegrass. The gamma radiation generated phenotypic and genetic variability on Wilman lovegrass. This, allowed to select the first generation of mutants with more ( $P<0.05$ ) protein and less ( $P<0.05$ ) lignin, than the control genotype. These mutants presented differences ( $P<0.05$ ) respecting the control plants in the stomatal density and

area, which has repercussions on the water stress tolerance. In addition, they showed significant genetic distances to the control genotype (from 0.25 to 0.42, DICE coefficient). As in Wilman lovegrass, the gamma irradiation generated morphological and nutritional variability on Lehmann lovegrass, which enabled to select the first generation of mutants. Three mutants (200-6, 300-7 y 1400-10) with less lignin and more protein ( $P < 0.05$ ) were selected. Therefore, it is recommended to evaluate the selected mutant's progeny, until the selected characters will be fixed. In case of being able to fix these characteristics, new genetic material of agronomic and ecological interest will be available, which could be used rehabilitating degraded grasslands.

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN GENERAL.....	vi
GENERAL ABSTRACT.....	viii
LISTA DE CUADROS.....	xiii
LISTA DE GRÁFICAS.....	xiv
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Condición Actual de los Pastizales del Norte de México.....	3
Pasto Africano.....	4
Pasto Garrapata.....	5
Inducción de Mutaciones.....	6
Aplicación de la Mutagénesis en Gramíneas.....	8
Determinación de la Dosis Optima de Irradiación.....	9
Marcadores Moleculares AFLP's.....	11
LITERATURA CITADA.....	14
ESTUDIO 1. DOSIS ÓPTIMA DE IRRADIACIÓN GAMMA PARA INDUCIR MUTAGÉNESIS EN PASTO GARRAPATA ( <i>Eragrostis superba</i> ) .....	22
RESUMEN.....	23
ABSTRACT.....	25
INTRODUCCIÓN.....	27

MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	43
LITERATURA CITADA.....	44
ESTUDIO 2. DOSIS LETAL MEDIA Y REDUCCIÓN MEDIA DEL CRECIMIENTO POR RADIACIÓN GAMMA EN PASTO AFRICANO ( <i>Eragrostis lehmanniana</i> Ness) .....	48
RESUMEN.....	49
ABSTRACT.....	50
INTRODUCCIÓN.....	51
MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	56
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	63
LITERATURA CITADA.....	64
ESTUDIO III. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, NUTRICIONAL, ESTOMÁTICA Y MOLECULAR DE MUTANTES M1 DE PASTO GARRAPATA ( <i>Eragrostis superba</i> ) .....	66
RESUMEN.....	67
ABSTRACT.....	69
INTRODUCCIÓN.....	71
MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	81
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	95
LITERATURA CITADA.....	96

ESTUDIO IV. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y NUTRICIONAL DE MUTANTES M1 DE PASTO AFRICANO ( <i>Eragrostis lehmanniana</i> )..	99
RESUMEN.....	100
ABSTRACT.....	102
INTRODUCCIÓN.....	103
MATERIALES Y MÉTODOS.....	105
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	109
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	121
LITERATURA CITADA.....	122

## LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición bioquímica de 10 mutantes y la variedad Palar (Testigo) de pasto garrapata ( <i>Eragrostis superba</i> ), en etapa de madurez y floración.....	87
2	Densidad y área estomática de 10 mutantes y la variedad Palar (Testigo) de pasto garrapata ( <i>Eragrostis superba</i> ), tanto por haz como por envés.....	90
3	Análisis molecular de varianza (AMOVA) entre dos grupos [3 mutantes vs 3 mutantes y la variedad Palar (Testigo)] de pasto garrapata ( <i>Eragrostis superba</i> ).....	94
4	Composición bioquímica de 6 mutantes y el genotipo común de pasto africano ( <i>Eragrostis lehmanniana</i> ), en etapa de madurez.....	120

## LISTA DE GRÁFICAS

Cuadro		Página
1	Efecto de diferentes dosis de irradiación con CO <sup>60</sup> sobre el porcentaje de germinación (a), índice de velocidad de germinación (b), longitud de plúmula (c) y longitud de radícula (d) de pasto garrapata ( <i>Eragrostis superba</i> ).....	35
2	Efecto de diferentes dosis de irradiación con CO <sup>60</sup> sobre el rendimiento de follaje (a), producción de semilla (b), proporción hoja-tallo (c), índice de concentración de clorofila (d) de pasto garrapata ( <i>Eragrostis superba</i> ).....	36
3	Efecto de diferentes dosis de irradiación con CO <sup>60</sup> sobre el porcentaje de germinación (a), índice de velocidad de germinación (b), longitud de plúmula (c) y longitud de radícula (d) en pasto africano ( <i>Eragrostis lehmanniana</i> ).....	57
4	Efecto de diferentes dosis de irradiación con CO <sup>60</sup> sobre el rendimiento de follaje (a), producción de semilla (b), número de tallos (c), altura de planta (d), diámetro de macollo (e) e índice de concentración de clorofila (f) en pasto africano ( <i>Eragrostis lehmanniana</i> ).....	60
5	Distribución de la diversidad morfológica de 80 mutantes y 10 individuos de la variedad Palar de pasto garrapata ( <i>Eragrostis superba</i> ), evaluados en etapa de floración. Dispersión en función de los dos primeros componentes principales con 10 variables evaluadas.....	82
6	Dendograma del análisis de 10 variables morfológicas evaluadas en etapa de floración para 80 mutantes y 10 individuos de la variedad Palar de pasto garrapata ( <i>Eragrostis superba</i> ), obtenido por método de ligamiento Ward.....	83
7	Distribución de la diversidad morfológica de 80 mutantes y 10 individuos de la variedad Palar de pasto garrapata ( <i>Eragrostis superba</i> ), evaluados en etapa de madurez. ....	85
8	Dendograma del análisis de 10 variables morfológicas evaluadas en etapa de madurez para 80 mutantes y 10 individuos de la variedad Palar de pasto garrapata ( <i>Eragrostis superba</i> ), obtenido por método de ligamiento Ward.....	86
9	Análisis de agrupamiento de 10 mutantes y la variedad Palar (Testigo) de pasto garrapata ( <i>Eragrostis superba</i> ), mediante el coeficiente de Dice y el método de agrupamiento UPGMA, con base en 520 marcadores AFLP generados con cuatro combinaciones de iniciadores. El pasto rosado ( <i>Melinis</i>	93

	<i>repens</i> ) se presenta como grupo externo.....	
10	Distribución de la diversidad morfológica de 70 mutantes y 10 individuos control (provenientes de semilla sin irradiar) de pasto africano ( <i>Eragrostis lehmanniana</i> ), evaluados en etapa de madurez en su primer año de crecimiento. ....	111
11	Dendograma del análisis de 10 variables morfológicas evaluadas para 70 mutantes y 10 individuos control (provenientes de semilla sin irradiar) de pasto africano ( <i>Eragrostis lehmanniana</i> ), evaluados en etapa de madurez en su primer año de crecimiento.....	112
12	Distribución de la diversidad morfológica de 70 mutantes y 10 individuos de control (provenientes de semilla sin irradiar) de pasto africano ( <i>Eragrostis lehmanniana</i> ), evaluados en etapa de madurez en su segundo año de crecimiento. ....	114
13	Dendograma del análisis de 10 variables morfológicas evaluadas para 70 mutantes y 10 individuos control (provenientes de semilla sin irradiar) de pasto africano ( <i>Eragrostis lehmanniana</i> ), evaluados en etapa de madurez en su segundo año de crecimiento.....	115
14	Distribución de la diversidad morfológica de seis mutantes y 10 individuos de control (provenientes de semilla sin irradiar) de pasto africano ( <i>Eragrostis lehmanniana</i> ). ....	118
15	Dendograma del análisis de seis variables bromatológicas evaluadas para seis mutantes y 10 individuos testigo (provenientes de semilla sin irradiar) de pasto africano ( <i>Eragrostis lehmanniana</i> ).....	119

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Las especies africanas del género *Eragrostis*, como africano (*Eragrostis lehmanniana*) y garrapata (*Eragrostis superba*) han sido utilizadas ampliamente en programas de rehabilitación de pastizales realizados en el norte de México y sur de Estados Unidos (McGlone y Huenneke, 2004; Sáenz-Flores *et al.*, 2015). Esto se debe a que presentan mayor rusticidad y capacidad de establecimiento que especies nativas (Hupy *et al.*, 2004; Esqueda *et al.*, 2005). Sin embargo, la utilización del pasto africano implica un riesgo ecológico, ya que puede dispersarse a áreas adyacentes y desplazar la vegetación nativa (Guevara *et al.*, 2007). La dominancia de esta especie hace urgente el plantear esquemas de control o aprovechamiento a través de técnicas para incrementar su valor forrajero, como es el mejoramiento genético. Por otro lado, el pasto garrapata es una especie de buen valor forrajero y capacidad de establecimiento (Mganga *et al.*, 2010; Mganga *et al.*, 2013). No obstante, esta especie puede presentar alto contenido de lignina y baja tolerancia al estrés hídrico, lo cual limita su aprovechamiento (Sanderson *et al.*, 1999; Koech *et al.*, 2015). Por esta razón, el pasto garrapata también puede ser considerado para un programa de mejoramiento.

Los pasto africano y garrapata son especies son introducidas, por lo que en México se cuenta con poca variabilidad genética de ellas. Ante esto, la mutagénesis es una alternativa para su mejoramiento, debido a que ha demostrado ser una técnica efectiva para inducir variabilidad genética (Ambavane *et al.*, 2017). Esta técnica ha sido utilizada de manera exitosa para inducir variabilidad en otros pastos forrajeros como el elefante (*Pennisetum*

*purpureum*) y guinea (*Panicum máxima*) (Pongtongkam *et al.*, 2005; Pongtongkam *et al.*, 2006). Así mismo, esta técnica se ha utilizado con éxito en especie utilizadas para rehabilitar pastizales degradados, como es el pasto buffel (López *et al.*, 2011). Por lo anterior, la mutagénesis puede ser considerada una alternativa viable para el mejoramiento genético de los pastos africano y garrapata. Sin embargo, antes de comenzar un programa de mejoramiento mediante mutagénesis es necesario establecer la dosis óptima de irradiación para inducir mutaciones efectivas. Diversos investigadores concuerdan que en dosis donde muere el 50 % (DL<sub>50</sub>) de los individuos irradiados y donde se reduce el crecimiento en un 50 % (RC<sub>50</sub>), es donde existe mayor probabilidad de producir mutaciones útiles para el mejoramiento genético (Ángeles-Espino *et al.*, 2013; Khalil *et al.*, 2014). No obstante, a la fecha se desconoce la DL50 y la RC50 de los pasto africano y garrapata. Por lo anterior, el objetivo fue generar diversidad mediante el uso de rayos gamma en pasto garrapata y africano, con fines de mejoramiento genético. Los objetivos específicos fueron: 1) determinar la dosis letal media y la reducción media del crecimiento en pasto garrapata y africano, 2) caracterizar la diversidad morfológica, nutricional, estomática y molecular inducida mediante radiación gamma en pasto garrapata y 3) caracterizar la diversidad morfológica y nutricional inducida mediante radiación gamma en pasto africano.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Condición Actual de los Pastizales del Norte de México

En México, el bioma pastizal ocupa alrededor del 23 % de la extensión territorial (INEGI, 2005). Sin embargo, aproximadamente el 95 % de estos pastizales presentan algún grado de deterioro, lo que ha provocado la pérdida de cerca de 1.2 millones de hectáreas de pastizales nativos (PMARP, 2012). En Chihuahua los pastizales ocupan la mayor superficie estatal; no obstante, estudios recientes indican que el 98 % de éstos se encuentran en condición que va de regular a mala (SEMARNAT, 2015). El deterioro de estos ecosistemas se debe principalmente a prácticas antropogénicas como la ganadería y el cambio de uso de suelo. Esto ha provocado baja cobertura vegetal, disminución en la diversidad de especies vegetales claves y grandes extensiones con suelo desnudo en áreas de pastoreo, lo cual se ha reflejado en bajas producciones de forraje y un riesgo en la funcionalidad de estos ecosistemas. Debido a estos problemas se estima que el estado de Chihuahua ha perdido alrededor del 70 % de su producción forrajera y el 50 % de su producción de ganado (PACP-Ch, 2011). Ante esta situación, la resiembra de pastos es una de las alternativas más recomendadas para recuperar a corto plazo estos ecosistemas. Sin embargo, esta práctica debe ser considerada como la última opción, debido a su alto costo y alto nivel de incertidumbre, ya que su éxito está sujeto a las condiciones del clima y precipitación (Moreno *et al.*, 2012).

Otro problema que presentan los pastizales del norte de México es el desplazamiento de especies nativas por parte de especies introducidas que se convirtieron en invasoras. Una de estas especies es el pasto africano

(*Eragrostis lehmanniana*), cuya invasión afecta a los pastizales del norte de México. Algunas de las causas por la que esta especie se ha convertido en invasora son que posee alta tasa de reproducción, alta capacidad de establecimiento y baja aceptación por el ganado (Flanders *et al.*, 2006; Carrillo *et al.*, 2009). No obstante, estas características que la hacen invasora, también la convierten en una alternativa para evitar la erosión del suelo en pastizales degradados con baja cobertura vegetal.

### **Pasto Africano**

El pasto africano es una gramínea C4, perenne, cespitosa y de vida corta nativa de Sudáfrica. Esta especie está catalogada dentro de las invasoras de alto impacto para la biodiversidad (March y Martínez, 2007), lo cual se debe a diferentes factores como su alta producción de semilla y capacidad de establecimiento, resistencia a la defoliación por pastoreo, fuego y sequía (Guevara *et al.*, 2007). Además de lo anterior, la expansión agresiva de esta especie también se atribuye a la dispersión de semillas por el viento y los movimientos de agua en la superficie del suelo. Los pastizales invadidos por pasto africano presentan una gran cantidad de semillas en suelo, las cuales son de tamaño tan pequeño que granívoros como animales, aves e insectos no las consumen (Humphrey, 1994; Titulaer, 2015). Aunado a esto, Abbott y Roundy (2003) mencionan que especies como el pasto africano tienen mayor habilidad para controlar su germinación durante mayor tiempo y asegurar el establecimiento en zonas de precipitación errática. Contrario a lo anterior, especies con alto índice de germinación están sujetas a la muerte de plántulas después de un evento de lluvia. No obstante, la principal causa de que esta

especie sea invasora es debido a que el ganado la consume poco (Chávez *et al.*, 2000). Lo antes mencionado, provee al pasto africano habilidad inusual de invadir y dominar la composición de gramíneas en los pastizales donde se encuentra. Sin embargo, estas características han causado que esta gramínea se utilice ampliamente en programas de rehabilitación de pastizales y en zonas donde la vegetación nativa ha desaparecido (Hupy *et al.*, 2004; McGlone y Huenneke, 2004). El pasto africano es una especie principalmente tetraploide ( $2n = 4x = 40$ ). Sin embargo, se han reportado algunas accesiones triploides ( $2n = 3x = 30$ ) y diploides ( $2n = 2x = 20$ ), donde las accesiones tetraploides se caracterizan por ser de reproducción apomíctica (Voigt *et al.*, 1992).

### **Pasto Garrapata**

El pasto garrapata [*Eragrostis superba* (Peyr.)] es una gramínea perenne originaria del sur de África. La época de floración es entre los meses de abril y agosto. Las plantas de esta especie pueden alcanzar una altura de hasta 100 cm y presentar hojas de hasta 8.0 mm de ancho. Esta especie es considerada como un forraje de buena calidad, que alcanza hasta un 14 % de proteína cruda en época de crecimiento (Beltrán *et al.*, 2009; Morales y Melgoza, 2010). Además, presenta alta capacidad de establecimiento, producción de forraje, retiene suelo e infiltrar agua (Mganga *et al.*, 2010; Mganga *et al.*, 2013). Por estas razones, el pasto garrapata es considerado como una de las gramíneas con mayor potencial para ser utilizadas en programas de restauración (Manyeki *et al.*, 2015; Sáenz-Flores *et al.*, 2015). No obstante, esta especie puede presentar menor contenido de proteína y mayor contenido de lignina que otros pastos utilizados a nivel mundial, como el pasto buffel (*Pennisetum ciliare*) y

Klein (*Panicum coloratum*) (Sanderson *et al.*, 1999). Así mismo, otro problema que presenta es su baja tolerancia al estrés hídrico y eficiencia en el uso del agua (Kipchirchir *et al.*, 2015; Koech *et al.*, 2015). Debido a esto, puede ser considerada para un programa de mejoramiento genético.

### **Inducción de Mutaciones**

La evolución se basa en cuatro procesos para manifestar diferenciación individual: selección natural, deriva genética, flujo genético y las mutaciones. Este último es el principal factor para la evolución ya que genera nuevas estructuras genéticas de manera espontánea que son transmisibles a las siguientes generaciones. Este fenómeno es también conocido como mutagénesis y la respuesta de las nuevas generaciones son esperadas al azar (Pio-Beltrán, 2005; Ruiz *et al.*, 2010; Rosenberg *et al.*, 2012). Una mutación se puede dar mediante recombinación, duplicación o delección en una o varias secciones del ADN. Además, puede presentarse en secuencias largas, secuencias pequeñas e incluso en un par de nucleótidos (Bonner, 1988; Gutiérrez *et al.*, 2003; Livnat, 2013). Estos procesos mutagénicos que ocurren en la naturaleza pueden ser inducidos artificialmente mediante diferentes agentes, los cuales se pueden dividir en químicos y físicos. Entre los químicos se encuentran los análogos de bases, antibióticos, agentes alquilantes, entre otros. Mientras que los agentes físicos más comunes son los rayos X y gama, neutrones, protones y partículas alfa y beta (Podevin *et al.*, 2013). Las modificaciones genéticas producidas por los mutágenos físicos son debidas a la ionización y la excitación de la molécula de ADN. Además, estos tipos de irradiación pueden estimular la actividad metabólica de las plantas, como la

respiración, la glicólisis, la actividad de la enzima catalasa, y la fosforilación oxidativa (Rekha y Langer, 2007). Las radiaciones ionizantes han sido ampliamente utilizadas para la obtención de mutantes (Miřochova *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Hung y Johnson, 2008). Según la FAO/IAEA, de las 434 variedades de arroz lanzadas al mercado, 225 fueron inducidas por rayos gamma, 16 con rayos X y el resto con otras fuentes de radiación (Ahloowalia *et al.*, 2004).

La radiación gamma es de naturaleza similar a la luz visible o a las ondas de radio y se clasifica como ionizante por tener cargas eléctricas positivas o negativas que facilitan la penetración profunda dentro de ciertos materiales. En este tipo de radiación la producen isótopos como Cesio, Cobalto, Radio, Uranio, Torio, Radón, entre otros. Estos isótopos tienen la capacidad de producir ondas cortas (10 X 10-12 m) y energía efectiva para entrar en contacto con el ADN y provocar cambios estructurales (Weiner y Matthews, 2003, González y Rabin, 2011). El efecto ocasionado por el agente mutagénico es proporcional a la energía absorbida por un tejido en particular, debido a esto el poder de penetración puede variar desde fracciones de milímetros hasta algunos centímetros (Gutiérrez *et al.*, 2003).

La mutagénesis provocada en plantas se comenzó a utilizar a principios de 1900 y a partir de 1927 se intensificó. No obstante, el blanco del mejoramiento siempre han sido cultivos comerciales como arroz, cebada, maíz, trigo entre otros (Delgado de la Flor, 1970; Podevin *et al.*, 2013). Especies como *Arabidopsis thaliana* y el arroz (*Oryza sativa*) han sido ampliamente estudiadas por presentar los genomas más pequeños de las plantas y esto ha permitido

que las mutaciones puedan ser dirigidas en estas especies (Thole *et al.*, 2011; Xia-Yun *et al.*, 2011).

### **Aplicación de la Mutagénesis en Gramíneas**

Por décadas la inducción de mutagénesis se ha utilizado con éxito como herramienta en el mejoramiento genético vegetal. Un elevado número de variedades comerciales son consecuencia directa de un proceso de mutagénesis artificial mediante agentes físicos o químicos (López *et al.*, 2013; Melgarejo *et al.*, 2014). En gramíneas esta técnica se ha practicado en especies utilizadas para césped como pasto bermuda (*Cynodon dactylon*). En 1997 mediante la irradiación con  $\text{Co}^{60}$  se produjo la variedad TifEagle de pasto bermuda. Esta variedad se caracteriza por poseer hojas con lámina muy fina, densidad de tallos extremadamente alta y gran resistencia al pisoteo, por lo que es sumamente utilizada en campos de golf (Hanna *et al.*, 1999). De igual manera, en investigaciones recientes se ha logrado producir variedades de talla ultra baja y de mayor resistencia a estrés hídrico (Lu *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2009). Otra especie cespitosa en la que ha empleado la mutagénesis es el pasto San Agustín (*Stenotaphrum secundatum*), donde se obtuvieron diferencias morfológicas al irradiar estolones a dosis entre 10 y 100 Gy (Li *et al.*, 2010).

El mejoramiento genético a través de la mutagénesis también se ha implementado en gramíneas destinadas para el consumo humano y de suma importancia para el Sur de Asia y África, como son el finger millet (*Eleusine coracana*) y el mijo perla (*Pennisetum typhoides*) (Ambli y Mullainathan, 2014;

Ambavane *et al.*, 2015). Así mismo, se ha implementado en especies forrajeras como *Pennisetum purpureum* y *Panicum máxima*, donde se obtuvieron diferencias morfológicas y en resistencia al estrés salino con dosis desde 10 hasta 50 Gy y 10 hasta 30 Gy, respectivamente (Pongtongkam *et al.*, 2005; Pongtongkam *et al.*, 2006). En un estudio con variedades de sorgo sudan (*Sorghum sudanense*), Golublnova y Gecheff (2011) encontraron que la radiación produce un gran número de aberraciones cromosómicas conforme se aumenta la dosis de irradiación, lo cual demuestra la posibilidad de producir modificaciones genómicas a través de la mutagénesis. Los pastizales del norte de México poseen gran variedad de gramíneas nativas e introducidas que pueden ser utilizadas para rehabilitación de pastizales degradados. Sin embargo, existe pocas variedades nacionales que estén adaptadas a las condiciones locales. Además, ambos tipos de especies presentan características con potencial para ser mejoradas; las especies introducidas presentan bajo valor forrajero y las nativas baja capacidad de establecimiento. Ante esto, la mutagénesis puede ser una alternativa viable para el mejoramiento de gramíneas destinadas para revegetación de áreas degradadas. Esto debida a que, como se menciona anteriormente, esta técnica ha demostrado ser efectiva para inducir modificaciones genéticas y fenotípicas en gramíneas forrajeras.

### **Determinación de la Dosis Optima de Irradiación**

Las dosis con mayor probabilidad de producir mutaciones benéficas son las medias (Hernández-Muñoz *et al.*, 2017). Esto se debe a que se ha observado que con dosis bajas de irradiación los impactos en el genoma son

mínimos y difícilmente se reflejan en cambios fenotípicos, mientras que con dosis altas el genoma sufre múltiples impactos que regularmente producen aberraciones o cambios negativos (Songsri *et al.*, 2011; Thole *et al.*, 2011). Además, las dosis bajas de irradiación pueden inducir una radioestimulación que se expresa en un incremento en la división celular, actividad enzimática o cantidad de pigmentos fotosintéticos. En contraste, dosis altas de irradiación pueden producir daños físicos en los organelos o químicos en las células como la destrucción de enzimas y hormonas, entre otros (Minissi *et al.*, 2013; Chandrashekar, 2014). Por lo anterior, antes de iniciar un programa de mejoramiento genético por mutagénesis se debe establecer cual es una dosis media de irradiación, lo cual también se conoce como la dosis óptima de irradiación. Diversos investigadores concuerdan que la dosis donde muere el 50 % ( $DL_{50}$ ) de los individuos irradiados, es donde existe mayor probabilidad de producir mutaciones útiles en un programa de mejoramiento genético (Golubinova y Gecheff, 2011; Ángeles-Espino, 2013). Mientras que otros investigadores señalan que otra dosis con alta probabilidad de producir mutaciones efectivas es donde se reduce el crecimiento en 50 % ( $RG_{50}$ ) (Akgüm y Tosun, 2004; Khalil *et al.*, 2014). Por esta razón, la  $DL_{50}$  y  $RC_{50}$  son parámetros utilizados para determinar la dosis óptima de irradiación para inducir mutaciones efectivas en programas de mejoramiento genético vegetal. No obstante, estos parámetros son únicos para cada especie, genotipo e incluso el tipo de tejido que se irradia (Hernández-Muñoz *et al.*, 2017). Debido a esto, previo a un programa de mejoramiento genético se debe establecer la  $DL_{50}$  y

RC<sub>50</sub>, de acuerdo a la especie que se desea mejorar y el tipo de tejido que se va a utilizar para este propósito.

La DL<sub>50</sub> ha sido determinada en diferentes especies de gramíneas. En *Pennisetum glaucum*, Ousmane *et al.* (2013) encontraron la DL<sub>50</sub> a los 669.3 Gy, mediante irradiación gamma. En otro estudio realizado en *Pennisetum typhoides*, Ambli y Mullainathan (2014) encontraron la DL<sub>50</sub> a los 200 Gy. En arroz, Harding *et al.* (2012) al exponer 13 variedades a radiación gamma, encontraron que la DL<sub>50</sub> varió de 345 y 423 Gy de acuerdo a la variedad. De manera similar, Ramchander *et al.* (2015) encontraron la DL<sub>50</sub> en dos variedades de arroz en 288 y 354 Gy; mientras que, en esta misma especie, Rajarajan *et al.* (2016) encontraron la DL<sub>50</sub> a 229 Gy. En un estudio realizado en pasto sudan (*Sorghum sudanense*), Golubinova y Gecheff (2011) encontraron que la DL<sub>50</sub> varió entre 307 y 342 Gy de acuerdo a la variedad. Por otro lado, La RC<sub>50</sub> también ha sido determinada en algunas especies de gramíneas. Por ejemplo, Ambavane *et al.* (2014) encontraron la RC<sub>50</sub> en *Eleusine coracana* a los 500 Gy, a través de la longitud de plúmula y radícula. Así mismo, Talebi y Talebi (2012) encontraron la RC<sub>50</sub> en arroz a los 450 Gy, por medio de las mismas variables. Lo anterior demuestra como la DL<sub>50</sub> y RC<sub>50</sub> pueden por especie, por lo que es de suma importancia que se determine de acuerdo a la especie que se quiere mejorar genéticamente.

### **Marcadores Moleculares AFLP's**

Desde sus comienzos, el mejoramiento vegetal se ha llevado a cabo mediante la selección de genotipos superiores a través del reconocimiento de fenotipos sobresalientes. No obstante, clasificar materiales como genotipos

diferenciados por medio de caracteres fenotípicos puede ser riesgoso. Esto debido a que se puede confundir efectos medioambientales con genéticos. Ante esto se ha optado por utilizar las técnicas de análisis de ADN para diferenciar correctamente entre genotipos. En la actualidad, el análisis y clasificación de nuevos genotipos puede llevarse a cabo mediante el uso de marcadores moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Polymerase Chain Reaction). El uso de estos marcadores permite estimar diferencias genéticas sin la complicación de las interacciones genotipo-ambiente (Arnao *et al.*, 2008). Uno de los marcadores moleculares más utilizados son los Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP; Amplification Fragment Length Polymorphism). Esta técnica fue desarrollada por Vos *et al.* (1995) y se basa en la amplificación selectiva de un subconjunto de fragmentos de restricción, que se obtienen mediante la digestión del ADN genómico con dos endonucleasas de restricción (Arnao *et al.*, 2008). Los polimorfismos pueden ser detectados gracias al uso de bases selectivas adyacentes al sitio de restricción, que producen fragmentos de diferente longitud que pueden separarse mediante electroforesis.

Los marcadores AFLP's han sido catalogados como una poderosa herramienta dentro de la genética vegetal. Esto debido a que son capaces de detectar diversidad a nivel genotipo, lo cual permite utilizarlos tanto para estudios de diversidad como para establecer huellas genómicas, para la protección de derechos de obtentor (Ovesna *et al.*, 2002). Algunas de las ventajas de los AFLP's son que permiten examinar un gran número de fragmentos de ADN en un solo ensayo, detectan un alto número de

polimorfismos, tienen alta reproducibilidad, no se requiere de conocer la secuencia o la distribución de los marcadores en el genoma (Powell *et al.*, 1996; Coart *et al.*, 2002). Por estas razones, los marcadores AFLP han sido utilizados en estudios realizados en diversas especies incluidas gramíneas claves en los agostaderos del norte de México, como son los pastos banderita (*Bouteloua curtipendula*), punta blanca (*Digitaria californica*), temprano (*Setaria macrostachya*), entre otros (Morales *et al.*, 2012; Morales *et al.*, 2015; Morales *et al.*, 2016).

## LITERATURA CITADA

- Abbott, L. B. y B. R. Roundy. 2003. Available water influences field germination and recruitment of seeded grasses. *J. Range Manage.* 56:56-64.
- Aguado-Santacruz, G. A., N. E. Leyva-López, K. I. Pérez-Márquez, E. García-Moya, J. T. Arredondo-Moreno y J. P. Martínez-Soriano. 2004. Genetic variability of *Bouteloua gracilis* populations differing in forage production at the southernmost part of the North American *Graminetum*. *Plant Ecol.* 170:287-299.
- Ahloowalia, B. S., M. Maluszynski y K. Nichterlein. 2004. Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica* 135:187-204.
- Akgüm, I. y M. Tosun. 2004. Agricultural and cytological characteristics of M1 perennial rye (*Secale montanum* Guss.) as affected by the application of different doses of gamma rays. *PJBS.* 7:827-833.
- Ambavane, A. R., D. M. Patil y S. V. Savardekar. 2017. Effect of gamma radiation on germination and seedling parameter of finger millet (*Eleusine coracana* L. Gaertn.). *Int. J. Chem. Stud.* 5:1978-1982
- Ambavane, A. R., S. V. Sawardekar, S. A. Sawantdesai y N. B. Gokhale. 2015. Studies on mutagenic effectiveness and efficiency of gamma rays and its effect on quantitative traits in finger millet (*Eleusine coracana* L. Gaertn.). *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 8:120-125.
- Ambli, K. y L. Mullainathan. 2014. Effect of gamma rays and ems on seed germination and seed characters in pearl millet (*Pennisetum typhoides* (Burn.) Stapf. Var. CO(Cu)-9. *J. Chem. Bio. Phy. Sci. Sec.* 4:3345-3349.
- Ángeles-Espino, A., A. J. Valencia-Botín, G. Virgen-Calleros, C. Ramírez-Serrano, L. Paredes-Gutiérrez y S. Hurtado-De la Peña. 2013. Determinación de la dosis letal (DL<sub>50</sub>) con Co<sup>60</sup> en vitroplántulas de *Agave tequilana* var. Azul. *Rev. Fitotec. Mex.* 36:381-386.
- Arnao, E. A., Y. Jayaro, P. Hinrichsen, C. Marín y L. Pérez-Almeida. 2008. Marcadores AFLP en la evaluación de la diversidad genética de variedades y líneas élites de arroz en Venezuela. *Interciencia.* 33:359-364.
- Beltrán, L. S., C. O. Loredó, C. A. D. García, J. A. A. Hernández, J. M. Urrutia, H. G. V. Gámez, L. A. E. González y T. Núñez. 2009. Llorón imperial y garrapata hércules nuevas variedades de pastos para el altiplano de San Luis Potosí. S. E. San Luis. INIFAP-SAGARPA: Folleto Técnico. 36:1-39.
- Bonner, J. T. 1988. The evolution of complexity by means of natural selection. 1a ed. Princeton University Press. New Jersey, E.U.A.

- Chávez, S. A. H., A. G. Pérez y E. J. G. Sánchez. 2000. Intensidad de pastoreo y esquema de utilización en la selección de la dieta del ganado bovino durante la sequía. *Téc. Pecu. Méx.* 38:19-34.
- Chen, C., S. Lu, Y. Chen, Z. Wang, Y. Niu y Z. Gu. 2009. A gamma-ray-induced dwarf mutant from seeded bermudagrass and its physiological responses to drought stress. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 134:22–30.
- Coart, E., V. Lamote, M. De Loose, V. Bockstaele y I. Roldán. 2002. AFLP markers demonstrate local genetic differentiation between two indigenous oak species (*Quercus robur* L. and *Quercus petraea*) in Flemish population. *Theor. Appl. Genet.* 105:431-439.
- Delgado de la Flor, B. L. F. 1970. Frecuencia de mutaciones inducidas por radiación Gamma y metanosulfanato de etilo en la semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis de Maestría. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA. Turrialba. Costa Rica.
- Echenique, V., S. Pessino, M. Díaz, J. P. Selva, G. Luciani, D. Zappacosta, G. Cervigni M. Meier, I. Garbus, S. Cardone, R. Miranda y G. Spangenberg. 2008. Aportes de la biotecnología al mejoramiento del pasto llorón (*Eragrostis curvula*). *Rev. Arg. Prod. Anim.* 28:147-164.
- Esqueda, C. M. H., A. C. Melgoza, M. C. Sosa, R. R. Carillo y J. C. Jiménez. 2005. Emergencia y sobrevivencia de gramíneas con diferentes secuencias de humedad/sequía en tres tipos de suelo. *Téc. Pecu. Méx.* 43:101-115.
- Flanders, A., W. Kuvlesky, D. Ruthven, R. Zaiglin, R. Bingham, T. Fulbright, F. Hernández y L. Brennan. 2006. Effects of invasive exotic grasses on South Texas rangeland breeding birds. *Auk.* 123:171-182.
- Franco, T. L. y R. Hidalgo. 2003. Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI). Boletín técnico no. 8. Cali, Colombia.
- Garduño, V. S., A. R. C. Quero, D. Bonnett, R. H. Herrera, A. H. Pérez y A. G. Hernández. 2015. Nivel de ploidía en poblaciones de *Leptochloa dubia* (Kunth) Nees nativas de México. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 3:539-548.
- Golublnova, I. y K. Gecheff. 2011. M1 cytogenetic and physiological effects of gamma-rays in sudan grass (*Sorghum sudanense* (piper.) stapf). *Bulg. J. Agric. Sci.* 17:417-423.
- González, S. G. y L. C. Rabin. 2011. Para entender las radiaciones. Energía nuclear, medicina, industria. 1ª Ed. Facultad de Ciencias Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

- Guevara, J. C., R. O. Estevez y R. C. Stas. 2007. Influencia de la introducción de *Eragrostis lehmanniana* sobre la comunidad de gramíneas en la Reserva de Ñacuñán (Mendoza, Argentina). Rev. FCA UNCuyo. 1:1-7.
- Gutiérrez, M. A., F. R. Santacruz, J. L. P. Cabrera y B. G. Rodríguez. 2003. Mejoramiento genético vegetal *in vitro*. E-Gnosis. 1:2-19.
- Hanna, W. y E. Elsner. 1999. Registration of "TifEagle" bermudagrass. Crop Sci. 39:1258.
- Harding, S. S., S. D. Johnson, D. R. Taylor, C. A. Dixon y M. Y. Turay. 2012. Effect of gamma rays on seed germination, seedling height, survival percentage and tiller production in some rice varieties cultivated in Sierra Leone. Am. J. Exp. Agric. 2:247-255.
- Hernández-Muñoz, S., M. E. Pedraza-Santos, P. A. López, E. De La Cruz-Torres, S. P. Fernández-Pavía, A. Martínez-Palacios y M. Martínez-Trujillo. 2017. Determinación de la DL<sub>50</sub> y GR<sub>50</sub> con rayos gamma (<sup>60</sup>Co) en protocormos de *Laelia autumnalis* *in vitro*. Agrociencia. 51:507-524.
- Humphrey, N. 1994. History, status and management of Lehman lovegrass. Rangelands 16:205-206.
- Hung, C. D. y K. Johnson. 2008. Effects of ionizing radiation on the growth and allyl isothiocyanate accumulation of *Wasabia japonica* *in vitro* and *ex vitro*. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 44:51-58.
- Hupy, C. M., W. G. Whitford y E. C. Jackson. 2004. The effect of dominance by an alien grass species, Lehmann lovegrass, *Eragrostis lehmanniana*, on faunalpedoturbation patterns in North American Desert grasslands. J. Arid Environ. 58:321-334.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2005. Carta de uso del suelo y vegetación. Serie iii. México.
- Khalil, S. A., R. Zamir, y N. Ahmad. 2014. Effect of different propagation techniques and gamma irradiation on major steviol glycoside's content in *Stevia rebaudiana*. JAPS 24: 1743-1751.
- Kipchirchir, K. O., K. R. Ngugi, M. S. Mwangi, K. G. Njomo y W. Raphael. 2015. Water stress tolerance of six rangeland grasses in the Kenyan semi-arid rangelands. AJAF. 3:222-229.
- Koech, O. K., R. N. Kinuthia, G. N. Karuku, S. M. Mureithi y R. Wanjogu. 2015. Water use efficiency of six rangeland grasses under varied soil moisture content levels in the arid Tana River County, Kenya. Afr. J. Environ. Sci. Technol. 9:632-640.

- Li, R., A. H. Bruneau y R. Qu. 2010. Morphological mutants of St. Augustinegrass induced by gamma ray irradiation. *Plant Breed.* 129:412-416.
- Livnat, A. 2013. Interaction-based evolution: how natural selection and nonrandom mutation work together. *Biology Direct.* 8:1-53.
- López, M., M. C. González, L. Hernández, W. Ramírez, R. Medina y J. M. Pérez. 2013. Estado del conocimiento del mejoramiento genético de cespitosas. *Pastos y Forrajes* 36:278-287.
- Lu, G., X. Zhang, Y. Zou, Q. Zou, X. Xiang y J. Cao. 2007. Effect of radiation on regeneration of Chinese narcissus and analysis of genetic variation with AFLP and RAPD markers. *Plant. Cell. Tiss. Org.* 88:319-327.
- Lu, S., Z. Wang, S. Lu, Y. Niu, Y. Chen, H. Chen, Z. Fan, J. Lin, K. Yan, Z. Guo H. Li. 2009. Gamma-ray radiation induced dwarf mutants of turf-type bermudagrass. *J. Plant Breed.* 128:205-209.
- Lu, S., Z. Wang, Y. Niu y Z. Guo. 2008. Antioxidant responses of radiation-induced dwarf mutants of bermudagrass to drought stress. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 133:360–366.
- Manyeki, J. K., E. C. Kirwa, P. B. Ogillo, W. N. Mnene, R. Kimitei, A. Mosu y R. Ngetich. 2015. Economic analysis of natural pasture rehabilitation through reseeding in the southern rangelands of Kenya. *Livestock Res. Rural Dev.* 27:49-61.
- March, M. I. J. y J. M. Martínez. 2007. Especies invasoras de alto impacto a la biodiversidad: Prioridades en México. IMTA-Conabio-GECI Arid América-The Nature Conservancy.
- McGlone, M. C. y F. L. Huenneke. 2004. The impact of a prescribed burn on introduced Lehmann lovegrass versus native vegetation in the northern Chihuahuan Desert. *J. Arid Environ.* 57:297-310.
- Melgarejo, P., I. Romagosa y N. Duran. 2014. Biotecnología agrícola. *Arbor.* 190: a152. En: <http://dx.doi.org/10.3989/arbor.2014.768n4006>. Consultado 25 Marzo 2016.
- Melgoza, C. A., M. I. Valladares, R. Mata y C. Pinedo. 2014. Biología del pasto rosado *Melinis repens* e implicaciones para su aprovechamiento o control. *Revisión. Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 5:429-442.
- Mganga, K. Z., N. K. R. Musimba, D. M. Nyariki, M. M. Nyangito y A. W. Mwangómbe. 2013. The choice of grass species to combat desertification in semi-arid Kenyan rangelands is greatly influenced by their forage value for livestock. *Grass Forage Sci.* 70:161-167.

- Mganga, K. Z., N. K. R. Musimba, D. M. Nyariki, M. M. Nyangito, A. W. Mwang'ombe, W. N. Ekaya, D. Clavel, J. Francis, R. Kaufmann, J. Verhagen y W. M. Muiru. 2010. Dry matter yields and hydrological properties of three perennial grasses of a semi-arid environment in East Africa. *Afr. J. Plant Sci.* 4:138–44.
- Mlčochova, L., O. Chloupek, R. Uptmoor, F. Ordon y W. Friedt. 2004. Molecular analysis of the barley cv. Valticky and its X-ray-derived semidwarf-mutant Diamant. *Plant Breed.* 123:421-427.
- Morales, N. C. R., C. A. Avendaño, A. C. Melgoza, K. D. V. Gil Vega, A. C. Quero, P. G. Jurado y M. S. Martínez. 2016. Caracterización morfológica y molecular de poblaciones de pasto banderita (*Bouteloua curtipendula*) en Chihuahua, México. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 7:455-469.
- Morales, N. C. R., A. C. Melgoza, P. G. Jurado, M. S. Martínez y C. A. Avendaño. 2012. Caracterización fenotípica y molecular de poblaciones de zacate punta blanca (*Digitaria californica* (Benth.) Henr.). *Rev. Mex. Pecu.* 3:171-184.
- Morales, N. C. R., C. E. Vélez, C. Pinedo y O. G. Gutiérrez. 2014. Características del zacate rosado (*Melinis repens*) y su comportamiento como especie invasora en pastizales de Chihuahua. Manual técnico N° 12. Universidad Autónoma de Chihuahua. Facultad de Zootecnia y Ecología. Chihuahua, Chihuahua, México.
- Morales, N. C. y A. Melgoza. 2010. Características productivas de zacates forrajeros importantes en el norte de México. S. E. La Campana-Madera. INIFAP-SAGARPA. Folleto Técnico. 28:1-51.
- Morales, N. C., L. M. Pérez, A. C. Castillo, M. S. Martínez, S. G. Arévalo, Q. C. Rascón y P. G. Jurado. 2009. Análisis morfológico de la diversidad del pasto navajita [*Bouteloua gracilis* (Willd. ex Kunth) Lag. ex Steud.], en Chihuahua, México. *Téc. Pecu. Méx.* 47:245-256.
- Morales, N. C., O. Rivero-Hernández, A. C. Castillo, P. G. Jurado y M. S. Martínez. 2013. Caracterización morfológica y molecular de *Leptochloa dubia* (Poaceae) en Chihuahua, México. *Polibotánica* 36:79-94.
- Morales-Nieto, C. R., A. Quero-Carrillo, J. Pérez-Pérez, A. Hernández-Garay y O. LeBlanc. 2008. Caracterización morfológica de poblaciones nativas de pasto banderita [*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.] en México. *Agrociencia* 42:767-775.
- Morales-Nieto, C. R., C. Avendaño-Arrazate, A. Melgoza-Castillo, M. Martínez-Salvador y P. Jurado-Guerra. 2015. Caracterización morfológica y molecular de poblaciones de zacate temprano (*Setaria macrostachya* Kunth) en Chihuahua, México. *Phyton* 84:190-200.

- Morela, F., V. González y L. Castro. 2002. Efecto de la radiación Gamma sobre la diferenciación de plantas de caña de azúcar a partir de callos. *Agron. Trop.* 52:311-323.
- Moreno, G. B., E. García, Q. C. Rascón y G. S. Aguado. 2012. Crecimiento y establecimiento de plántulas de *Bouteloua gracilis* (Kunth) Leg. ex Griffithis y *Eragrostis curvula* var. conferta Stapf bajo un régimen simulado de lluvia *Rev. Fitotec. Mex.* 35:187-7380.
- Ousmane, S. D., W. Elegba y K. Danso. 2013. Radio-sensibility of pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) and cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seeds germination and seedling growth. *IJIAS* 4:665-671.
- Ovesna, J., K. Polakova y L. Leisová. 2002. DNA analyses and their applications in plant breeding. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 38:29-40.
- PACP-Ch. 2011. Plan de acción para la conservación y uso sustentable de los Pastizales del desierto Chihuahuense en el estado de Chihuahua 2011-2016. En: [http://www.biodiversidad.gob.mx/ecosistemas/pdf/PACP\\_chihuahua.pdf](http://www.biodiversidad.gob.mx/ecosistemas/pdf/PACP_chihuahua.pdf). Consultado 30 Noviembre 2017.
- Palombi, M. A., B. Lombardo y E. Caboni. 2007. *In vitro* regeneration of wild pear (*Pyrus pyraeaster Burgsd*) clones tolerant to Fe-chlorosis and somaclonal variation analysis by RAPD markers. *Plant Cell Rep.* 26: 489-496.
- Pinedo, A. C., N. S. Q. Hernández, A. Melgoza, M. V. Rentería, C. S. V. Vélez, C. N. Morales, R. M. Quintana, E. E. Santellano y E. Esparza. 2013. Diagnóstico Actual y Sustentabilidad de los Pastizales del estado de Chihuahua ante el Cambio Climático. Cuerpo Académico de Recursos Naturales y Ecología (UACH-CA16). Facultad de Zootecnia y Ecología, Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, México.
- Pio-Beltrán. 2005. La ingeniería genética de las plantas cultivadas, clave para mejorar la nutrición y la salud humana. *An. Real Acad. Nac. Farm.* 71:587-608.
- PMARP. 2012. Plan Maestro de la alianza regional para la conservación de los pastizales del Desierto Chihuahuense. En: [https://birdconservancy.org/wp-content/uploads/2016/10/Master\\_Plan\\_Chihuahua\\_jan2012.pdf](https://birdconservancy.org/wp-content/uploads/2016/10/Master_Plan_Chihuahua_jan2012.pdf). Consultado 30 Noviembre 2017.
- Podevin, N., H. V. Davis, F. Hartung, F. Nogué y J. M. Casacuberta. 2013. Site-directed nucleases: a paradigm shift in predictable, knowledge-based plant breeding. *Trends Biotechnol.* 31:375-383.

- Pongtongkam, P., S. Nilratnisakorn, S. Piyachoknakul, A. Thongpan, J. Aranananth, K. Kowitwanich y S. Tadsri. 2005. Inducing salt tolerance in purple guinea grass (*Panicum maximum* TD58) via gamma irradiation and tissue culture. *Nat. Sci.* 39:681-688.
- Pongtongkam, P., S. Peyachoknagul, J. Arananant, A. Thongpan y S. Tudsri. 2006. Production of salt tolerance dwarf napier grass (*Pennisetum purpureum* cv. Mott) using tissue culture and gamma irradiation. *Nat. Sci.* 40:625-633
- Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey y A. Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breeding.* 2:225.
- Rajarajan, D., R. Saraswathi y D. Sassikumar. 2016. Determination of lethal dose and effect of gamma ray on germination percentage and seedling parameters in ADT (R) 47 rice. *IJABR.* 6:328-332.
- Ramchander, S., R. Ushakumari y M. A. Pillai. 2015. Lethal dose fixation and sensitivity of rice varieties to gamma radiation. *IJAR.* 49:24-31.
- Rekha, K. y A. Langer. 2007. Induction and assessment of morphobiochemical mutants in *Artemisia pallens* Bess. *Genet. Resour. Crop. Ev.* 54:437-443.
- Rosenberg, S. M., C. Shee, R. L. Frich y P. J. Hastings. 2012. Stress-induced mutation via DNA breaks in *Escherichia coli*: A molecular mechanism with implications for evolution and medicine. *Bioessays.* 34:885–892.
- Ruiz, E., K. balboa, M. A. Negritto, C. M. Baeza, G. Fuentes y V. Briceño. 2010. Variabilidad genética y morfológica y estructuración poblacional en *Alstroemeria hookeri* subsp. *hookeri* (*Alstroemeriaceae*), endémica de Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 83:605-616.
- Sáenz-Flores, E., R. A. Saucedo-Terán, C. R. Morales-Nieto, P. Jurado-guerra, C. R. Lara-Macías, A. Melgoza-Castillo y J. A. Ortega-Gutiérrez. 2015. Producción y calidad de semilla de pastos forrajeros como respuesta a la fertilización en Aldama, Chihuahua. *Tecnociencia* 9:111-119.
- Sanderson, M. A., P. Voigt y R. M. Jones. 1999. Yield and quality of warm-season grasses in central Texas. *J. Range Manage.* 52:145-150.
- SEMARNAT (Secretaria de medio ambiente y recursos naturales). 2015. Informe de la situación del medio ambiente en México. Compendio de estadísticas ambientales. México.
- Songsri, P., B Suriharn, J. Sanitchon, S. Srisawangwong y T. Kesmla. 2011. Effects of Gamma radiation on germination and growth characteristics of physic nut (*Jatropha curcas* L.). *J. Biol. Sci.* 11:268-274.

- Talebi, A. B. y A. B. Talebi. 2012. Radiosensitivity study for identifying the lethal dose in MR219 (*Oryza sativa* L. spp. *Indica* cv. MR219). IJASRT. 2:63-67.
- Tavitas, F. L. y A. L. Hernández. 2007. Fundamentos para la caracterización varietal de arroz (*Oryza sativa* L.) en México. INIFAP. Publicación especial no. 43. Morelos, México.
- Thole, V., A. Peraldi, B. Worland, P. Nicholson, J. H. Doonan y P. Vain. 2011. T-DNA mutagenesis in *Brachypodium distachyon*. Journal of Experimental Botany. 10:1-10.
- Titulaer, M. 2015. Selección de semillas y dieta invernal de aves de pastizal en el norte de México. Disertación. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, Chih. México.
- Voigt, P. W., B. L. Burson y R. A. Sherman. 1992. Mode of reproduction in cytotypes of lehmann lovegrass. 32:118-121.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper y M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23:4407-4414.
- Wang, Y., F. Wang, H. Zhai y Q. Liu. 2007. Production of a useful mutant by chronic irradiation in sweetpotato. Sci. Hort. 111:173-178.
- Wang, Z. Y., Y. Ge, M. Scott y G. Spangenberg. 2004. Viability and longevity of pollen from transgenic and nontransgenic tall fescue (*Festuca arundinacea*) (Poaceae) plants. Am. J. Bot. 91:523-530.
- Weiner, R. F. y R. A. Matthews. 2003. Environmental engineering. 4a Ed. Butterworth-Heineman. Oxford, UK.
- Xia-Yun, J., S. Cheng-Fei, Z. Quan-Gen y Z. Shu-Ming. 2011. ENU-oMutagenesis in Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) by Treating Mature Sperm. PLoS ONE. 6:1-8.

**ESTUDIO 1. DOSIS ÓPTIMA DE IRRADIACIÓN GAMMA PARA INDUCIR  
MUTAGÉNESIS EN PASTO GARRAPATA (*Eragrostis superba*)**

Alan Álvarez-Holguín<sup>1</sup>, Carlos Raúl Morales-Nieto<sup>1</sup>, Carlos Hugo Avendaño-Arrazate<sup>2</sup>, Raúl Corrales-Lerma<sup>1</sup>, Federico Villarreal-Guerrero<sup>1</sup>, Eduardo Santellano-Estrada<sup>1</sup>, Yaudiel Gómez-Simuta<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua.

<sup>2</sup>Instituto del Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Campo Experimental Rosario Izapa. Tuxtla Chico, Chiapas. México.

<sup>3</sup>Departamento de Irradiación; complejo MOSCAMED-MOSCAFRUT de SENASICA, Metapa de Domínguez, Chiapas.

## RESUMEN

### DOSIS ÓPTIMA DE IRRADIACIÓN GAMMA PARA INDUCIR MUTAGÉNESIS EN PASTO GARRAPATA (*Eragrostis superba*)

POR:

M. C. ALAN ÁLVAREZ HOLGUÍN

Maestría en Ciencias en Producción Animal

Secretaría de Investigación y Posgrado

Facultad de Zootecnia y Ecología

Universidad Autónoma de Chihuahua

Presidente: Dr. Carlos Raúl Morales Nieto

La radiación gamma puede ser utilizada como agente mutagénico para inducir variabilidad genética en especies vegetales. No obstante, antes de comenzar un programa de mejoramiento mediante mutagénesis, es necesario establecer la dosis de irradiación adecuada. El objetivo fue determinar la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) y de reducción media del crecimiento ( $RC_{50}$ ) en pasto garrapata (*Eragrostis superba* Peyr.). Esto para establecer la dosis óptima de irradiación gamma para inducir mutagénesis en esta especie. Para ello, se irradío semilla con dosis de 0 (tratamiento testigo), 100, 200, 300, 450, 600, 900, 1400, 2000 y 4000 Gray. Las variables evaluadas fueron porcentaje de germinación, índice de velocidad de germinación, longitud de plúmula, longitud de radícula, rendimiento de forraje, producción de semilla, proporción hoja-tallo e índice de concentración de clorofila. Los datos se analizaron a través de análisis de regresión y comparación de medias con la prueba de Dunnett. Con la ecuación de regresión resultante se calculó la  $DL_{50}$  y  $RC_{50}$  para cada

variable. Con estos valores se obtuvo una media ponderada, donde la  $DL_{50}$  se pondero con 30 % y las  $RC_{50}$  con 10 %. En general, todas las características evaluadas se vieron afectadas por la irradiación ( $P < 0.05$ ) y su comportamiento se ajustó a modelos lineales y cuadráticos ( $P < 0.05$ ), lo cual permitió determinar la  $DL_{50}$  y las  $RC_{50}$ . Para el mejoramiento genético del pasto garrapata, se recomienda utilizar la ponderación de ambos parámetros, la cual se obtuvo a los 2486 Gy. Los resultados de este estudio permitirán la implementación de programas de mejoramiento genético por mutagénesis en pasto garrapata.

## ABSTRACT

### OPTIMAL DOSE OF GAMMA IRRADIATION FOR MUTAGENESIS

#### INDUCTION IN WILMAN LOVEGRASS (*Eragrostis superba*)

BY:

ALAN ÁLVAREZ HOLGUÍN

Gamma radiation can be used as a mutagenic agent to induce variability on plant breeding programs. However, before starting an improvement program by mutagenesis, establishing the appropriate irradiation doses is required. The objective was to determine the median lethal doses ( $LD_{50}$ ) and the median growth reduction ( $GR_{50}$ ) on wilman lovegrass (*Eragrostis superba* Peyr.). This to establish the optimal dose of gamma irradiation for mutagenesis induction on this species. The doses evaluated were 0, 100, 200, 300, 450, 600, 900, 1400, 2000 y 4000 Gray (Gy). The dosis of 0 Gy was used as a control treatment. The variables evaluated were germination percentage, speed germination index, plumule length, radicle length, forage yield, seed production, stem-leaf ratio and chlorophyll concentration index. Data were analyzed through a regression analysis and the means were compared through the Dunnett's test. With the resulting regression equation, the  $LD_{50}$  and  $GR_{50}$  were estimated. From the resulting values of  $LD_{50}$  and  $GR_{50}$  a weighted average was calculated, where the  $LD_{50}$  were weighted at 30 % and the  $GR_{50}$  at 10 %. In general, all the characteristics evaluated were affected by the irradiation ( $P < 0.05$ ) and their behavior were adjusted to linear and quadratic models ( $P < 0.05$ ). These results allowed to determine the  $LD_{50}$  and the  $GR_{50}$ . For the Wilman lovegrass breeding we recommend to use the weighted average from both parameters, which was

calculated at 2486 Gy. The findings of this study will allow to perform plant breeding by mutagenesis in Wilman lovegrass.

## INTRODUCCIÓN

La dosis letal media ( $DL_{50}$ ) y la de reducción del crecimiento ( $RC_{50}$ ) son parámetros utilizados para seleccionar la dosis de irradiación adecuada para inducir mutaciones en programas de mejoramiento genético vegetal. Lo anterior con la finalidad de inducir cambios genéticos y fenotípicos que permitan seleccionar plantas con características que no se encuentran en la naturaleza. Diversos investigadores concuerdan que en dosis donde muere el 50 % de los individuos irradiados es donde existe mayor probabilidad de producir mutaciones útiles para programas de mejoramiento genético (Lajonchere *et al.*, 1995; Morela *et al.*, 2002; Golublnova *et al.*, 2011; Ángeles-Espino *et al.*, 2013). Así mismo, otros investigadores han señalado que además de la  $DL_{50}$  otra dosis con alta probabilidad de producir mutaciones efectivas es donde se reduce el crecimiento en un 50 % ( $RC_{50}$ ) (Akgüm y Tosun, 2004; Khalil *et al.*, 2014). Cabe señalar que ambos parámetros ( $DL_{50}$  y  $RC_{50}$ ) se basan en el supuesto de que en dosis bajas de radiación los impactos en el genoma son mínimos y difícilmente se reflejan en cambios fenotípicos, mientras que, con dosis altas el genoma sufre múltiples impactos que regularmente producen aberraciones o cambios negativos (Songsri *et al.*, 2011; Thole *et al.*, 2011). Por lo anterior, el primer paso para el mejoramiento genético a través de mutagénesis con radiación gamma, es conocer la  $DL_{50}$  y la  $RC_{50}$ .

En México la mayor parte de los pastizales de zonas áridas y semi áridas se encuentran degradados debido al sobrepastoreo y otras prácticas antropogénicas (Melgoza-Castillo *et al.*, 2007). Lo anterior, ha provocado una disminución en la cobertura vegetal, grandes extensiones de suelo desnudo y

pérdida de biodiversidad, lo cual ha menguado la funcionalidad y productividad de estos ecosistemas. Una alternativa para rehabilitar estos ecosistemas degradados es la resiembra de pastos, dentro de la cual se recomienda utilizar vegetación nativa. No obstante, en áreas con alto grado de degradación este tipo de vegetación tiene problemas para establecerse. Ante esto, una alternativa es utilizar especies introducidas de mayor rusticidad y capacidad de establecimiento, como es el pasto garrapata (*Eragrostis superba*). Esta especie es considerada como una de las de mayor potencial para ser utilizadas en programas de rehabilitación de pastizales (Sáenz-Flores *et al.*, 2015), ya que posee mayor capacidad de establecimiento que especies nativas utilizadas en este tipo de programas como el pasto banderita (*Bouteloua curtipendula*), navajita (*Bouteloua gracilis*) e incluso de introducidas como el llorón (*Eragrostis curvula*) (Esqueda *et al.*, 2005). Sin embargo, presenta menor valor nutricional y rendimiento de forraje que otros pastos introducidos como buffel (*Pennisetum ciliare*), klein (*Panicum coloratum*) y el mismo llorón (Sanderson *et al.*, 1999). Debido a esto, el pasto garrapata puede ser considerado para someterse a un programa de mejoramiento genético. No obstante, por ser una especie introducida, se puede asumir que en México existe poca variabilidad genética de esta especie. En este sentido, la mutagénesis puede ser una alternativa para el mejoramiento genético del pasto garrapata, ya que ha demostrado ser una técnica viable para inducir variabilidad en gramíneas (Pongtongkam *et al.*, 2005; Pongtongkam *et al.*, 2006; López *et al.*, 2011). Sin embargo, a la fecha se desconoce la dosis con mayor probabilidad de producir mutaciones efectivas en esta especie. Por lo anterior, el objetivo fue determinar la DL<sub>50</sub> y la RC<sub>50</sub> en

pasto garrapata, para con esto establecer la dosis óptima de irradiación gamma para inducir mutagénesis en esta especie.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El experimento se llevó a cabo en condiciones de laboratorio e invernadero. Se irradió semilla de pasto garrapata variedad Palar; importada de la empresa Curtis & Curtis, ubicada en Clovis, Nuevo Mexico, EUA. Se evaluaron 9 dosis de irradiación y un testigo: 0 (testigo), 100, 200, 300, 450, 600, 900, 1400, 2000 y 4000 Gray (Gy). Los tiempos de exposición para las dosis evaluadas fueron determinadas utilizando el sistema Gafchromic dosimetry y una cámara de ionización marca RADCAL modelo Acudose No. De serie 4094118, USA. La irradiación de la semilla se realizó en el Complejo MOSCAFRUT SAGARPA//IICA en Metapa de Domínguez, Chiapas, México en colaboración con el Campo Experimental Rosario Izapa, Chiapas del INIFAP. Las dosis se aplicaron dentro de un irradiador panorámico tipo Gamma Beam Modelo GB-127 MDS Nordion, con fuente de almacenamiento en seco, con una actividad de 15,000 Curies de Co<sup>60</sup>.

### **Prueba de Germinación**

El diseño experimental utilizado para esta prueba fue un completamente al azar con 10 tratamientos de irradiación y cuatro repeticiones por cada dosis, considerándose como unidad experimental cada caja Petri de 90 mm de diámetro provistas de algodón y papel filtro con 50 semillas por repetición. Las cajas Petri fueron humectadas con 25 ml de agua al inicio de la prueba y posteriormente se suministraron riegos por aspersión de 2.0 ml cada dos días, durante los 15 días que duró la prueba. Las cajas Petri se colocaron en una incubadora Precision Scientific, modelo 6M a temperatura de  $28 \pm 2$  °C. Se consideró semilla germinada aquella que alcanzó 0.5 cm de plúmula o de

radícula (Maguire, 1962). Las variables evaluadas fueron porcentaje germinación (PG), índice de velocidad de germinación (Vge), longitud de plúmula (LP) y de radícula (LR). Para obtener LR y LP se dejaron crecer tres plántulas por caja Petri durante siete días después de germinadas. La Vge se calculó mediante la ecuación (Maguire, 1962):

$$Vge = \sum n_i / t$$

Dónde: Vge= velocidad de germinación,  $n_i$ = número de semillas germinadas por día, t = día de la germinación.

### **Evaluación en Invernadero**

Para la evaluación de la emergencia y desarrollo de la planta se utilizó un diseño experimental de bloques al azar con 10 repeticiones por tratamiento, estableciendo los bloques perpendicularmente a la intensidad de luz solar durante el día. Se sembraron 20 semillas por maceta para asegurar emergencia y establecimiento; sin embargo, solamente se dejó una planta por maceta. La siembra se realizó en bolsas de polietileno negro de 26 cm de altura por 18 cm de diámetro, perforadas en la parte inferior. Las bolsas se llenaron con 23 cm de suelo franco-arenoso de origen aluvial. Los riegos se suministraron hasta punto de saturación cada dos o tres días, según el desecamiento del suelo. La prueba se realizó por 16 semanas durante los meses de abril a agosto. Las variables evaluadas fueron rendimiento de forraje (RF), producción de semilla (PS), proporción tallo hoja (PTH) e índice de concentración de clorofila (ICC). Para el PS se recolectó la totalidad de la semilla de cada planta y se colocó en bolsas de papel. Para el RF la biomasa se cortó a cinco cm del suelo. Posteriormente, se separaron los tallos y las hojas y se colocaron en bolsas de

papel. Las muestras extraídas tanto de forraje como de semilla se secaron en una estufa a 65 °C durante 72 h. Una vez secas las muestras fueron pesadas en una balanza analítica de la marca Viper BC, Mettler. El ICC se midió en la parte media de cinco hojas seleccionadas al azar con un medidor de la marca Opti-Sciences, modelo CCM-200.

Para asegurar los rangos de temperatura (T) y humedad relativa (HR) que requiere el pasto garrapata, se realizaron mediciones dentro del invernadero con una sonda modelo HMP60 (Vaisala, Woburn, MA, USA). Estos datos se registraron cada segundo y fueron promediados cada minuto en un datalogger CR1000 (Campbell Scientific Inc., Logan, UT, USA). La T media durante el experimento fue de  $26.7 \pm 5.6$  °C, con una mínima de 17.1 y máxima de 44.7 °C. La HR media fue de  $52.0 \pm 16.8$  %.

### **Análisis Estadístico**

Los datos se analizaron mediante análisis de regresión para cada variable. Con la ecuación de regresión resultante del porcentaje de germinación se estimó la dosis letal media ( $DL_{50}$ ). Por este mismo procedimiento, se estimó la reducción media del crecimiento ( $RC_{50}$ ) de las variables índice de velocidad de germinación, longitud de plúmula, longitud de radícula, rendimiento de forraje, peso de semilla, proporción tallo hoja e índice de concentración de clorofila. Adicionalmente, todos los datos se sometieron a un análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de Dunnett, donde el factor de influencia fue la dosis de radiación con un nivel de significancia de 0.05 ( $\alpha=0.05$ ). Los análisis se realizaron con los procedimientos REG y GLM del paquete estadístico SAS 9.1.3 (2006).

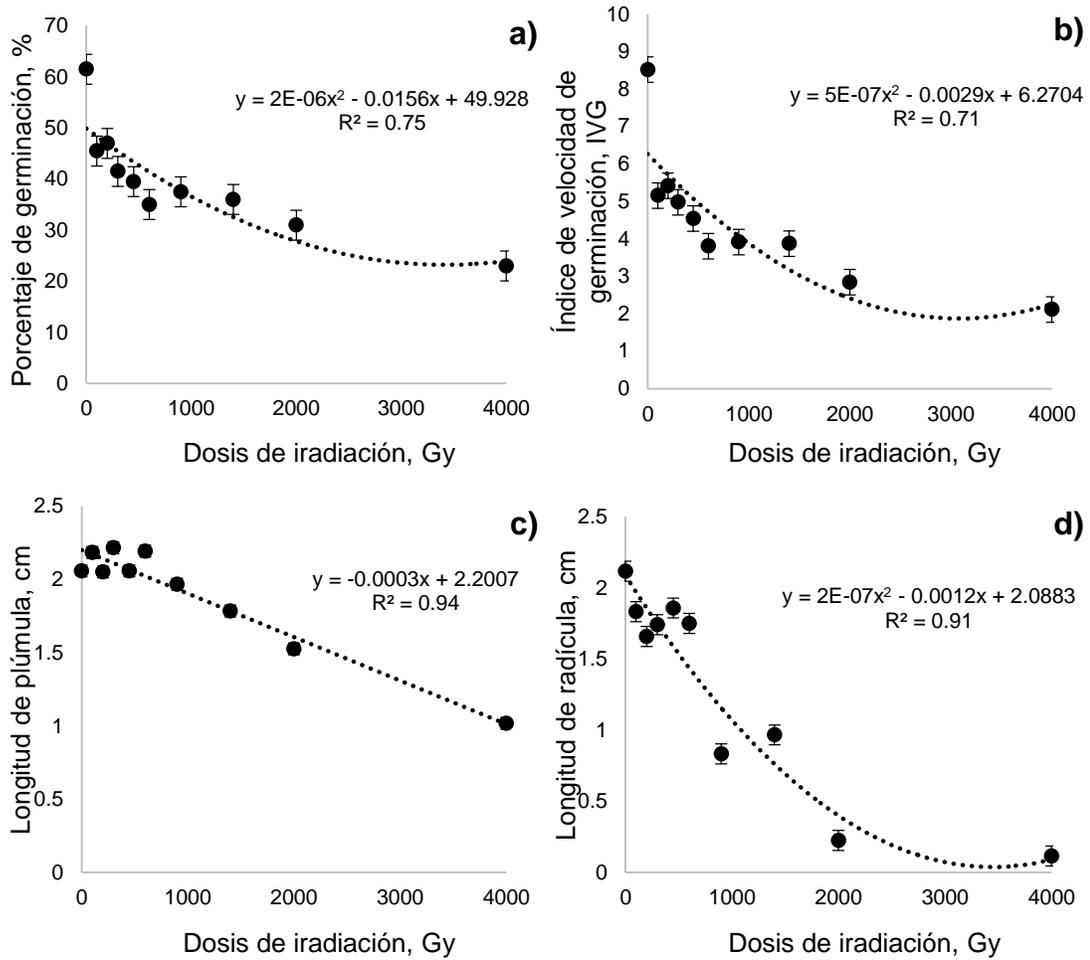
Con los resultados de la  $DL_{50}$  y las  $RC_{50}$  obtenidas de las ocho variables, se obtuvo una media ponderada. Ponderándose, la  $DL_{50}$  con un 30 % y las  $RC_{50}$  con un 10 % para las demás variables (PG, Vge, LP, LR, RF, PS, PTH e ICC). Esto para obtener un solo valor y con ello establecer la dosis optima de irradiación gamma para inducir mutagénesis en pasto garrapata.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

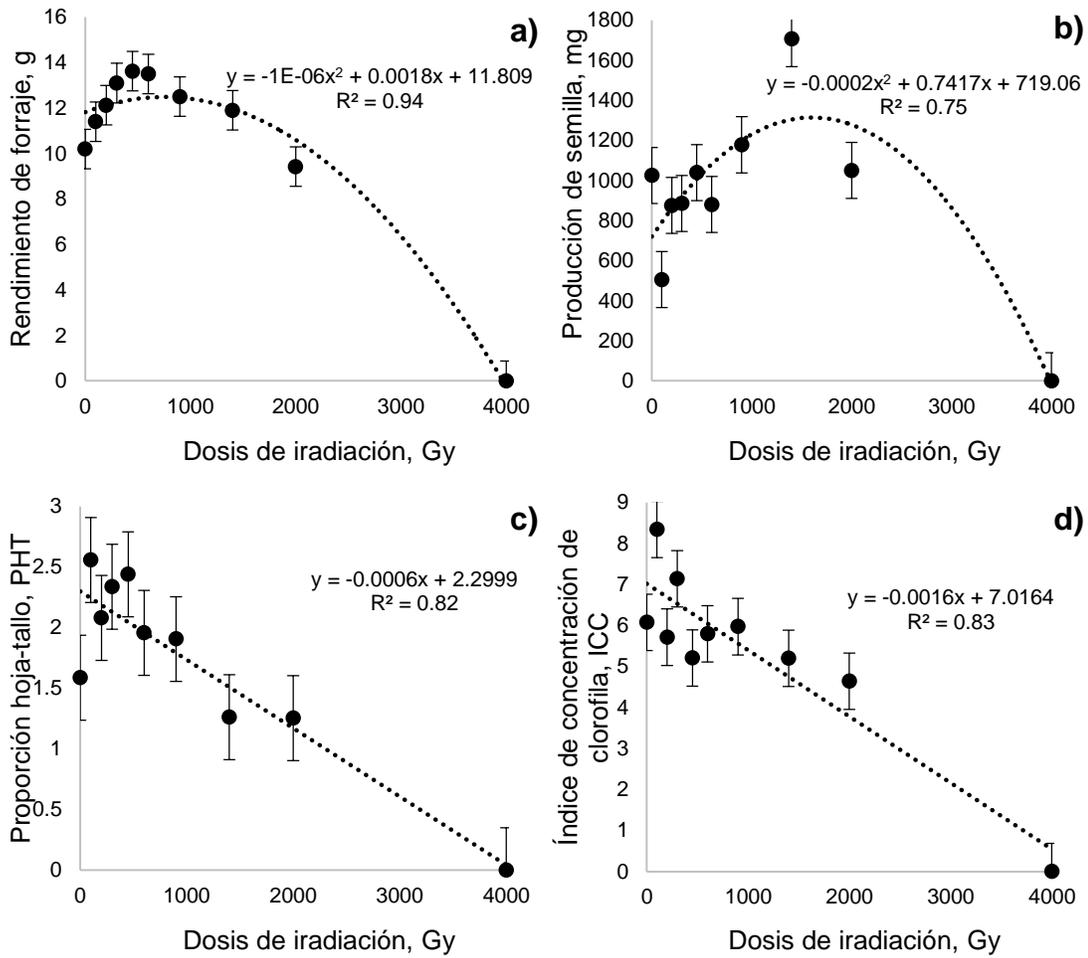
El comportamiento del PG mostró una tendencia cuadrática ( $P=0.008$ ). Además, todas las dosis de radiación presentaron diferencias ( $P<0.05$ ) con respecto al tratamiento testigo (T-0). En términos generales el PG tendió a disminuir conforme aumento la dosis de irradiación (Grafica 1a). La ecuación de regresión indica que la  $DL_{50}$  en pasto garrapata se presenta a 1529.1 Gy. De manera similar, la Vge mostró una tendencia cuadrática ( $P=0.001$ ) y todos los tratamientos de irradiación presentaron diferencias ( $P<0.05$ ) con el T-0. También, la Vge disminuyó conforme se incrementó la dosis de radiación (Grafica 1b). De acuerdo con la ecuación de regresión, en esta variable la  $RC_{50}$  se encontró a los 805.3 Gy.

La LP presentó una tendencia lineal negativa ( $P<0.0001$ ). No obstante, solamente las dosis de 2000 y 4000 Gy presentaron menor LP ( $P<0.05$ ) que T-0 (Gráfica 1c). Según la ecuación de regresión, en esta variable la  $RC_{50}$  se ubicó en los 3905.3 Gy. Así mismo LR mostró una tendencia cuadrática ( $P<0.0001$ ). Para esta variable solamente los tratamientos 900, 1400, 2000 y 4000 Gy tuvieron menor LR ( $P<0.05$ ) que el T-0 (Gráfica 1d). La ecuación indicó que en esta variable la  $RC_{50}$  se presentó a los 1037.8 Gy.

El comportamiento del RF mostró una tendencia cuadrática ( $P=0.0009$ ). En esta variable se presentó un aumento ( $P<0.05$ ) en las dosis de 450 y 600 Gy. Posteriormente, tendió a disminuir hasta los 4000 Gy, donde todas las plantas de esta dosis murieron antes de los 21 d de edad (Gráfica 2a). En esta variable, la ecuación de regresión indica que la  $RC_{50}$  se presentó a 2262.8 Gy.



Gráfica 1. Efecto de diferentes dosis de irradiación con  $CO^{60}$  sobre el porcentaje de germinación (a), índice de velocidad de germinación (b), longitud de plúmula (c) y longitud de radícula (d) de pasto garrapata (*Eragrostis superba*).



Gráfica 2. Efecto de diferentes dosis de irradiación con  $CO^{60}$  sobre el rendimiento de forraje (a), producción de semilla (b), proporción hoja-tallo (c), índice de concentración de clorofila (d) de pasto garrapata (*Eragrostis superba*).

El PS presentó una tendencia cuadrática ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, los únicos tratamientos que mostraron diferencias ( $P < 0.05$ ) conforme al testigo fueron 1400 y 4000 Gy. En la dosis de 1400 Gy el PS aumentó ( $P < 0.05$ ; Grafica 2b). De acuerdo con la ecuación de regresión y el PS la  $RC_{50}$  se presentó a los 3968.7 Gy. La PHT mostró una tendencia lineal ( $P < 0.0001$ ). El único tratamiento diferente ( $P < 0.05$ ) al testigo fue el de 4000 Gy. Lo anterior debido a que en este tratamiento todas las plantas murieron y por lo tanto presentó una PHT de 0. En esta variable la  $RC_{50}$  se obtuvo en 2509.9 Gy. El ICC presentó un comportamiento lineal ( $P < 0.0001$ ). No obstante, al igual que en la variable anterior, el único tratamiento diferente ( $P < 0.05$ ) al testigo fue el de 4000 Gy. De acuerdo con la ecuación de regresión, la  $RC_{50}$  se presentó a los 2486.6 Gy. La media ponderada de la  $DL_{50}$  y las  $RC_{50}$  resultantes de las ocho variables fue de 2159.2 Gy.

La germinación del pasto garrapata disminuyó conforme aumentó la dosis de irradiación. Este resultado concuerda con diversos autores, quienes encontraron que la germinación de diferentes especies de plantas tiende a disminuir a medida que aumenta la dosis de radiación (Anbarasan *et al.*, 2013; Bharathi *et al.*, 2013; Olasupo *et al.*, 2016; Rajarajan *et al.*, 2016). Esto se debe a que dosis altas de radiación pueden inhibir funciones vitales para las células, lo cual puede provocar la muerte de algunas células e incluso la del embrión en la semilla. Este fenómeno tiende a aumentar en frecuencia conforme se incrementa la dosis de irradiación y es la causa por la que la germinación disminuye (Olasupo *et al.*, 2016). La radiación puede provocar daños en compuestos relacionados con el metabolismo de planta como auxinas, ácido

ascórbico, clorofila y proteínas, lo cual puede inhibir el crecimiento de las plántulas (Kiong *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2008). Debido a estos desordenes se ha observado que la semilla irradiada con dosis altas no es capaz de germinar o que sus plántulas no son capaces de sobrevivir más de unos cuantos días (Marcu *et al.*, 2013), lo cual ocurrió en este estudio en la dosis de 4000 Gy. Así mismo, la reducción de la germinación se ha atribuido a que la frecuencia en los daños cromosómicos aumenta con el incremento de la dosis (Kiong *et al.*, 2008). Lo anterior puede cambiar la expresión de proteínas e influir en el funcionamiento celular, lo que puede afectar al desarrollo de la plántula e impedir la germinación (Cheng *et al.*, 2010).

Una de las gramíneas más estudiadas en cuestión de radiosensibilidad es el arroz (*Oryza sativa*). En un estudio realizado en esta especie expusieron 13 variedades a radiación gamma y encontraron que la  $DL_{50}$  varió según la variedad entre 345 y 423 Gy (Harding *et al.*, 2012). En otro estudio realizado en dos variedades de arroz se estableció la  $DL_{50}$  en 288 y 354 Gy (Ramchander *et al.*, 2015), mientras que otros investigadores establecieron la dosis letal media en esta especie a los 229 Gy (Ousmane *et al.*, 2013). En otras gramíneas como *Pennisetum glaucum* y *Pennisetum typhoides* la  $DL_{50}$  se ha determinado en 669.3 y 200 Gy, respectivamente (Ousmane *et al.*, 2013; Ambli *et al.*, 2014). En gramíneas forrajeras la  $DL_{50}$  se ha determinado en pasto sudan (*Sorghum sudanense*), donde la  $DL_{50}$  varió entre 307 y 342 Gy para diferentes variedades (Golubnova *et al.*, 2011). Cabe mencionar que en los estudios anteriores se utilizó el mismo agente que en este estudio. No obstante, los resultados anteriores son inferiores a la  $DL_{50}$  del pasto garrapata, obtenida en este estudio.

Este resultado probablemente se debe, entre otros factores, a las variaciones en el contenido de humedad de la semilla que se da entre especies. Esto debido a que la radiación ionizante puede provocar la ruptura de enlaces covalentes y descomposición de moléculas de agua. Lo anterior forma radicales libres que de manera indirecta pueden dañar los diferentes organelos de la célula e incluso las moléculas de ADN dentro de la célula (Alegre, 2001).

Al igual que el PG, la Vge del pasto garrapata tendió a disminuir conforme se incrementó la dosis de radiación. Este resultado concuerda con lo reportado en cacahuate (*Arachis hypogaea*), donde la velocidad de germinación disminuyó con el aumento de la dosis de radiación (Aparna *et al.*, 2013). El retraso en la germinación puede deberse a que se ha observado que dosis altas de radiación pueden inhibir procesos vitales para la célula, como son la síntesis de proteínas y la actividad enzimática, lo cual puede retrasar la división celular y por ende la germinación (Chandrashekar, 2014; Olasupo *et al.*, 2016).

Con respecto a la LP y LR se observó que estas disminuyeron con el incremento de la dosis de irradiación. Este resultado concuerda con el encontrado en *Eleusine coracana*, donde la LP y la LR se vieron afectadas por el incremento en la dosis de radiación y se encontró la  $RC_{50}$  a los 500 Gy, para ambas variables (Ambavane *et al.*, 2014). Este mismo efecto fue encontrado en arroz, donde encontraron la  $RC_{50}$  a los 250 y 450 Gy para ambas variables, respectivamente (Talebi y Talebi, 2012).

La disminución en longitud de plúmula y radícula puede deberse a que la radiación ionizante comúnmente afecta al metabolismo y la división celular en plantas, lo cual inhibe o retrasa su crecimiento (Chandrashekar, 2014; Olasupo

*et al.*, 2016). Respecto a esto, Kiong *et al.* (2008) encontraron que la radiación gamma puede disminuir la cantidad de proteínas y compuestos clorofílicos, lo cual afecta al metabolismo de la planta. Por otro lado, Preuss y Britt (2003) encontraron que la radiación gamma puede inhibir el crecimiento de las plantas, debido a que estas tienen un mecanismo de señales de transducción que monitorea el daño celular. Este mecanismo detiene la división celular cuando se produce un daño en la estructura celular.

El RF y la PS del pasto garrapata presentaron un incremento con dosis bajas de irradiación. Esto probablemente se debe a que la radiación gamma puede incrementar la cantidad de pigmentos fotosintéticos como las clorofilas a y b y los carotenos (Kiong *et al.*, 2008). Estos pigmentos son los encargados de captar fotones de luz solar para que la planta pueda convertirlos en compuestos ricos en energía, a través de la fotosíntesis (Jifon, 2005). Por esta razón, un incremento en la concentración de estos pigmentos puede aumentar las tasas fotosintéticas, lo cual pudo ser la causa del incremento en el rendimiento de forraje y la producción de semilla en este estudio. El incremento en RF y PS también puede deberse a que la radiación gamma en algunas ocasiones incrementa la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la glutatión reductasa, lo cual disminuye el estrés oxidativo en la planta. Esto último ayuda a la planta a lidiar de manera más fácil con los factores de estrés a los que se enfrenta diariamente, como son las fluctuaciones de temperatura y luz solar que recibe, lo cual beneficia su crecimiento (Kim *et al.*, 2004; Wi *et al.*, 2007).

No obstante, después del incremento en el RF y la PS se presentó un decremento, el cual aumentó conforme se incrementó la dosis. La exposición a radiación gamma frecuentemente produce radicales libres durante el proceso de la radiólisis del agua. Estos radicales libres son especies químicas inestables pueden dañar organelos celulares. En un experimento realizado por Wi *et al.* (2005) se observó que la radiación gamma produjo importantes modificaciones en la estructura de algunos organelos en células de *Arabidopsis thaliana*. En este experimento, los tilacoides dentro de los cloroplastos mostraron dilatación y daños, las mitocondrias presentaron formas distorsionadas y el retículo endoplasmático presentó membranas distendidas. Además, como se menciona con anterioridad, la radiación puede provocar la destrucción de auxinas, ácido ascórbico, clorofila y proteínas, lo que afecta al metabolismo de las plantas (Kiong *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2008). Así mismo, puede producir daños en la estructura genómica, los cuales pueden cambiar la expresión de proteínas e influir en el desarrollo celular (Kiong *et al.*, 2008). En términos generales estas pudieron ser las principales causas de la reducción en el rendimiento de forraje y producción de semilla; así como la disminución en el porcentaje y velocidad de germinación y la longitud de plúmula y radícula, que se presentaron en este estudio.

La  $DL_{50}$  y  $RC_{50}$  son parámetros utilizados para determinar la dosis óptima de irradiación para inducir mutaciones efectivas en programas de mejoramiento genético vegetal. Esto se debe a que se ha observado que con dosis bajas de irradiación los impactos en el genoma son mínimos y difícilmente se reflejan en cambios fenotípicos, mientras que con dosis altas el genoma sufre múltiples

impactos que regularmente producen aberraciones o cambios negativos (Songsri *et al.*, 2011; Thole *et al.*, 2001). Además, las dosis bajas de irradiación pueden inducir una radioestimulación que se expresa en un incremento en la división celular, actividad enzimática o cantidad de pigmentos fotosintéticos (Minissi *et al.*, 2013; Chandrashekar, 2014). En contraste, dosis altas de irradiación pueden producir daños físicos en los organelos o químicos en las células como la destrucción de enzimas y hormonas, entre otros. Debido a esto, las dosis bajas y altas de radiación pueden generar cambios fenotípicos en las plantas que se pueden confundir con cambios genéticos. Por lo anterior, antes de iniciar un programa de mejoramiento genético por mutagénesis se debe establecer la dosis óptima de irradiación, lo cual incrementa la posibilidad de encontrar mutaciones efectivas. La dosis óptima de irradiación se establece a través de la dosis letal media y/o la dosis de reducción media del crecimiento (Songsri *et al.*, 2011; Khalil *et al.*, 2014). En este estudio, la reducción que se presentó en los valores de todas las variables por efecto de irradiación, permitió determinar la  $DL_{50}$  y  $RC_{50}$ . No obstante, los valores de ambos parámetros en cada variable oscilaron entre 805 y 3905 Gy. Debido a la amplitud de este rango, se calculó una media ponderada para establecer la dosis óptima de irradiación gamma en la semilla. A la variable que se le asignó mayor ponderación fue el porcentaje de germinación, ya que la muerte del individuo indica daño máximo que puede producir la radiación.

## **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

En general todos los parámetros físicos evaluados se vieron afectados conforme incrementó la dosis de irradiación gamma. Esto permitió determinar la dosis media letal y reducción media del crecimiento. Para el mejoramiento genético del pasto garrapata, se recomienda utilizar la dosis óptima de radiación obtenida con la ponderación de ambos parámetros (2486 Gy). Los resultados de este estudio permitirán implementar programas de mejoramiento genético, a través de mutagénesis inducida con radiación gamma en semilla de pasto garrapata. Esto contribuirá para la obtención de nuevo material genético que pueda ser utilizado para rehabilitación de pastizales.

## LITERATURA CITADA

- Akgüm, I. y M. Tosun. 2004. Agricultural and cytological characteristics of M1 perennial rye (*Secale montanum* Guss.) as affected by the application of different doses of gamma rays. *PJBS*. 7:827-833.
- Alegre, B. N. 2001. Reacción celular ante la radiación. *Radiobiología*. 1:9-11.
- Ambavane, A. R., S. V. Sawardekar, S. A. Sawantdesai y N. B. Gokhale. 2014. Studies on mutagenic effectiveness and efficiency of gamma rays and its effect on quantitative traits in finger millet (*Eleusine coracana* L. Gaertn). *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 8:120-125.
- Ambli, K. y L. Mullainathan. 2014. Effect of gamma rays and ems on seed germination and seed characters in pearl millet (*Pennisetum typhoides* (Burn.) Stapf. Var. CO (Cu)-9. *J. Chem. Biol. Phys. Sci.* 4:3345-3349.
- Anbarasan, K., R. Rajendran, D. Sivalingam, M. Anbazhagan y A. A. Chidambaram. 2013. Effect of gamma radiation on seed germination and seedling growth of Sesame (*Sesamum indicum* .L) Var.TMV3. *Int. J. Res. Bot.* 3: 27-29.
- Ángeles-Espino, A., A. J. Valencia-Botín, G. Virgen-Calleros, C. Ramírez-Serrano, L. Paredes-Gutiérrez y S. Hurtado-De la Peña. 2013. Determinación de la dosis letal (DL<sub>50</sub>) con Co<sup>60</sup> en vitroplántulas de *Agave tequilana* var. Azul. *Rev. Fitotec. Mex.* 36:381-386.
- Aparna, M., A. Chaturvedi, M. Sreedhar, D. P. Kumar, P. Venu-Babu y R. K. Singhal. 2013. Impact of Gamma Rays on the Seed Germination and Seedling Parameters of Groundnut (*Arachis Hypogaea* L.). *Asian J. Exp. Biol. Sci.* 4:61-68.
- Bharathi, T., S. Gnanamurthy, D. Dhanavel, S. Murugan y M. Ariraman. 2013. Induced Physical mutagenesis on seed germination, lethal dosage and morphological mutants of Ashwagandha (*Withania somnifera* (L.) Dunal). *IJAR* 1:136-141.
- Chandrashekar, K. R. A. 2014. Gamma sensitivity of forest plants of Western Ghats. *J. Environ. Radioact.* 132:100-107.
- Cheng, L., H. Yang, B. Lin, Y. Wang, W. Li, D. Wang y F. Zhang. 2010. Effect of gamma-ray radiation on physiological, morphological characters and chromosome aberrations of minitubers in *Solanum tuberosum* L. *Int. J. Radiat. Biol.* 86:791-799.
- Esqueda, C. M. H., A. C. Melgoza, M. C. Sosa, R. R. Carillo y J. C. Jiménez. 2005. Emergencia y sobrevivencia de gramíneas con diferentes

- secuencias de humedad/sequía en tres tipos de suelo. *Téc. Pecu. Méx.* 43:101-115.
- Golubinova, I. y K. Gecheff. 2011. M1 cytogenetic and physiological effects of gamma-rays in sudan grass (*Sorghum Sudanense* (piper.) stapf). *Bulg. J. Agric. Sci.* 17:417-423.
- Harding, S. S., S. D. Johnson, D. R. Taylor, C. A. Dixon y M. Y. Turay. 2012. Effect of gamma rays on seed germination, seedling height, survival percentage and tiller production in some rice varieties cultivated in Sierra Leone. *Am. J. Exp. Agric.* 2:247-255.
- Jifon, J. L. 2005. Growth environment and leaf anatomy affect nondestructive estimates of chlorophyll and nitrogen in *Citrus* Sp. leaves. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 130:152-158.
- Khalil, S. A., R. Zamir y N. Ahmad. 2014. Effect of different propagation techniques and gamma irradiation on major steviol glycoside's content in *Stevia rebaudiana*. *JAPS* 24:1743-1751.
- Kim, J. H., M. H. Baek, B. Y. Chung, S. G. Wi y J. S. Kim. 2004. Alterations in the photosynthetic pigments and antioxidant machineries of red pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings from gamma-irradiated seeds. *J. Plant Biol.* 47:314-321.
- Kiong, A. L. P., A. G. Lai, S. Hussein y A. R. Harun. 2008. Physiological responses of *Orthosiphon stamineus* plantlets to gamma irradiation. *Am-Eurasian J. Sustain. Agric.* 2:135–149.
- Lajonchere, G., A. R. Mesa, M. Prieto y E. Sánchez. 1995. Curva de radiosensibilidad con <sup>60</sup>Co en guinea (*Panicum maximum* Jacq.) cv. K-249. *Rev. Past. Forrajes.* 18:1-8.
- López, C. E., A. Prina, S. Griffa, A. N. Ribotta, E. Carloni, E. Tommasino, C. Luna, E. Biderbost y K. Grunberg. 2011. Obtaining new germplasm in *Cenchrus ciliaris* L. through induced-mutation and *in vitro* selection. *Phyton.* 80:59-64.
- Maguire, J. D. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci.* 2:176-177.
- Marcu, D., G. Damian, C. Cosma y V. Cristea. 2013. Gamma radiation effects on seed germination, growth and pigment content, and ESR study of induced free radicals in maize (*Zea mays*). *J. Biol. Phys.* 39:625-634.
- Melgoza-Castillo, A., C. Ortega-Ochoa, C. R. Morales-Niero, P. Jurado-Guerra, C. Velez-Sanchez-Verin, M. H. Royo-Márques, G. Quintana-Martínez, A. Lafón-Terrazas, M. T. Alarcón-Herrera, G. Bezanilla-Enríquez y C.

- Pinedo-Álvarez. 2007. Propagación de plantas nativas para la recuperación de áreas degradadas: opción para mejorar ecosistemas. *Tecnociencia*. 3:38-41.
- Minissi, F. A., M. El-mahrouk, M. F. Rida y M. N. Nasr. 2013. Effects of gamma radiation on germination, growth characteristics and morphological variations of *Moluccella laevis* L. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 13:696-704.
- Morela, F., V. González y L. Castro. 2002. Efecto de la radiación Gamma sobre la diferenciación de plantas de caña de azúcar a partir de callos. *Agron. Trop.* 52:311-323.
- Olasupo, F. O., C. O. Ilori, B. P. Forster y S. Bado. 2016. Mutagenic effects of gamma radiation on eight accessions of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). *Am. J. Plant Sci.* 7:339-351.
- Ousmane, S. D., W. Elegba y K. Danso. 2013. Radio-sensibility of pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) and cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seeds germination and seedling growth. *IJIAS*. 4:665-671.
- Pongtongkam, P., S. Nilratnisakorn, S. Piyachoknakul, A. Thongpan, J. Aranananth, K. Kowitwanich y S. Tadsri. 2005. Inducing salt tolerance in purple guinea grass (*Panicum maximum* TD58) via gamma irradiation and tissue culture. *Nat. Sci.* 39:681-688.
- Pongtongkam, P., S. Peyachoknagul, J. Arananant, A. Thongpan y S. Tudsri. 2006. Production of salt tolerance dwarf napier grass (*Pennisetum purpureum* cv. Mott) using tissue culture and gamma irradiation. *Nat. Sci.* 40:625-633.
- Preuss, S. B. y A. B. Britt. 2003. A DNA-damage-induced cell cycle checkpoint in *Arabidopsis*. *Genetics*. 164:323-334.
- Rajarajan, D., R. Saraswathi y D. Sassikumar. 2016. Determination of lethal dose and effect of gamma ray on germination percentage and seedling parameters in ADT (R) 47 rice. *IJABR*. 6:328-332.
- Ramchander, S., R. Ushakumari y M. A. Pillai. 2015. Lethal dose fixation and sensitivity of rice varieties to gamma radiation. *Indian J. Agr. Res.* 49:24-31.
- Sáenz-Flores, E., R. A. Saucedo-Terán, C. R. Morales-Nieto, P. Jurado-guerra, C. R. Lara-Macías, A. Melgoza-Castillo y J. A. Ortega-Gutiérrez. 2015. Producción y calidad de semilla de pastos forrajeros como respuesta a la fertilización en Aldama, Chihuahua. *Tecnociencia*. 9:111-119.

- Sanderson, M. A., P. Voigt y R. M. Jones. 1999. Yield and quality of warm-season grasses in central Texas. *J. Range Manage.* 52:145-150.
- Shah, T. M., J. I. Mirza, M. A. Haq y B. M. Atta. 2008. Radio sensitivity of various chickpea genotypes in M1 generation I-Laboratory studies. *Pakistan J. Bot.* 40:649–665.
- Songsri, P., B. Suriharn, J. Sanitchon, S. Srisawangwong y T. Kesmala. 2011. Effects of gamma radiation on germination and growth characteristics of physic nut (*Jatropha curcas* L.). *J. Biol. Sci.* 11:268-274.
- Statistical Analysis System (SAS) Institute Inc. User's guide. Version 9.1.3 Cary, NC, USA. 2006.
- Talebi, A. B. y A. B. Talebi. 2012. Radiosensitivity study for identifying the lethal dose in MR219 (*Oryza sativa* L. spp. Indica cv. MR219). *IJASRT* 2:63-67.
- Thole, V., A. Peraldi, B. Worland, P. Nicholson, J. H. Doonan y P. Vain. 2011. T-DNA mutagenesis in *Brachypodium distachyon*. *J. Exp. Bot.* 10:1-10.
- Wi, S. G., B. Y. Chung, J. H. Kim, M. H. Baek, D. H. Yang, J. W. Lee y J. S. Kim. 2005. Ultrastructural changes of cell organelles in *Arabidopsis?* stem after gamma irradiation. *J. Plant Biol.* 48:195–200.
- Wi, S. G., B. Y. Chung, J. S. Kim, J. H. Kim, M. H. Baek, J. W. Lee y Y. S. Kim. 2007. Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants. *Micron.* 38:553-564.

**ESTUDIO 2. DOSIS LETAL MEDIA Y REDUCCIÓN MEDIA DEL  
CRECIMIENTO POR RADIACIÓN GAMMA EN PASTO AFRICANO  
(*Eragrostis lehmanniana* Ness)**

**POR:**

Alan Álvarez-Holguín<sup>1</sup>, Carlos Raúl Morales-Nieto<sup>1\*</sup>, Carlos Hugo Avendaño-Arrazate<sup>2</sup>, Eduardo Santellano-Estrada<sup>1</sup>, Alicia Melgoza-Castillo<sup>1</sup>, M. Eduviges Burrola-Barraza<sup>1</sup>, Raúl Corrales-Lerma<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua.

<sup>2</sup>Instituto del Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Campo Experimental Rosario Izapa. Tuxtla Chico, Chiapas. México.

## RESUMEN

DOSIS LETAL MEDIA Y REDUCCIÓN MEDIA DEL CRECIMIENTO POR  
RADIACIÓN GAMMA EN PASTO AFRICANO (*Eragrostis lehmanniana* Ness)

POR:

M. C. ALAN ÁLVAREZ HOLGUÍN

Maestría en Ciencias en Producción Animal

Secretaría de Investigación y Posgrado

Facultad de Zootecnia y Ecología

Universidad Autónoma de Chihuahua

Presidente: Dr. Carlos Raúl Morales Nieto

El objetivo fue determinar la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) y la reducción media del crecimiento ( $RG_{50}$ ) en pasto africano (*Eragrostis lehmanniana*) para determinar la dosis óptima de irradiación gamma para inducir mutagénesis en esta especie. Las variables evaluadas fueron porcentaje de germinación, índice de velocidad de germinación, longitud de plúmula, longitud de radícula, rendimiento de forraje, producción de semilla, número de tallos, altura de planta, diámetro de macollo e índice de concentración de clorofila. Se realizó un análisis de tendencia para cada variable y con la ecuación de regresión resultante se estimó la  $DL_{50}$  y  $RG_{50}$ . Los resultados obtenidos indican que la  $DL_{50}$  se encontró a 2076 Gy, mientras que la  $RG_{50}$  fluctuó entre 1357 y 1900 Gy. Para el mejoramiento genético de esta especie se recomienda utilizar la media ponderada de 1533 Gy de ambos parámetros.

## ABSTRACT

### LETHAL DOSE AND MEDIAN GROWTH REDUCTION BY GAMMA RADIATION ON LEHMANN LOVEGRASS (*Eragrostis lehmanniana* Ness)

BY:

ALAN ÁLVAREZ HOLGUÍN

The objective was to determinate the median lethal dose ( $LD_{50}$ ) and the median growth reduction ( $GR_{50}$ ) on Lehmann lovegrass (*Eragrostis lehmanniana*) in order to determinate the optimal dose of gamma irradiation for mutagenesis induction on this species. The evaluated variables included germination percentage (GP), speed germination index (SGI), plumule length (PL), radicle length (RL), forage yield (FY), seed production (SP), stems number (SN), plant height (PH), tillering diameter (TD) and chlorophyll concentration index (CCI). Data was analyzed through a tendencies analysis for each variable. With the resulting regression equation, the  $LD_{50}$  and the  $GR_{50}$  values were estimated. In addition, data was analyzed through means comparison using Dennett's test. Also, with the results obtained of the  $LD_{50}$  and  $GR_{50}$  a weighted average was calculated. The  $LD_{50}$  on Lehmann lovegrass were found at 2076 Gy, while the  $GR_{50}$  ranged between 1357 and 1900 Gy. Therefore, for the genetic improvement of this species is recommended to use the weighted average obtained of both parameters, which was found at 1533 Gy.

## INTRODUCCIÓN

La radiación gamma es un agente mutagénico utilizado para inducir variabilidad genética en programas de mejoramiento vegetal, para generar variabilidad en las plantas. Antes de iniciar un programa de mejoramiento genético mediante mutagénesis, es necesario establecer la dosis de radiación con mayor probabilidad de producir mutaciones efectivas (Ramchander *et al.*, 2015; Rajarajan *et al.*, 2016). Diversos investigadores concuerdan que la dosis donde muere el 50 % (DL<sub>50</sub>) de los individuos irradiados, es donde existe mayor probabilidad de producir mutaciones útiles en un programa de mejoramiento genético (Golubinova y Gecheff, 2011; Ángeles-Espino *et al.*, 2013). Mientras que otros investigadores señalan que otra dosis con alta probabilidad de producir mutaciones efectivas es donde se reduce el crecimiento en 50 % (RG<sub>50</sub>) (Akgüm y Tosun, 2004; Khalil *et al.*, 2014). Lo que se debe a que con dosis bajas de radiación los impactos en el genoma son mínimos, por lo tanto, los cambios fenotípicos también serán escasos. Por otro lado, con dosis altas el genoma sufre múltiples impactos que regularmente producen aberraciones o cambios negativos (Songsri *et al.*, 2011; Thole *et al.*, 2011).

El pasto africano (*Eragrostis lehmanniana*) es una especie invasora que afecta los pastizales del norte de México y se caracteriza por ser de alta prolificidad, capacidad de establecimiento y baja apetencia para el ganado (Flanders *et al.*, 2006). Su hábito de crecimiento y rusticidad proveen al pasto africano de alta capacidad para invadir y dominar la composición de gramíneas en los pastizales donde se encuentra (Hupy *et al.*, 2004). Sin embargo, estas características también convierten al pasto africano en una especie atractiva

para rehabilitar pastizales con alto grado de degradación, donde otras especies no logran establecerse (McGlone y Huenneke, 2004). Antes de utilizar esta especie es importante que se someta a un programa de mejoramiento genético para aumentar su aceptación por el ganado y disminuir su capacidad invasora (O'Reagain y Mentis, 1989). No obstante, por ser una especie introducida en México, las poblaciones de pasto africano pudieran presentar una reducida variabilidad genética. Por lo que la mutagénesis es una alternativa que posibilita el mejoramiento del pasto africano, ya que es una técnica eficaz para generar variabilidad. Sin embargo, se desconoce la dosis con mayor probabilidad para producir mutaciones efectivas en esta especie.

Por lo anterior, el objetivo fue determinar la dosis letal media y la reducción media del crecimiento para determinar la dosis óptima de irradiación gamma e inducir mutagénesis en pasto africano.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El experimento se llevó a cabo en condiciones de laboratorio e invernadero. Se evaluaron 10 dosis de irradiación en semilla que consistieron en 0 (tratamiento testigo), 100, 200, 300, 450, 600, 900, 1400, 2000 y 4000 Gray (Gy). La irradiación de la semilla se realizó en el Complejo MOSCAMED de SENASICA-SAGARPA en Metapa de Domínguez, Chiapas, México, en colaboración con el Campo Experimental Rosario Izapa, Chiapas del INIFAP. Las dosis se aplicaron en un irradiador panorámico Gamma Beam 127 MDS Nordion, con fuente de almacenamiento de 50 g de cobalto 60 ( $\text{Co}^{60}$ ) en seco.

### **Prueba de Germinación**

Se utilizaron cajas Petri de 90 mm de diámetro provistas de algodón y papel filtro. Esta prueba se condujo bajo un diseño experimental completamente al azar, donde la unidad experimental fue la caja Petri con 50 semillas y se utilizaron cuatro repeticiones por dosis de radiación. Cada repetición fue humectada con 25 ml de agua al inicio de la prueba y posteriormente, se suministraron riegos por aspersión de 2.0 ml cada dos días, durante los 17 d que duró la prueba. Las cajas Petri se colocaron en a temperatura ambiente de  $28 \pm 2$  °C. Se consideró semilla germinada aquella que alcanzó 0.5 cm de plúmula o de radícula. Las variables evaluadas fueron porcentaje germinación (PG), índice de velocidad de germinación (Vge), longitud de plúmula (LP) y de radícula (LR). Para obtener LR y LP se dejaron crecer tres plántulas por caja Petri durante siete días después de germinadas. La Vge se calculó mediante la ecuación propuesta por Maguire (1962):

$$V_{ge} = \sum n_i/t$$

Dónde:  $V_{ge}$  = velocidad de germinación,  $n_i$  = número de semillas germinadas por día,  $t$  = día de la germinación.

### **Evaluación en Invernadero**

Para la prueba en invernadero se utilizaron las mismas dosis de irradiación que para la prueba de germinación con excepción de la dosis de 4000 Gy. Esta dosis se excluyó del análisis en invernadero debido a que no presentó germinación. Esta prueba se condujo bajo un diseño experimental en bloques al azar con 10 repeticiones por tratamiento. Se sembraron 20 semillas por maceta para asegurar emergencia y establecimiento y dejar un individuo (planta) por maceta. La siembra se realizó en bolsas de polietileno negro de 26 cm de altura por 18 cm de diámetro, perforadas en la parte inferior. Las bolsas se llenaron con 23 cm de suelo franco-arenoso de origen aluvial. Los riegos se suministraron hasta punto de saturación cada dos o tres días, según el desecamiento del suelo. La prueba se realizó en una sola fase de crecimiento durante 16 semanas de mayo a agosto de 2016, periodo en que la plantas alcanzaron la madurez. Las variables evaluadas fueron rendimiento de forraje (RF), producción de semilla (PS), número de tallos (NT), altura de planta (AP), diámetro de macollo (DM) e índice de concentración de clorofila (ICC). Para el PS se recolectó la totalidad de la semilla de cada planta y se colocó en bolsas de papel. Para el RF la biomasa se cortó a 5 cm del suelo y se colocó en bolsas de papel. Las muestras extraídas de forraje y semilla se secaron en estufa a 65 °C durante 72 h. Una vez secas las muestras se pesaron en balanza analítica marca Viper BC, Mettler. La AP se midió desde la base hasta el punto vegetal y

el NT se contabilizó en la base de la planta. El ICC se midió en la parte media de cinco hojas seleccionadas al azar con medidor marca Opti-Sciences, modelo CCM-200.

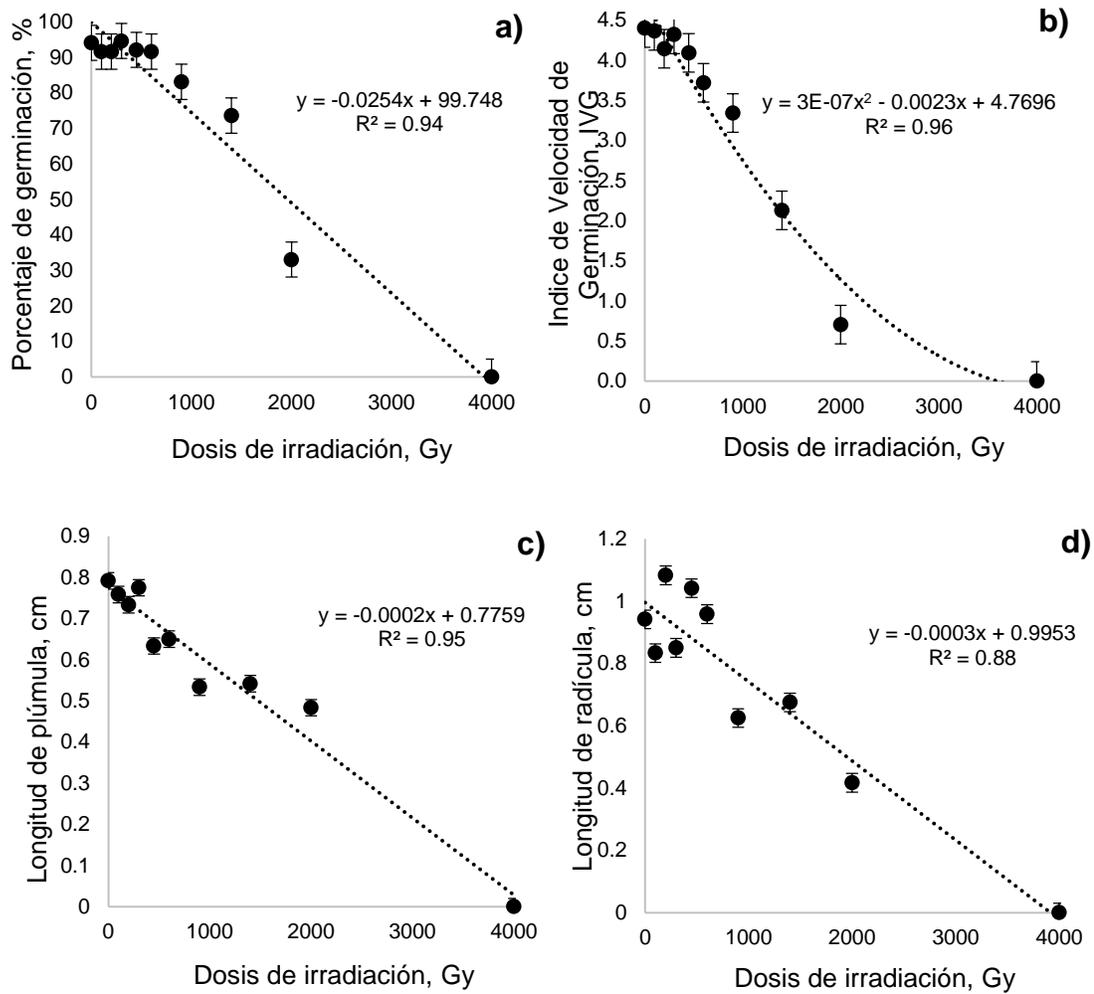
### **Análisis Estadístico**

Los datos se analizaron mediante análisis de tendencia para cada variable y se seleccionó el modelo de regresión que presentó mayor nivel de significancia. Con la ecuación de regresión resultante se estimó la  $DL_{50}$  con base en el PG. La  $RG_{50}$  se determinó en las variables Vge, LP, LR, RF, PS, NT, AP, DM e ICC. Los datos se analizaron mediante comparación de medias con la prueba de Dunnett a un  $\alpha=0.01$ , donde el factor de influencia fue la dosis de radiación. Los análisis se realizaron con el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS 9.1.3 (2006). Con los resultados de la  $DL_{50}$  y  $RG_{50}$  obtenidos de las 10 variables evaluadas, por medio de regresión, se obtuvo la media ponderada. La  $DL_{50}$  se ponderó con 30 %, mientras que el 70 % restante se dividió equitativamente entre los valores obtenidos de  $RG_{50}$  de las nueve variables. Cabe señalar que la mayor ponderación se le dio a la germinación, ya que la muerte del individuo claramente es el máximo daño que puede producir la radiación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al aumentar la dosis de irradiación, el comportamiento del PG mostró una tendencia lineal negativa ( $P < 0.0001$ ). No obstante, las únicas dosis que presentaron diferencias ( $P < 0.01$ ) con respecto al tratamiento testigo (T-0) fueron 1400, 2000 y 4000 Gy. En términos generales el PG tendió a disminuir conforme aumentó la dosis de irradiación (Gráfica 3a). Este resultado concuerda con diversos autores, quienes encontraron que la germinación de diferentes especies de gramíneas tiende a disminuir a medida que aumenta la dosis de radiación (Golubnova y Gecheff, 2011; Rajarajan *et al.*, 2016). Esto se debe a que la radiación ionizante puede deprimir o inhibir funciones vitales de las células, lo cual puede provocar la muerte de algunas células e incluso el embrión en la semilla. Este fenómeno tiende a aumentar con el incremento de la dosis de irradiación, lo que causa disminución de la germinación (Olasupo *et al.*, 2016). La ecuación de regresión indica que la  $DL_{50}$  en pasto africano se presentó a 2076.1 Gy.

Una de las gramíneas más estudiadas en cuestión de radiosensibilidad es el arroz (*Oryza sativa*). En esta especie Harding *et al.* (2012) al exponer a 13 variedades a radiación gamma encontraron que la  $DL_{50}$  varió entre 345 y 423 Gy. Otra especie gramínea donde se ha estudiado la radiosensibilidad es mijo perla (*Pennisetum glaucum*), donde la  $DL_{50}$  fue determinada en 669 Gy (Ousmane *et al.*, 2013). Con respecto a gramíneas forrajeras la  $DL_{50}$  ha sido determinada en pasto sudan (*Sorghum sudanense*), en esta especie Golubnova y Gecheff (2011), encontraron que la  $DL_{50}$  varió entre 307 y 342 Gy para diferentes variedades. No obstante, los resultados anteriores son



Gráfica 3. Efecto de diferentes dosis de irradiación con  $CO^{60}$  sobre el porcentaje de germinación (a), índice de velocidad de germinación (b), longitud de plúmula (c) y longitud de radícula (d) en pasto africano (*Eragrostis lehmanniana*).

inferiores a la  $DL_{50}$  obtenida en este estudio para el pasto africano. Esto probablemente se debe a que la semilla de esta especie guarda bajo contenido de humedad, ya que la radiación ionizante puede provocar ruptura de enlaces covalentes y descomposición de moléculas de agua. Lo cual forma radicales libres, que de manera indirecta pueden dañar diferentes organelos de la célula e incluso las moléculas de ADN dentro de ésta (Alegre, 2001).

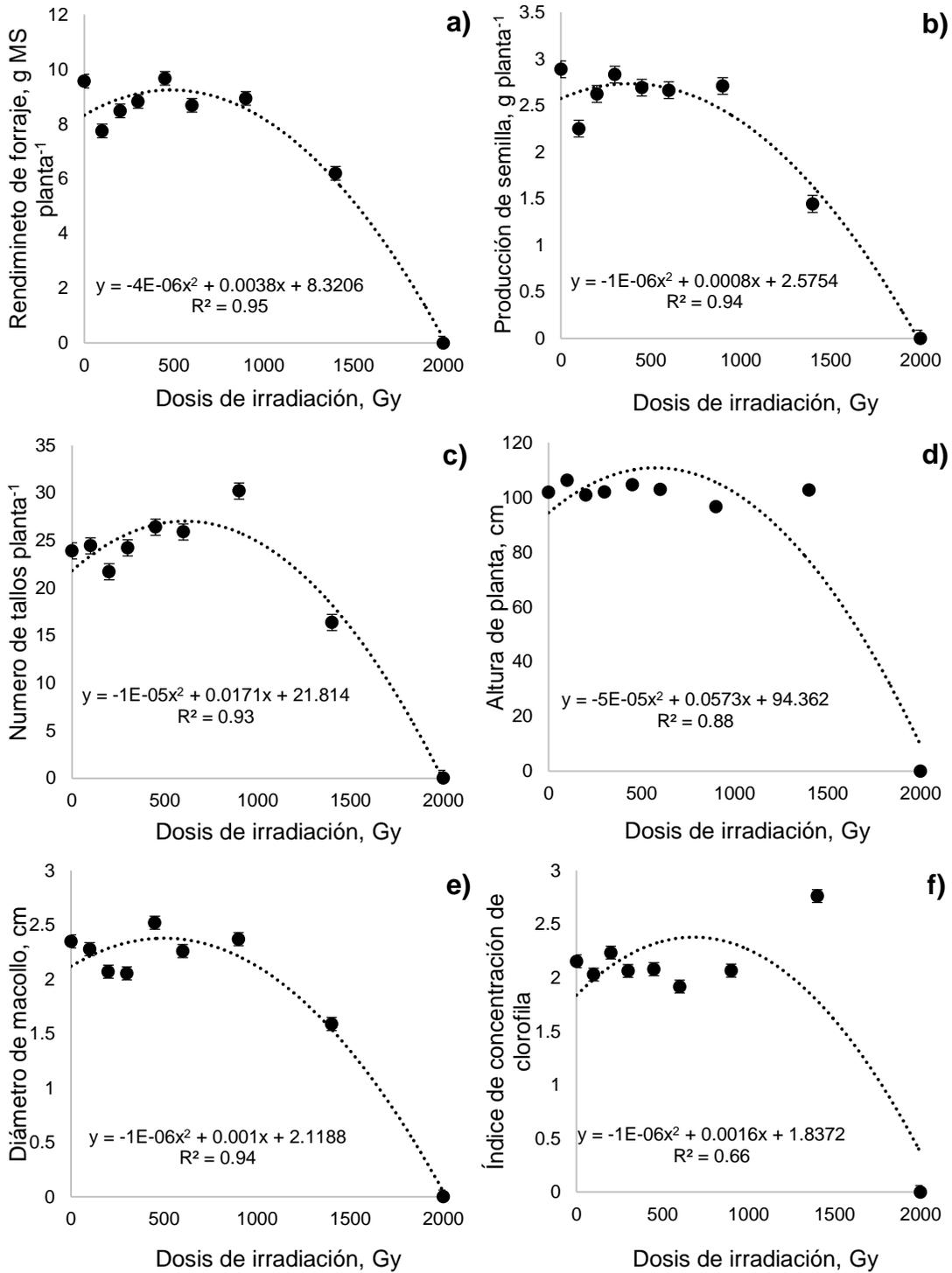
La Vge mostró una tendencia cuadrática ( $P < 0.0001$ ). Los tratamientos 100, 200, 300 y 450 Gy no presentaron diferencias ( $P > 0.01$ ) con el tratamiento testigo. De los 600 Gy en adelante, la semilla irradiada presentó menor Vge ( $P < 0.01$ ) con respecto al testigo (Gráfica 3b). Este retraso en la germinación de las semillas irradiadas probablemente se debe a que la radiación inhibe funciones vitales para la célula como la síntesis de proteínas y la actividad enzimática, lo cual retrasa la división celular y por tanto su germinación (Chandrashekar, 2014; Olasupo *et al.*, 2016). De acuerdo a la ecuación, en esta variable la  $RG_{50}$  se encontró a 1357.8 Gy.

La LP presentó una tendencia lineal negativa ( $P < 0.0001$ ). Sin embargo, la LP disminuyó de forma significativa ( $P < 0.01$ ) a partir de los 450 Gy (Gráfica 3c). Según la ecuación de regresión, en esta variable, la  $RG_{50}$  se ubicó en 1900.5 Gy. De manera similar, la LR mostró una tendencia lineal ( $P < 0.0001$ ). Para esta variable solamente los tratamientos con 900, 1400, 2000 y 4000 Gy tuvieron menor ( $P < 0.01$ ) LR que el tratamiento testigo (Gráfica 3d). La ecuación indica que en esta variable la  $RG_{50}$  se presentó a 1748.3 Gy. Los resultados de las variables anteriores, concuerdan con lo reportado por Ambavane *et al.* (2014), quienes encontraron que en finger millet (*Eleusine coracana*) la LP y la

LR se vieron afectadas por el incremento en la dosis de radiación. En este estudio se determinó la  $RG_{50}$  a 500 Gy. Este mismo efecto fue encontrado en arroz, donde la  $RG_{50}$  se registró a 250 y 450 Gy para ambas variables, respectivamente (Talebi y Talebi, 2012). La disminución en la elongación de la plúmula y radícula puede deberse a que la radiación ionizante comúnmente provoca retraso en la actividad metabólica y la división celular, lo cual retrasa el crecimiento de las plántulas (Chandrashekar, 2014; Olasupo *et al.*, 2016).

El comportamiento del RF mostró tendencia cuadrática ( $P=0.03$ ), no obstante, las únicas dosis que presentaron diferencias ( $P<0.01$ ) conforme al tratamiento testigo fueron 1400 y 2000 Gy (Gráfica 4a). Cabe señalar que todas las plántulas que emergieron de la dosis de 2000 Gy murieron antes de 21 d de edad. Debido a esto, la variable RF en este tratamiento fue cero y lo mismo ocurrió para las variables que se presenten en adelante. De acuerdo con la ecuación de regresión, en esta variable la  $RG_{50}$  se presentó a 1528.3 Gy. De manera similar, la PS presentó tendencia cuadrática ( $P<0.01$ ) y las únicas dosis que presentaron diferencias ( $P<0.01$ ) con el tratamiento testigo fueron 1400 y 2000 Gy (Gráfica 4b). De acuerdo con la ecuación de regresión y la PS la  $RG_{50}$  se presentó a 1536.2 Gy.

La variable NT mostró tendencia cuadrática ( $P=0.0008$ ). El único tratamiento diferente ( $P<0.05$ ) al testigo fue el de 2000 Gy (Gráfica 4c). En esta variable, la  $RG_{50}$  se obtuvo en 1648.7 Gy. De igual manera, la AP mostró tendencia cuadrática ( $P<0.0001$ ) y el único tratamiento diferente ( $P<0.05$ ) al T-0 fue el de 2000 Gy (Gráfica 4d). De acuerdo con esta variable, la  $RG_{50}$  se



Gráfica 4. Efecto de diferentes dosis de irradiación con  $CO^{60}$  sobre el rendimiento de forraje (a), producción de semilla (b), numero de tallos (c), altura de planta (d), diámetro de macollo (e) e índice de concentración de clorofila (f) en pasto africano (*Eragrostis lehmanniana*).

presentó a 1666.9 Gy. El DM presentó tendencia cuadrática ( $P=0.01$ ). En esta variable, los tratamientos que presentaron diferencias ( $P<0.01$ ) con respecto al T-0 fueron 1400 y 2000 Gy (Gráfica 4e). De acuerdo a la ecuación de regresión y el DM, la  $RG_{50}$  se presentó a 1592.6 Gy. El ICC presentó comportamiento cuadrático ( $P=0.0008$ ). Al igual que en la variable anterior, los tratamientos con diferente ICC ( $P<0.01$ ) respecto al testigo fueron 1400 y 2000 Gy; sin embargo, en la dosis de 1400 Gy, el ICC presentó un incremento ( $P<0.01$ , Figura 4f). De acuerdo con el ICC la  $RG_{50}$  se presentó a 1983.5 Gy. La media ponderada de la  $DL_{50}$  y la  $RG_{50}$  resultantes de las nueve variables fue de 1533 Gy.

Las variables RF, PS, NT, AP, DM disminuyeron conforme se incrementó la dosis de radiación. Este resultado probablemente se debe a que la exposición a radiación gamma frecuentemente causa la destrucción de compuestos de importancia para el desarrollo vegetal, como auxinas y ácido ascórbico (Shah *et al.*, 2008). Además, puede deberse a que la radiación puede causar daños en la estructura del ADN que en la mayor parte de las ocasiones afecta de forma negativa el desarrollo de las plantas (Kiong *et al.*, 2008). Por otro lado, el ICC presentó un incremento con la dosis de 1400 Gy. Lo que concuerda con Jan *et al.* (2013), quienes encontraron que la radiación puede activar el sistema de los pigmentos fotosintéticos. Lo anterior confirma que el comportamiento del pasto africano pudo haber sido influenciado por una radio estimulación, por la modificación ocurrida en el ICC. En este sentido, determinar la dosis óptima de radiación ayudará para realizar futuros trabajos en mutagénesis.

En la semilla irradiada a 2000 Gy hubo emergencia de plántulas, no obstante, ninguna logró sobrevivir más de dos semanas. Este fenómeno pudo deberse a que la radiación haya provocado un desorden metabólico en el pasto africano. Este mismo efecto se reportó por Murcu *et al.* (2013), quienes encontraron que las plántulas de maíz que emergieron de semilla irradiada con dosis mayores a 500 Gy, no fueron capaces de sobrevivir más de 10 d. La  $DL_{50}$  y las  $RG_{50}$  en este estudio variaron desde 1357 hasta 2076 Gy.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La reducción en reducción en la germinación y las demás variables evaluadas permitió determinar la dosis letal media y la reducción media del crecimiento en pasto africano (*Eragrostis lehmanniana*). No obstante, para inducir variabilidad genética que posibilite la selección y mejoramiento genético de esta especie, se recomienda utilizar la media ponderada de ambos parámetros, la cual se obtuvo a 1533 Gy. Estos resultados permitirán la inducción de nuevo material genético de interés agronómico y ecológico, que pueda utilizarse para rehabilitar pastizales degradados.

## LITERATURA CITADA

- Akgüm, I. y M. Tosun. 2004. Agricultural and cytological characteristics of M1 perennial rye (*Secale montanum* Guss.) as affected by the application of different doses of gamma rays. PJBS. 7:827-833.
- Alegre, B. N. 2001. Reacción celular ante la radiación. Radiobiología 1:9-11.
- Ambavane, A. R., S. V. Sawardekar, S. A. Sawantdesai y N. B. Gokhale. 2014. Studies on mutagenic effectiveness and efficiency of gamma rays and its effect on quantitative traits in finger millet (*Eleusine coracana* L. Gaertn). J. Radiat. Res. Appl. Sci. 8:120-125.
- Ángeles-Espino, A., A. J. Valencia-Botín, G. Virgen-Calleros, C. Ramírez-Serrano, L. Paredes-Gutiérrez y S. Hurtado-De la Peña. 2013. Determinación de la dosis letal (DL<sub>50</sub>) con Co<sup>60</sup> en vitroplántulas de *Agave tequilana* var. Azul. Rev. Fitotec. Mex. 36:381-386.
- Chandrashekar, K. R. A. 2014. Gamma sensitivity of forest plants of Western Ghats. J. Environ. Radioact. 132:100-107.
- Flanders, A., W. Kuvlesky, D. Ruthven, R. Zaiglin, R. Bingham, T. Fulbright, F. Hernández y L. Brennan. 2006. Effects of invasive exotic grasses on South Texas rangeland breeding birds. The Auk 123:171-182.
- Golubinova, I. y K. Gecheff. 2011. M1 cytogenetic and physiological effects of gamma-rays in sudan grass (*Sorghum Sudanense* (piper.) stapf). Bulg. J. Agric. Sci. 17:417-423.
- Harding, S. S., S. D. Johnson, D. R. Taylor, C. A. Dixon y M. Y. Turay. 2012. Effect of gamma rays on seed germination, seedling height, survival percentage and tiller production in some rice varieties cultivated in Sierra Leone. Am. J. Exp. Agric. 2:247-255.
- Hupy, C. M., W. G. Whitford y E. C. Jackson. 2004. The effect of dominance by an alien grass species, Lehmann lovegrass, *Eragrostis lehmanniana*, on faunal pedoturbation patterns in North American Desert grasslands. J. Arid Environ. 58:321-334.
- Jan, S., T. Parween, R. Hameed, T. O. Siddiqi y Mahmooduzzafar. 2013. Effects of presowing gamma irradiation on the photosynthetic pigments, sugar content and carbon gain of *Cullen corylifolium* (L.) Medik. Chileanjar 74:345-350.
- Khalil, S. A., R. Zamir y N. Ahmad. 2014. Effect of different propagation techniques and gamma irradiation on major steviol glycoside's content in *Stevia rebaudiana*. JAPS 24:1743-1751.

- Kiong, A. L. P., A. G. Lai, S. Hussein y A. R. Harun. 2008. Physiological responses of *Orthosiphon stamineus* plantlets to gamma irradiation. *Am. Eurasian J. Sustain. Agric.* 2:135–149.
- Maguire, J. D. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci.* 2:176-177.
- Marcu, D., G. Damian, C. Cosma y V. Cristea. 2013. Gamma radiation effects on seed germination, growth and pigment content, and ESR study of induced free radicals in maize (*Zea mays*). *J. Biol. Phys.* 39:625-634.
- McGlone, M. C. y F. Huenneke. 2004. The impact of a prescribed burn on introduced Lehmann lovegrass versus native vegetation in the northern Chihuahuan Desert. *J. Arid Environ.* 57:297-310.
- Olasupo, F. O., C. O. Ilori, B. P. Forster y S. Bado. 2016. Mutagenic Effects of Gamma Radiation on Eight Accessions of Cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). *Am. J. Plant Sci.* 7:339-351.
- O'Reagain, P. J. y M. T. Mentis. 1989. The effect of plant structure on the acceptability of different grass species to cattle. *JGSSA.* 6:163-170.
- Ousmane, S. D., W. Elegba y K. Danso. 2013. Radio-sensibility of pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) and cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seeds germination and seedling growth. *IJIAS.* 4:665-671.
- Rajarajan, D., R. Saraswathi y D. Sassikumar. 2016. Determination of lethal dose and effect of gamma ray on germination percentage and seedling parameters in ADT (R) 47 rice. *IJABR.* 6:328-332.
- Ramchander, S., R. Ushakumari y M. A. Pillai. 2015. Lethal dose fixation and sensitivity of rice varieties to gamma radiation. *Indian J. Agr. Res.* 49:24-31.
- Shah, T. M., J. I. Mirza, M. A. Haq y B. M. Atta. 2008. Radio sensitivity of various chickpea genotypes in M1 generation I-Laboratory studies. *Pakistan J. Bot.* 40:649–665.
- Songsri, P., B. Suriharn, J. Sanitchon, S. Srisawangwong y T. Kesmala. 2011. Effects of gamma radiation on germination and growth characteristics of physic nut (*Jatropha curcas* L.). *J. Biol. Sci.* 11:268-274.
- Talebi, A. B. y A. B. Talebi. 2012. Radiosensitivity study for identifying the lethal dose in MR219 (*Oryza sativa* L. spp. *Indica* cv. MR219). *IJASRT* 2:63-67.
- Thole, V., A. Peraldi, B. Worland, P. Nicholson, J. H. Doonan y P. Vain. 2011. T-DNA mutagenesis in *Brachypodium distachyon*. *J. Exp. Bot.* 10:1-10.

**ESTUDIO III. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, NUTRICIONAL,  
ESTOMÁTICA Y MOLECULAR DE MUTANTES M1 DE PASTO GARRAPATA  
(*Eragrostis superba*)**

## RESUMEN

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, NUTRICIONAL, ESTOMÁTICA Y MOLECULAR DE MUTANTES M1 DE PASTO GARRAPATA (*Eragrostis superba*)

POR:

M. C. ALAN ÁLVAREZ HOLGUÍN

Doctorado en Philosophia

Secretaría de Investigación y Posgrado

Facultad de Zootecnia y Ecología

Universidad Autónoma de Chihuahua

Presidente: Dr. Carlos Raúl Morales Nieto

El pasto garrapata (*Eragrostis superba*) es una especie utilizada para rehabilitar pastizales degradados a nivel mundial. No obstante, puede presentar baja calidad nutricional y tolerancia al estrés hídrico en comparación con otras gramíneas. Por esta razón, el objetivo fue caracterizar la diversidad morfológica, nutricional, estomática y molecular inducida mediante radiación gamma en pasto garrapata. Esto para seleccionar nuevo material genético de interés agronómico y ecológico, que pueda utilizarse para rehabilitar pastizales degradados. Se irradia semilla de pasto garrapata mediante radiación gamma con  $\text{Co}^{60}$ . Las dosis utilizadas fueron 0 (testigo), 100, 200, 300, 450, 600, 900, 1400 y 2000 Gy. Bajo condiciones de invernadero se produjeron 10 plantas por dosis y se evaluaron en floración y madurez, a través de 10 caracteres morfológicos relacionados con calidad de forraje. Los individuos con características sobresalientes fueron seleccionados y caracterizados nutricional,

estomática y molecularmente mediante marcadores AFLP. Todos los mutantes seleccionados presentaron menor ( $P < 0.01$ ) contenido de lignina respecto al testigo, en ambas etapas fenológicas. Los mutantes 200-3 y 200-7 presentaron mayor ( $P < 0.01$ ) contenido de proteína que el testigo, en la etapa de madurez. Además, los mutantes presentaron diferencias ( $P < 0.01$ ) en densidad y área estomática. Así mismo, presentaron amplia variación genética respecto al testigo, con distancias genéticas desde 0.37 hasta 0.57 según el coeficiente de DICE. La variabilidad fenotípica y genética presentada permitió seleccionar mutantes M1 de mejor valor nutricional y características del aparato estomático. En caso de lograr fijar estas características en las siguientes generaciones se contará con nuevo material genético de interés agronómico y ecológico para rehabilitar pastizales degradados.

## ABSTRACT

### MORPHOLOGICAL, NUTRITIONAL, STOMATAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF M1 MUTANTS OF WILMAN LOVEGRASS

(*Eragrostis superba*)

BY:

ALAN ÁLVAREZ HOLGUÍN

Wilman love grass (*Eragrostis superba*) is a species used worldwide to rehabilitate degraded grasslands. However, it could present lower quality and water stress tolerance than other grass species. Thus, the objective was to characterize the morphological, nutritional, stomatal and molecular diversity induced through gamma radiation on Wilman lovegrass. This in order to select new genetic materials of agronomic and ecological interest, which can be used to rehabilitate degraded grasslands. Seed were irradiated through gamma radiation with  $^{60}\text{Co}$ . The doses evaluated were 0 (control), 100, 200, 300, 450, 600, 900, 1400 and 2000 Grays (Gy). There were produced under greenhouse condition 10 plants per doses, which were evaluated through 10 morphological characters related with forage quality, on flowering and maturity stages. Individuals with outstanding characteristics were selected and characterized nutritionally, stomatal and molecularly by AFLP molecular markers. All mutants selected presented less lignin ( $P<0.01$ ) than the control, in both phonological stages. The mutants 200-3 y 200-7 obtained a higher ( $P<0.01$ ) protein content in maturity than the control. In addition, there were differences ( $P<0.01$ ) between mutants and control on stomatal density and area. Also, mutants and control were wide different genetically, with genetic distances from 0.37 to 0.57

according to the Dice coefficient. The phenotypic and genetic variability presented allowed to select M1 mutants with better nutritional quality and stomatal characteristics. In case of being able to fix these characteristics in the following generations, there will be available new genetic material of agronomic and ecological interest that can be used rehabilitating degraded grasslands.

## INTRODUCCIÓN

El pasto garrapata [*Eragrostis superba* (Peyr.)] es una especie empleada a nivel mundial para rehabilitar pastizales degradados. En la actualidad puede encontrarse en diferentes países como Kenia, México, Estados Unidos y Pakistán (Lazarides, 1997; Ullah *et al.*, 2006; Mganga *et al.*, 2013; Sáenz-Flores *et al.*, 2015). Esto se debe a que presenta alta capacidad de establecimiento, producción de forraje, valor forrajero, capacidad para retener suelo e infiltrar agua (Mganga *et al.*, 2010; Mganga *et al.*, 2013). Por esta razón, el pasto garrapata es considerado como una de las gramíneas con mayor potencial para ser utilizadas en programas de restauración (Manyeki *et al.*, 2015; Sáenz-Flores *et al.*, 2015). No obstante, esta especie presenta menor contenido de proteína y mayor contenido de lignina que otros pastos utilizados a nivel mundial, como buffel (*Pennisetum ciliare*), klein (*Panicum coloratum*) y llorón (*Eragrostis curvula*) (Sanderson *et al.*, 1999). Así mismo, otro problema que presenta es su baja tolerancia al estrés hídrico y eficiencia en el uso del agua (Kipchirchir *et al.*, 2015; Koech *et al.*, 2015). Debido a esto, el pasto garrapata puede ser considerado para un programa de mejoramiento genético. Sin embargo, es una especie introducida en la mayor parte de los países donde se utiliza; por lo que en ellos probablemente existe poca diversidad genética de esta especie. En este sentido, la mutagénesis es una alternativa viable para el mejoramiento genético de esta especie, debido a que ha demostrado ser una técnica efectiva para inducir variabilidad genética (Aloowalia *et al.*, 2004).

La anatomía de las hojas (ancho y largo), la proporción hoja-tallo, la altura de planta y forraje son de los principales factores que afectan el valor

forrajero en gramíneas (Prakash *et al.*, 2010). Por otro lado, algunos de los principales aspectos que determinan la tolerancia al estrés hídrico y la eficiencia en el uso del agua, son la densidad y área estomática (Xu y Zhoy, 2008; Franks *et al.*, 2015). La modificación de estas características podría inducir un incremento del valor forrajero, tolerancia al estrés hídrico y uso eficiente del agua en pasto garrapata. Por lo anterior, el objetivo fue caracterizar la diversidad morfológica, nutricional, estomática y molecular inducida mediante radiación gamma en pasto garrapata. Esto para seleccionar nuevo material genético de interés agronómico y ecológico, que pueda utilizarse para rehabilitar pastizales degradados.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El experimento se llevó a cabo en condiciones de invernadero en la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Las dosis de irradiación evaluadas fueron: 0, 100, 200, 300, 450, 600, 900, 1400 y 2000 Gy. El material irradiado fue semilla comercial de pasto garrapata, variedad Palar. Los tiempos de exposición para las dosis evaluadas fueron determinadas utilizando el sistema Gafchromic dosimetry y una cámara de ionización marca RADCAL modelo Acudose Serie 4094118, USA. La irradiación de la semilla se realizó en el Complejo MOSCAFRUT SAGARPA//IICA en Metapa de Domínguez, Chiapas, México en colaboración con el Campo Experimental Rosario Izapa, Chiapas del INIFAP. Las dosis se aplicaron dentro de un irradiador panorámico tipo Gamma Beam Modelo GB-127 MDS Nordion, con fuente de almacenamiento en seco, con una actividad de 15,000 Curies de  $\text{Co}^{60}$ . La semilla estuvo estática al momento de la irradiación para uniformizar la aplicación de los tratamientos. Los tipos de exposición y la distancia del material a la fuente radioactiva variaron según la dosis. Esto se debe a que para alcanzar las dosis altas el material se acercó a la fuente radiactiva para disminuir el tiempo de exposición.

### **Caracterización Morfológica**

La prueba se condujo bajo un diseño experimental completamente al azar. Si bien se utilizaron 10 plantas por dosis de irradiación se analizaron como individuos y no como tratamiento. Las plantas se identificaron de acuerdo a la dosis de irradiación de la que provienen y el número de planta que tiene dentro de ese tratamiento; ejemplo: la planta 100-6 proviene de la dosis de 100 Gy y

es la planta seis dentro de ese tratamiento. Para asegurar emergencia y establecimiento se sembraron 20 semillas por maceta; sin embargo, solamente se dejó una planta por maceta. La siembra se realizó en bolsas negras de polietileno de 26 cm de altura por 18 cm de diámetro, perforadas en la parte inferior. Las bolsas se llenaron con 23 cm de suelo franco-arenoso de origen aluvial y los riegos se suministraron cada dos o tres días hasta punto de saturación, según el desecamiento del suelo. La evaluación se llevó a cabo en el año 2016 en dos etapas fenológicas durante un período de 240 d. La primera se realizó de abril a julio durante la etapa de floración y la segunda de agosto a noviembre durante la etapa de madurez. En ambas evaluaciones, las variables analizadas fueron peso de tallos (PT), peso de hojas (PH), peso total (PTO), proporción hoja-tallo (PHT), largo de hoja (LH), ancho de hoja (AH), altura de planta (AP), altura de follaje (AF), proporción follaje-altura de planta (PFA) e índice de concentración de clorofila (ICC). Para la cuantificación de los pesos se cortó a cinco cm del suelo el total de la biomasa aérea y se separó tallos y hojas. Las muestras extraídas se secaron en una estufa de aire forzado a 65 °C durante 72 h. Una vez secas las muestras fueron pesadas en una balanza analítica A&D modelo GF-200, con precisión de 0.01 g. Con esto se obtuvo el PT y PH, y con la suma de ambos el PTO. La PHT se obtuvo del cociente de la división del PH entre el PT. El LH se midió desde la lígula hasta el ápice de la hoja y el AH se midió en la parte media de la lámina. Ambos se midieron en tres hojas seleccionadas al azar y se promediaron. Para obtener la AP se midió desde el suelo hasta la punta del tallo más alto de la planta y para la AF se midió del suelo hasta el término de la parte con mayor densidad de hojas. La

PFA se obtuvo del cociente de la división del AF entre el AP. El ICC se cuantificó con un dispositivo Opti-Sciences, modelo CCM-200 y se midió en la parte media de tres hojas seleccionadas al azar.

La temperatura (T) media durante el experimento fue de  $23.7 \pm 5.6$  °C, con una mínima de 10.1 y máxima de 44.7 °C. La humedad relativa (HR) media fue de  $52.0 \pm 16.8$  %. Las mediciones para caracterizar T y RH se realizaron con una sonda modelo HMP60 (Vaisala, Woburn, MA, USA). Estos datos se registraron en un datalogger CR1000 (Campbell Scientific Inc., Logan, UT, USA).

### **Caracterización Nutricional**

La caracterización nutricional se realizó en el laboratorio de nutrición animal de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Los mutantes seleccionados como sobresalientes en la caracterización morfológica y las plantas testigo fueron los únicos analizados en la caracterización nutricional. Las variables analizadas fueron porcentaje de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), lignina detergente ácido (LDA), celulosa, hemicelulosa y proteína cruda (PC). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado para cada una de las variables. Para este análisis, las muestras fueron molidas en un molino Wiley® con malla de 1 mm. Las muestras de los mutantes fueron molidas y analizadas individualmente, mientras que las 10 plantas testigo se molieron en conjunto. Las concentraciones de FDN, FDA y LDA se obtuvieron por el método descrito por Goering y Van Soest (1970). Estas variables se obtuvieron secuencialmente en el analizador de fibras ANKOM<sup>200</sup> y se utilizaron bolsas filtro Ankom® F57 de

30 micrones de tamaño de poro. La hemicelulosa y celulosa se calcularon mediante la diferencia entre FDN y FDA, y entre FDA y LDA, respectivamente. La PC se estimó mediante el método de combustión de Dumas con el dispositivo LECO modelo FP-528 y se analizaron 150 mg de forraje seco por cada muestra.

### **Caracterización Estomática**

La caracterización estomática se realizó en los mutantes seleccionados de las etapas anteriores y en las 10 plantas testigo. La evaluación se llevó a cabo en la etapa de floración 120 d después de la emergencia. Las variables analizadas fueron densidad estomática del envés (DEE), densidad estomática del haz (DEH), área estomática del envés (AEE) y área estomática del haz (AEH). Estas se evaluaron en cinco hojas seleccionadas al azar por cada planta. En cada hoja se aplicó barniz de uñas transparente en un segmento de aproximadamente un cm, en el sentido de las nervaduras. Este procedimiento se realizó en el haz y en el envés, se dejó secar por 20 min y se retiró el barniz con pinzas de disección. Las muestras se colocaron en un porta objetos y se cubrieron con un cubre objetos. Posteriormente, las muestras se observaron en contraste de fases en un microscopio Zeiss modelo Axio Imager 2 a 400x. En cinco campos ópticos de  $0.0945 \text{ mm}^2$  por muestra y seleccionados al azar se tomaron fotografías. Esto se realizó con una cámara Zeiss AxioCam MRc5 y luego se traspoló a  $1 \text{ mm}^2$ . En cada campo óptico se contabilizó la densidad de estomas y el área estomática de tres estomas seleccionadas al azar, la cual se midió por medio del software Zen 2 core. En total se evaluaron 25 campos ópticos y 75 estomas por planta, tanto por el haz como por el envés.

## **Caracterización Molecular**

La caracterización molecular se llevó a cabo mediante marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Esto se realizó en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Unidad Irapuato, Guanajuato. Para el análisis se seleccionaron dos hojas jóvenes y sanas de cada mutante, de las cuales se tomó una muestra de 100 mg. Para el testigo se tomó un fragmento de hoja de cada una de las 10 plantas testigo hasta completar 100 mg de muestra. Las muestras fueron introducidas en tubos de microcentrífuga y se sumergieron en nitrógeno líquido hasta que se congelaron. Posteriormente, fueron liofilizadas y molidas en un homogeneizador de tejidos TissueLyser II de Qiagen, dos veces por 30 s a 30 Hz. La extracción del ADN se realizó por medio del Kit comercial DNeasy® Plant Mini Kit de Qiagen, siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras se cuantificaron en un espectrofotómetro Nanodrop 8000 (Thermo) y la calidad del ADN se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, teñido con GelRed.

Los marcadores AFLP se realizaron mediante el kit AFLP template de LICOR Biosciences, de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Para ello, las muestras de ADN se diluyeron en agua desionizada para homogenizarlas a una concentración  $50 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  de ADN. Posteriormente, se siguieron los siguientes procedimientos: Primeramente la digestión se llevó a cabo con 2.5  $\mu\text{l}$  de solución amortiguadora de reacción (RL) 5X, 1  $\mu\text{l}$  Mix de Enzimas EcoR1 y Mse1, 2  $\mu\text{l}$  de ADN diluido y se llevó la reacción hasta un volumen de 12.5  $\mu\text{l}$  con agua desionizada estéril. Todo se mezcló y se colocó en un termociclador

(Verity Applied Biosystems). La mezcla se incubó a 37 °C por 2 h y a 70 °C por 15 min, para inactivar las enzimas de restricción. Se corroboró en gel de agarosa al 1 % con GelRed. Posteriormente, para realizar la ligación de los adaptadores, a la reacción de la digestión se añadieron 2 µl del amortiguador de carga 6X ADN Loading Dye Blue, 12 µl de Adapter mix y 0.5 µl de T4 ADN Ligasa. Se incubó la muestra a 20 °C por 2 hr. Una vez realizada la ligación se realizó la pre-amplificación; para ello se añadieron 2.5 µl de DNA digerido, ligado y diluido 1:10, 20 µl AFLP Pre-Amp Primer Mix, que contiene los oligonucleótidos Eco RI + A y Mse I + C y 0.5 µl de dNTPs (10 mM). También 2.5 µl de Buffer Taq PCR 10X + KCl, 1.3 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.2 µl de enzima Taq DNA Polimerasa y 2.5 µl DNA digerido, ligado y diluido. Todo esto se mezcló, centrifugó y se puso en un termociclador; 20 ciclos a 94 °C por 30 seg, 56 °C por 1 min y 72 °C por 1 min. Las muestras se diluyeron en 1:30 en agua desionizada y se verificó en gel de agarosa al 1 % con GelRed. Se mezclaron 2 µl de amortiguador de carga 6X ADN Loading Dye Blue más 18 µl de ADN pre-amplificado. La amplificación selectiva se realizó a través de dos PCR con dos combinaciones de oligonucleótidos. En la primera se mezclaron 4.6 µl de H<sub>2</sub>O desionizada, 1.1 µl Buffer de amplificación 10X + KCl, 0.6 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.2 µl de Taq Polimerasa, 2 µl del oligonucleótido MseI + CTG (5 mM), 0.2 µl de dNTPs (10 mM), 0.5 µl de Oligo Eco RI + ACA (PET; 10 pm µl<sup>-1</sup>), 0.5 µl de Oligo Eco RI + ACT (NED; 10 pm µl<sup>-1</sup>). En la segunda se realizó la misma mezcla, pero con los Oligos Eco RI + AGA (VIC; 10 pm µl<sup>-1</sup>) y Oligo Eco RI + AGC (FAM; 10 pm µl<sup>-1</sup>). Ambas se colocaron en un termociclador con el siguiente programa: 1 ciclo de 94 °C por 30 s, 65 °C por 30 s, 72 °C por 1 min, 12 ciclos

de 94 °C por 30 s, 65 °C por 30 s, 72 °C por 1 min, 23 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s, 72 °C por 1 min. Por último, se mezclaron 2 µl del producto de cada PCR, 8 µl de formamida y 1 µl del estándar LIZ 500 GeneScan (Applied Biosystems), como marcador para determinar el tamaño de los fragmentos. La separación y detección de los fragmentos de los AFLP se realizó en el secuenciador automático 3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

### **Análisis Estadístico**

La parte de la caracterización morfológica se analizó por medio de análisis de componentes principales (ACP), mediante la matriz de correlación. La asociación de las variables originales con los componentes principales se determinó mediante análisis de correlación. Posteriormente, a los datos se les aplicó un análisis de agrupamiento (AC) por el método de ligamiento Ward. En este análisis, el número de grupos se determinó con base en los pseudo estadísticos F y T<sup>2</sup>. Adicionalmente, a los datos se les realizó un análisis de varianza multivariado (MANOVA) y contrastes ortogonales para evaluar las diferencias entre los grupos conformados por el AC. En la caracterización nutricional y estomática, los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias con la prueba de Dunnett, a un  $\alpha=0.01$ . Para el análisis de datos de la caracterización molecular se formó una matriz binaria de presencia y ausencia con el patrón de bandeo. La visualización de los electroferogramas y la conformación de la matriz se realizó por medio del software geneious R10. Los datos binarios fueron analizados por AC, mediante el programa SIMQUAL con el coeficiente Dice y el método de agrupamiento UPGMA (promedio aritmético por grupos de pares no ponderadas). Esto se

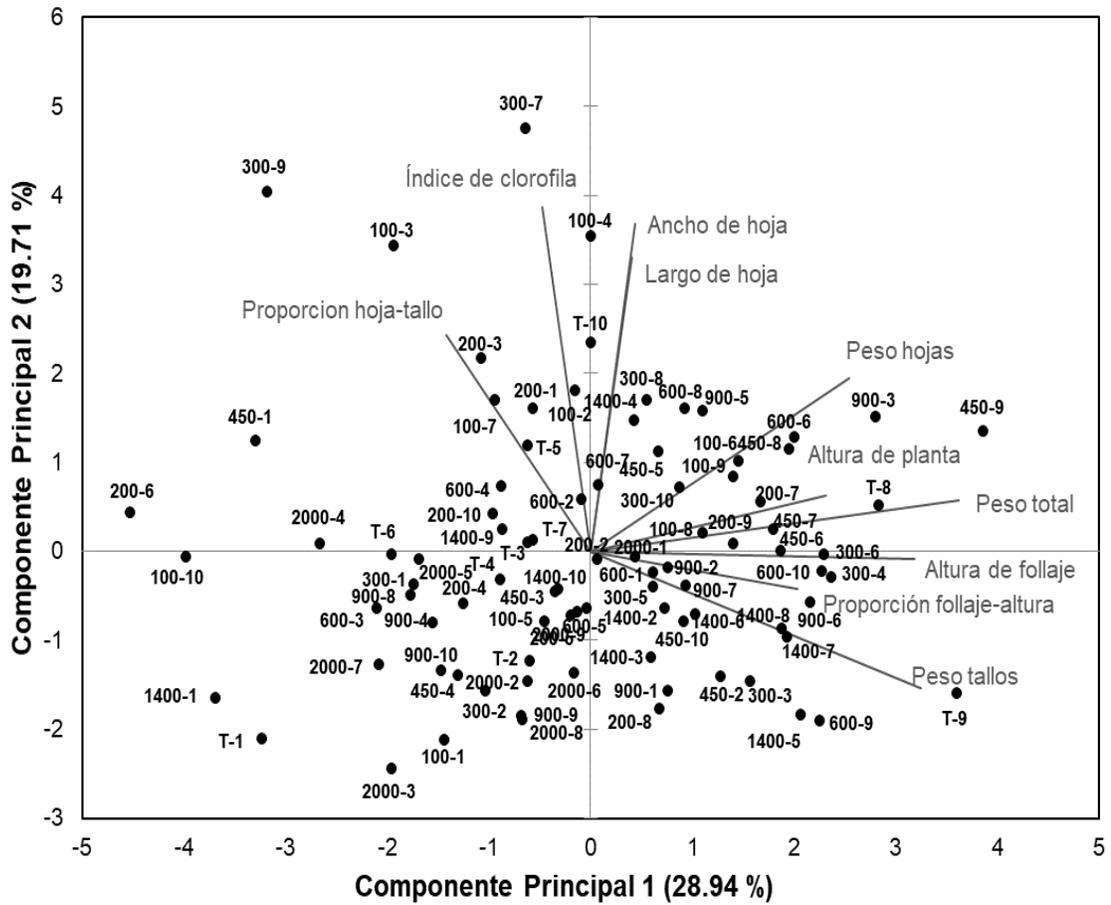
llevó a cabo por medio del paquete estadístico NTSYSpc. Los valores de Bootstrap se estimaron por medio del software Free Tree (Hapl *et al.*, 2001), con 2000 remuestreos. Por último, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992), donde se compararon los grupos conformados por el AC de los datos binarios. Esto se llevó a cabo empleando el software Info-Gen (Balzarini y Di Rienzo, 2004).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

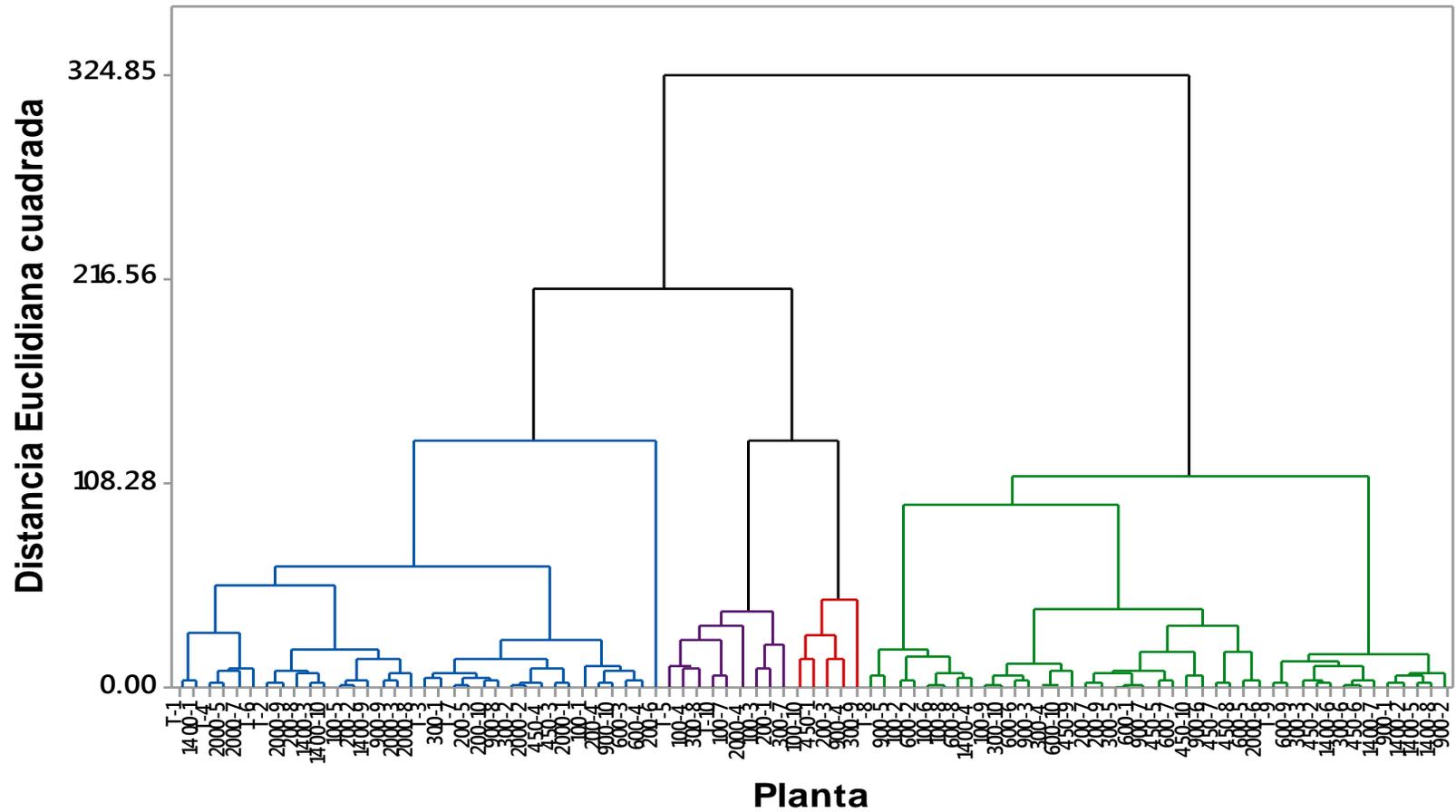
### Caracterización Morfológica

En la evaluación realizada en la etapa de floración, el análisis de componentes principales mostró que los tres primeros componentes principales (CP) explicaron el 64.5 % de la variación total. Las variables relacionadas con rendimiento de forraje tuvieron mayor contribución con el CP 1: peso de tallos (R= 0.88; P<0.0001), peso total (R= 0.77; P<0.0001), altura de follaje (R= 0.73; P<0.0001) y altura de planta (R= 0.55; P<0.0001). En el CP 2 fueron las relacionadas con calidad de forraje las de mayor contribución: peso de hojas (R= 0.63; P<0.0001), largo de hoja (R= 0.62; P<0.0001), ancho de hoja (R= 0.55; P<0.0001) e índice de concentración de clorofila (R= 0.57; P<0.0001) (Gráfica 5). El análisis de agrupamiento integro a cuatro grupos ( $R^2 = 0.71$ ) de acuerdo a los pseudo estadísticos F y  $T^2$ , los cuales según el MANOVA fueron diferentes entre sí (P<0.0001). No obstante, en solo uno de los grupos conformados no se integró alguna de las plantas testigo (Gráfica 6). Los mutantes integrados en este grupo se caracterizaron por ser los de mejores atributos para calidad de forraje.

En la etapa de madurez, los primeros tres CP explicaron el 70.4 % de la variación total. Las variables de mayor contribución con el CP 1 fueron peso de tallos (R= 0.76; P<0.0001), peso total (R= 0.65; P<0.0001), altura de planta (R= 0.88; P<0.0001) e índice de concentración de clorofila (R= 0.50; P<0.0001). En el CP 2 las variables de mayor contribución fueron peso de hojas (R= 0.8; P<0.0001), peso total (R= 0.67; P<0.0001), proporción hoja-tallo (R= 0.44;



Gráfica 5. Distribución de la diversidad morfológica de 80 mutantes y 10 individuos de la variedad Palar de pasto garrapata (*Eragrostis superba*), evaluados en etapa de floración. Dispersión en función de los dos primeros componentes principales con 10 variables evaluadas.



Gráfica 6. Dendrograma del análisis de 10 variables morfológicas evaluadas en etapa de floración para 80 mutantes y 10 individuos de la variedad Palar de pasto garrapata (*Eragrostis superba*), obtenido por el método de ligamiento Ward.

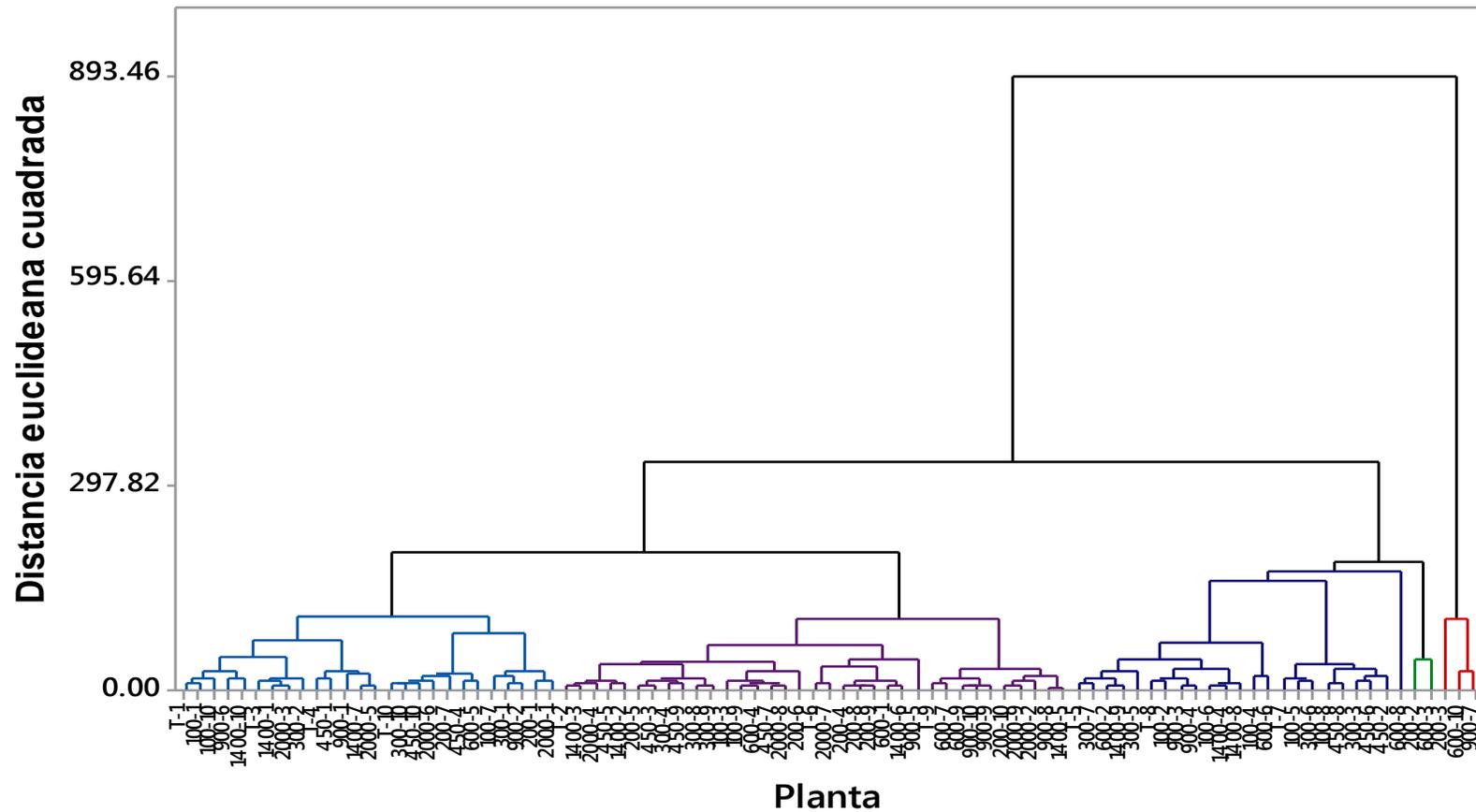
P<0.0001), altura de follaje (R= 0.83; P<0.0001) y relación follaje-altura de planta (R= 0.61; P<0.0001) (Gráfica 7). El AC separó a los individuos en cinco grupos ( $R^2= 0.96$ ), de los cuales, en dos no se integró ninguna planta testigo (Gráfica 8). Los mutantes integrados en estos grupos fueron los de mejores atributos para calidad de forraje. Además, todos los grupos fueron diferentes entre sí (P<0.0001).

En general, en ambas etapas fenológicas se encontró amplia variabilidad morfológica en ambas evaluaciones. Esto es congruente con diversas investigaciones donde a través del uso de irradiación gamma han logrado inducir variabilidad fenotípica en diversos cultivos, tanto para consumo humano como para forraje (Pongtongkam *et al.*, 2006; Rashid *et al.*, 2009; Abtahi y Arzani, 2013). Así mismo, los resultados coinciden con lo reportado por López *et al.* (2011), quienes lograron obtener nuevo germoplasma de pasto buffel, especie utilizada para rehabilitación de pastizales. Con base en la variabilidad morfológica inducida fue posible seleccionar seis mutantes como sobresalientes en atributos relacionados con calidad de forraje. Estos fueron dos provenientes de dosis de irradiación de 200 Gy (200-3 y 200-7), uno de 300 Gy (300-9), uno de 450 Gy (450-9) y tres de 600 Gy (600-3, 600-6 y 600-10).

### **Caracterización Nutricional**

De acuerdo con el análisis bioquímico, los mutantes seleccionados de la caracterización morfológica presentaron menor contenido de fibras totales que el testigo. En ambas etapas fenológicas presentaron menor (P<0.01) FDN (Cuadro 1). Lo anterior, representa una ventaja nutricional de los materiales mutantes frente al testigo. Esto se debe a que la digestibilidad de las





Gráfica 8. Dendrograma del análisis de 10 variables morfológicas evaluadas en etapa de madurez para 80 mutantes y 10 individuos de la variedad Palar de pasto garrapata (*Eragrostis superba*), obtenido por método de ligamiento Ward.

Cuadro 1. Composición bioquímica de siete mutantes y un testigo de pasto garrapata (*Eragrostis superba*) variedad Palar, en etapa de madurez y floración

Genotipo	Primer Corte (Floración)					
	FDN	FDA	Hemicelulosa	Celulosa	LDA	Proteína cruda
Testigo	75.6 ± 0.79	35.6 ± 0.50	39.9 ± 0.37	30.7 ± 0.38	4.87 ± 0.15	11.8 ± 0.25
200-3	70.0 ± 0.33*	33.2 ± 0.53*	36.8 ± 0.21*	30.4 ± 0.31	2.76 ± 0.23*	11.55 ± 0.07
200-7	71.1 ± 0.52*	34.6 ± 0.49	36.4 ± 0.08*	31.8 ± 0.52	2.75 ± 0.05*	11.77 ± 0.01
300-9	70.0 ± 0.29*	33.8 ± 0.46	36.2 ± 0.38*	31.3 ± 0.53	2.45 ± 0.13*	10.36 ± 0.07
450-9	69.3 ± 0.72*	35.2 ± 0.36	34.1 ± 0.59*	32.6 ± 0.18	2.59 ± 0.27*	8.8 ± 0.02*
600-3	70.0 ± 0.83*	32.0 ± 0.46*	38.0 ± 0.70	29.6 ± 0.47	2.42 ± 0.07*	12.71 ± 0.10
600-6	72.9 ± 0.39*	36.8 ± 0.39	36.1 ± 0.63*	34.2 ± 0.42*	2.54 ± 0.09*	10.61 ± 0.12
600-10	71.1 ± 0.73*	33.8 ± 0.41	37.3 ± 0.51*	31.2 ± 0.32	2.58 ± 0.3*	9.89 ± 0.75*
Segundo Corte (Madurez)						
Testigo	75.7 ± 0.58	37.5 ± 3.60	38.2 ± 4.17	31.2 ± 3.99	6.31 ± 0.39	4.36 ± 0.01
200-3	69.6 ± 0.91*	30.2 ± 3.02	39.3 ± 2.21	28.1 ± 0.20	2.09 ± 0.20*	5.28 ± 0.05*
200-7	65.4 ± 0.84*	29.4 ± 0.35	36.0 ± 0.64	26.8 ± 0.40	2.59 ± 0.05*	5.18 ± 0.09*
300-9	69.4 ± 0.97*	34.9 ± 0.57	34.5 ± 0.55	31.8 ± 0.55	3.02 ± 0.09*	4.84 ± 0.02
450-9	71.0 ± 0.92*	35.6 ± 0.21	35.4 ± 1.11	32.3 ± 0.05	3.30 ± 0.25*	4.43 ± 0.02
600-3	69.3 ± 1.21*	31.6 ± 0.54	37.6 ± 1.31	28.2 ± 0.61	3.41 ± 0.07*	4.42 ± 0.10
600-6	66.4 ± 0.67*	32.9 ± 0.16	33.5 ± 0.68	30.4 ± 0.08	2.46 ± 0.14*	4.42 ± 0.19
600-10	69.2 ± 0.55*	34.9 ± 0.52	34.2 ± 0.04	31.9 ± 0.33	3.03 ± 0.21*	4.84 ± 0.09

\*Diferencias estadísticas significativas (Dunnett; P<0.05). El testigo se obtuvo de una alícuota de 10 plantas sin irradiar.

gramíneas está relacionada con la acumulación de estructuras fibrosas durante el crecimiento. Por lo que entre menos fibras acumulen, más digestible será su forraje (Avila *et al.*, 2010). En floración todos los mutantes, con excepción del 600-3, presentaron menos ( $P<0.01$ ) hemicelulosa que el testigo; sin embargo, ninguno obtuvo menor ( $P>0.01$ ) contenido de celulosa. En madurez, ninguno de los mutantes presentó diferencias ( $P>0.01$ ) en contenido de hemicelulosa y celulosa con el testigo. No obstante, en ambos cortes todos los mutantes presentaron menor ( $P<0.01$ ) contenido de lignina, con una disminución de entre 46 y 77 % de lignina. Este resultado puede indicar un importante incremento en la calidad nutricional de los mutantes con relación al testigo, ya que la lignina es un componente indigestible. Además, debido a que este componente puede formar enlaces covalentes con los carbohidratos estructurales de la pared celular y limitar su digestión. Esto a causa de que las asociaciones lignina-hemicelulosa dificultan el acoplamiento y por lo tanto la acción de las enzimas microbianas (Capanema *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2010). Respecto al contenido de proteína, en la etapa de floración ninguno de los mutantes presentó mayor ( $P>0.01$ ) concentración de este nutriente; no obstante, los mutantes 450-9 y 600-10 obtuvieron menor ( $P<0.01$ ) porcentaje de PC que el testigo. En contraste, en la madurez los mutantes 200-3 y 200-7 presentaron mayor ( $P<0.01$ ) contenido de PC que el testigo, mientras que los demás no mostraron diferencias ( $P>0.01$ ; Cuadro 1). Este resultado podría indicar que estos mutantes son capaces de retener mayor contenido de proteína que el testigo, cuando la calidad del forraje disminuye. Como resultado del análisis nutricional, se excluyó al 450-9 de la selección de mutantes. Esto debido

a que en el primer corte presentó 25 % de contenido de proteína más que el testigo y en el segundo corte no presentó diferencias ( $P < 0.01$ ).

### **Caracterización Estomática**

Los mutantes 200-3, 200-7 y 300-9 presentaron mayor ( $P < 0.01$ ) densidad de estomas en el envés que el testigo. No obstante, en el haz el mutante 200-7 presentó menor ( $P < 0.01$ ) DE respecto al testigo, mientras que la DE en los mutantes 300-9 y 600-10 fue mayor ( $P < 0.01$ ). Respecto a el área estomática, los mutantes 200-3 y 600-6 mostraron menor ( $P < 0.01$ ) AEE que el testigo, mientras que el 300-9 obtuvo mayor ( $P < 0.01$ ) AEE. En el haz, el mutante 200-7 mostró mayor AE y el 300-9 menor AE ( $P < 0.01$ ), respecto al testigo (Cuadro 2).

La densidad y el área de los estomas son parámetros importantes en la ecofisiología de las plantas, ya que controlan la pérdida de agua por transpiración y la captura de  $\text{CO}_2$  (Lawson y Blatt, 2014; Lawson *et al.*, 2014). Está documentado que plantas con mayor DE presentan menor tasa de transpiración (Schlüter *et al.*, 2003; Franks y Beerling, 2009), lo cual se debe a que con DE bajas, la resistencia estomática aumenta y, en consecuencia, se limita el exceso de transpiración (Lawson y Blatt, 2014). El área estomática está relacionada con una mayor captura de  $\text{CO}_2$ , lo que puede beneficiar el rendimiento. Sin embargo, el AE puede también estar relacionada con el cierre y la apertura de los estomas. Estudios recientes señalan que estomas de menor tamaño pueden abrirse y cerrarse con mayor rapidez, lo que a su vez puede disminuir la evapotranspiración (Drake *et al.*, 2013; Raven, 2014; Fanourakis *et al.*, 2015). Sin embargo, existe información que demuestra que los estomas de las gramíneas poseen movimientos más rápidos que otras especies (Hetherington y Woodward, 2003),

Cuadro 2. Densidad y área estomática de seis mutantes y un testigo de pasto garrapata (*Eragrostis superba*) variedad Palar, tanto por haz como por envés

Genotipo	Densidad de estomas en el envés (mm <sup>2</sup> )	Densidad de estomas en el haz (mm <sup>2</sup> )	Área estomática en el envés (µm <sup>2</sup> )	Área estomática en el haz (µm <sup>2</sup> )
Testigo	114.0 ± 2.7	182.7 ± 4.7	368.0 ± 5.8	205.6 ± 4.3
200-3	138.2 ± 5.6*	179.1 ± 5.1	432.5 ± 6.3*	195.2 ± 6.2
200-7	146.0 ± 4.6*	160.3 ± 4.7*	355.0 ± 9.2	229.1 ± 5.3*
300-9	170.7 ± 8.8*	240.5 ± 10.5*	332.9 ± 5.4*	164.8 ± 4.5*
600-3	117.2 ± 5.5	189.5 ± 5.5	378.7 ± 8.4	196.8 ± 6.1
600-6	122.0 ± 5.9	196.1 ± 9.7	396.1 ± 6.4*	200.6 ± 5.3
600-10	118.5 ± 4.0	235.6 ± 8.6*	380.4 ± 6.5	207.0 ± 4.0

\*Diferencias estadísticas significativas (Dunnett; P<0.05). El testigo representa la media de 10 plantas sin irradiar.

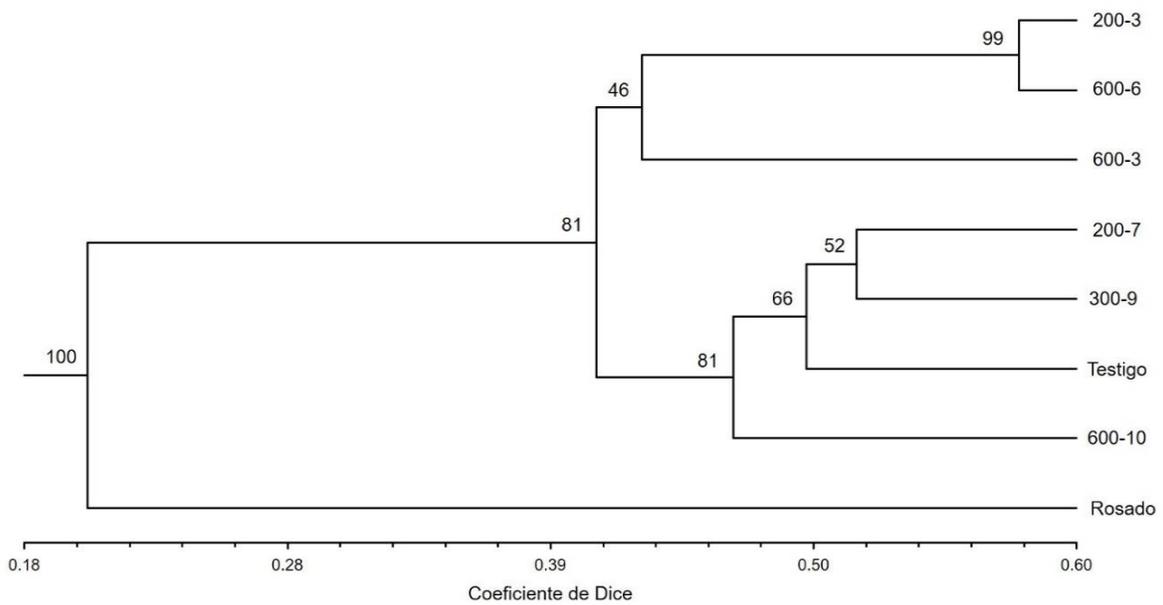
por lo que la tasa de evaporación de los mutantes con mayor AE, podría no verse tan afectada. Debido a la importancia de las características de los estomas, éstas incluso han sido foco de trabajos de manipulación genética. Un ejemplo de esto es una investigación realizada por Franks *et al.* (2015), quienes lograron aumentar la eficiencia en el uso del agua y disminuir la pérdida por transpiración en *Arabidopsis thaliana*, al inducir una disminución en la DE y un incremento en el AE. Por esta razón, el mutante 200-7 al presentar menor DE y mayor AE en el haz podría presentar menor pérdida por transpiración, ya que esta parte de la hoja es la que está expuesta al sol y es donde ocurre la mayor parte de la transpiración. Por otro lado, el 300-9 tendría menor eficiencia en el uso del agua debido a que presentó mayor DE y mayor AE en haz y envés que el testigo. Esto pudiera ser una desventaja, ya que el pasto garrapata comúnmente se utiliza en zonas áridas y semiáridas donde las tasas de evapotranspiración son más altas. En general, la mayoría de los mutantes presentaron cambios respecto al testigo en densidad y área estomática. Sin embargo, algunos de ellos presentaron un aumento y otros una disminución en ambos parámetros. Esto se debe a que la radiación produce cambios de manera aleatoria, por lo que cada individuo puede verse afectado de manera diferente a los demás (Abtahi y Arzani, 2013).

### **Caracterización Molecular**

El análisis de AFLP produjo 520 bandas y los valores de similitud del coeficiente de DICE variaron entre 0.37 y 0.57. En un estudio realizado por Tomas *et al.* (2013) encontraron distancias genéticas desde 0.21 hasta 0.62, al comparar genéticamente seis accesiones, un cultivar comercial y siete híbridos intraespecíficos de *Elymus scabrifolius* por medio de 328 AFLP. Por otro lado,

Rashid *et al.* (2009) con 282 bandas de AFLP obtuvieron distancias genéticas desde 0.32 hasta 0.78 al comparar mutantes de arroz (*Oryza sativa*), inducidos mediante radiación gamma. Así mismo, Abtahi y Arzani (2013) obtuvieron valores de coeficiente de DICE entre 0.43 y 0.89, al comparar 30 líneas mutantes de canola. Con base en lo anterior se puede considerar que existe alta diversidad genética entre los mutantes analizados. Esto debido a que los resultados obtenidos en este estudio son similares a las investigaciones antes mencionadas; aun y cuando en ellas se compararon mutantes, genotipos e incluso variedades comerciales.

El análisis de agrupamiento basado en datos moleculares separó a los mutantes de dos grupos (bootstrap= 81) (Gráfica 9). Estos grupos presentaron una distancia genética de 0.42, según el coeficiente de DICE. Además, de acuerdo con el AMOVA fueron significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) entre sí. No obstante, la mayor parte ( $P < 0.0001$ ) de la variación genética total (82.5 %) se presentó dentro de grupos (Cuadro 3). Este resultado indica que existe amplia variabilidad genética, aun y en los mutantes que se agruparon junto al testigo. Los mutantes de mayor distancia genética con el testigo fueron el 600-6 (0.35), 200-3 (0.41) y 600-3 (0.42) (Gráfica 5). Es importante señalar que los materiales seleccionados en este estudio son mutantes de primera generación (M1). Es decir que se desconoce si sus cambios fenotípicos fueron producidos por una modificación en el genoma o si son quimeras inducidas por efecto de la radiación en otros compuestos celulares. Debido a esto, es importante que se evalúen las siguientes generaciones de su progenie, hasta que la expresión de estos cambios quede fijada.



Gráfica 9. Análisis de agrupamiento de 10 mutantes y la variedad Palar (Testigo) de pasto garrapata (*Eragrostis superba*) mediante el coeficiente de Dice y el método de agrupamiento UPGMA, con base en 520 marcadores AFLP, generados con cuatro combinaciones de iniciadores. El pasto rosado (*Melinis repens*) se presenta como grupo externo.

Cuadro 3. Análisis molecular de varianza (AMOVA) entre dos grupos [3 mutantes vs 3 mutantes y un testigo] de pasto garrapata (*Eragrostis superba*) variedad Palar

Fuente de variación	GL	SC	CM	CV	%	P	Phi PT
Grupo	1	474080.5	474080.5	58225	17.5	0.0285	0.18
Dentro	5	1372260	274452	274452	82.5	<0.0001	
Total	6	1846340.5		332677	100		

GL= grados de libertad, SC= suma de cuadrados, CM= cuadrado medio, CV= componente de variación, %= porcentaje de variación, P= probabilidad, Phi PT= análogo al FST (estimador de la diferencia genética promedio) con 1000 permutaciones.

## **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

El uso de radiación gamma generó amplia variabilidad fenotípica y genética en pasto garrapata. Lo cual permitió seleccionar la primera generación de mutantes de mejor valor nutricional y características del aparato estomático. Se recomienda evaluar las siguientes generaciones de estos materiales, hasta fijar los caracteres seleccionados. En caso de lograr fijar estas características se contará con nuevo material genético de interés agronómico y ecológico que pueda utilizarse para rehabilitar pastizales degradados.

## LITERATURA CITADA

- Abtahi, M. y A. Arzani. 2013. Molecular and morphological assessment of genetic variability induced by gamma radiation in canola. JPMB. 1:69-84.
- Aloowalia, B. S., M. Maluszynski y K. Nichterlein. 2004. Global impact of mutation-derived varieties. Euphytica. 135:187-204.
- Avila, R. E., O. Di Marco, M. Agnusdei y C. Mayoral. 2013. Digestibilidad de la fibra y materia seca de dos gramíneas megatérmicas (*Chloris gayana* y *Cenchrus ciliaris*) de diferente porte: relación con la edad y largo foliar. Rev. Arg. Prod. Anim. 30:1-13.
- Balzarini, M. y J. Di Rienzo. 2004. Info-Gen: Software para análisis estadístico de datos genéticos. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba. Argentina.
- Capanema, E. A., M. Y. Balakshin y J. F. Kadla. 2004. A comprehensive approach for quantitative lignin characterization by NMR spectroscopy. J. Agric. Food Chem. 52:1850-1860.
- Drake, P. L., R. H. Froend y P. J. Franks. 2013. Smaller, faster stomata: scaling of stomatal size, rate of response, and stomatal conductance. J. Exp. Bot. 64:495-505.
- Excoffier, L., P. E. Smouse y J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics. 131:479- 491.
- Fanourakis, C., H. Giday, R. Milla, R. Pieruschka, K. H. Kjaer, M. Bolger, A. Vasilevski, A. Nunes-Nesi, F. Fiorani y C. O. Ottosen. 2015. Pore size regulates operating stomatal conductance, while stomatal densities drive the partitioning of conductance between leaf sides. Ann. Bot. 115:555-565.
- Franks, P. J. y D. J. Beerling. 2009. Maximum leaf conductance driven by CO<sub>2</sub> effects on stomatal size and density over geologic time. P. Natl. Acad. Sci. USA. 106:10343-10347.
- Franks, P. J., T. W. Doheny-Adams, Z. J. Britton-Harper y J. E. Gray. 2015. Increasing water-use efficiency directly through genetic manipulation of stomatal density. New Phytol. 207:188-195.
- Goering, H. K. y P. J. Van Soest. 1970. Forage Fiber Analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications). Agric. Handbook No. 379. USDA-ARS, Washinton, DC. 20 p.
- Hapl, V., A. Pavlíček y J. Flegr. 2001. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with a freeware program

- FreeTree: application to trichomonad parasites. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:731-735.
- Hetherington, A. H. y F. I. Woodward. 2003. The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature.* 424:901-908.
- Kipchirchir, K. O., K. R. Ngugi, M. S. Mwangi, K. G. Njomo y W. Raphael. 2015. Water stress tolerance of six rangeland grasses in the Kenyan semi-arid rangelands. *AJAF.* 3:222-229.
- Koech, O. K., R. N. Kinuthia, G. N. Karuku, S. M. Mureithi y R. Wanjogu. 2015. Water use efficiency of six rangeland grasses under varied soil moisture content levels in the arid Tana River County, Kenya. *Afr. J. Environ. Sci. Technol.* 9:632-640.
- Labarthe, A. F. S., A. H. R. Pelta y I. T. E. Bordenave. 2009. Introducción básica a la fotosíntesis y características de especies forrajeras megatérmicas. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina.
- Lawson, T. y M. R. Blatt. 2014. Stomatal size, speed, and responsiveness impact on photosynthesis and water use efficiency. *Plant Physiol.* 164:1556–1570.
- Lawson, T., A. J. Simkin, G. Kelly y D. Granot. 2014. Mesophyll photosynthesis and guard cell metabolism impacts on stomatal behavior. *New Phytol.* 203:1064-1081.
- Lazarides, M. 1997. A revision of *Eragrostis* (*Eragrostideae*, *Eleusininae*, *Poaceae*) in Australia. *Aust. Syst. Bot.* 10:77-187.
- López, C. E., A. Prina, S. Griffa, A. N. Ribotta, E. Carloni, E. Tommasino, C. Luna, E. Biderbost y K. Grunberg. 2011. Obtaining new germplasm in *Cenchrus ciliaris* L. through induced-mutation and *in vitro* selection. *Phyton* 80:59-64.
- Manyeki, J. K., E. C. Kirwa, P. B. Ogillo, W. N. Mnene, R. Kimitei, A. Mosu y R. Ngetich. 2015. Economic analysis of natural pasture rehabilitation through reseeding in the southern rangelands of Kenya. *Livestock Res. Rural Dev.* 27:49-61.
- Mganga, K. Z., N. K. R. Musimba, D. M. Nyariki, M. M. Nyangito y A. W. Mwangómbe. 2013. The choice of grass species to combat desertification in semi-arid Kenyan rangelands is greatly influenced by their forage value for livestock. *Grass Forage Sci.* 70:161-167.
- Mganga, K. Z., N. K. R. Musimba, D. M. Nyariki, M. M. Nyangito, A. W. Mwang'ombe, W. N. Ekaya, D. Clavel, J. Francis, R. Kaufmann, J. Verhagen y W. M. Muiru. 2010. Dry matter yields and hydrological properties of three perennial grasses of a semi-arid environment in East Africa. *Afr. J. Plant Sci.* 4:138-44.

- Pongtongkam, P., S. Peyachoknagul, J. Arananant, A. Thongpan y S. Tudsri. 2006. Production of salt tolerance dwarf napier grass (*Pennisetum purpureum* cv. Mott) using tissue culture and gamma irradiation. *Nat. Sci.* 40:625-633.
- Prakash, R., K. Ganesamurthy, A. Nirmalakumari y P. Nagarajan. 2010. Correlation and path analysis in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Electron. J. Plant Breed.* 1:315-318.
- Ramírez, J. L., D. Verdecia, I. Leonard y Y. Álvarez. 2010. Rendimiento de materia seca y calidad nutritiva del pasto *Panicum maximum* vc. Likoni en un suelo fluvisol de la región oriental de Cuba. *REDVET.* 11:1-14.
- Rashid, M., L. Ren-hu, J. Wei, X. Yong-han, W. Fu-lin, T. Yue-zhi, W. Jun-mei, A. A. Cheema, C. Jin-qing y G. He. 2009. Genomic diversity among Basmati rice (*Oryza sativa* L) mutants obtained through <sup>60</sup>Co gamma radiations using AFLP markers. *AJB.* 8:6777-6783.
- Raven, J. A. 2014. Speedy small stomata?. *J. Exp. Bot.* 65:1415-1424.
- Sáenz-Flores, E., R. A. Saucedo-Terán, C. R. Morales-Nieto, P. Jurado-guerra, C. R. Lara-Macías, A. Melgoza-Castillo y J. A. Ortega-Gutiérrez. 2015. Producción y calidad de semilla de pastos forrajeros como respuesta a la fertilización en Aldama, Chihuahua. *Tecnociencia.* 9:111-119.
- Sanderson, M. A., P. Voigt y R. M. Jones. 1999. Yield and quality of warm-season grasses in central Texas. *J. Range Manage.* 52:145-150.
- Schlüter, U., M. Muschak, D. Berger y T. Altmann. 2003. Photosynthetic performance of an *Arabidopsis* mutant with elevated stomatal density (sdd1-1) under different light regimes. *J. Exp. Bot.* 54:867-874.
- Tomas, P. A., A. M. Gottlieb, G. E. Schrauf y L. Poggio. 2013. Utilización de marcadores morfológicos y moleculares AFLP en la identificación de germoplasma nativo y cultivado de *Elymus scabrifolius* (Poaceae). *Rev. Fac. Cienc. Agrar., Univ. Nac. Cuyo* 45:85-100.
- Ullah, M. A., R. Abdul y S. Rashid. 2006. Performance of various forage grasses under spring and monsoon seasons at Pothowar plateau (Pakistan). *Int. J. Agric. Biol.* 8:398-401.
- Xu, Z. y G. Zhou. 2008. Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. *J. Exp. Bot.* 59:3317-3325.

**ESTUDIO IV. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y NUTRICIONAL DE  
MUTANTES M1 DE PASTO AFRICANO (*Eragrostis lehmanniana*)**

## RESUMEN

### CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y NUTRICIONAL DE MUTANTES M1 DE PASTO AFRICANO (*Eragrostis lehmanniana*)

POR:

M. C. ALAN ÁLVAREZ HOLGUÍN

Doctorado en Philosophia

Secretaría de Investigación y Posgrado

Facultad de Zootecnia y Ecología

Universidad Autónoma de Chihuahua

Presidente: Dr. Carlos Raúl Morales Nieto

El pasto africano (*Eragrostis lehmanniana*) es una especie utilizada para rehabilitar pastizales degradados. No obstante, su utilización implica un riesgo ecológico, ya que es una especie invasora que puede dispersarse y desplazar la vegetación nativa. Debido a esto, es importante la búsqueda de alternativas para su aprovechamiento por el ganado. Por lo anterior, el objetivo fue caracterizar la diversidad morfológica y nutricional inducida mediante radiación gamma. Esto con la finalidad de seleccionar genotipos con mejores atributos forrajeros, que puedan ser más aceptados por el ganado y puedan ser utilizados como forraje. Para ello, se irradia semilla de pasto africano mediante radiación gamma con  $Co^{60}$ , en dosis de 0 (testigo), 100, 200, 300, 450, 600, 900 y 1400 Gy. Bajo condiciones de invernadero se produjeron 10 plantas por dosis. Estas fueron evaluadas durante dos años a través de 11 caracteres morfológicos relacionados con calidad de forraje. Los individuos con características sobresalientes fueron seleccionados y caracterizados nutricionalmente por espectrofotometría de infrarrojo cercano.

Como resultado, la radiación gamma generó variabilidad morfológica en pasto africano, que permitió seleccionar seis mutantes. Tres de estos mutantes (200-6, 300-7 y 1400-10) presentaron menor ( $P < 0.05$ ) contenido de lignina y mayor ( $P < 0.05$ ) contenido de proteína, que las plantas testigo. Sin embargo, estos no presentaron cambios sustanciales que pudieran incrementar su aceptación por el ganado. Debido a esto, se recomienda producir la segunda generación de mutantes a través de irradiación recurrente en la semilla de los mutantes seleccionados.

## ABSTRACT

### MORPHOLOGICAL AND NUTRITIONAL CHARACTERIZATION OF M1 MUTANTS OF LEHMANN LOVEGRASS (*Eragrostis lehmanniana*)

BY:

ALAN ÁLVAREZ HOLGUÍN

Lehmann lovegrass (*Eragrostis lehmanniana*) is a species used to rehabilitate highly degraded grasslands, where it is difficult to reintroduce the native vegetation. However, to use this species implicates an ecological risk, because it could disperse and displace the native vegetation. Thus, the objective was to characterize the morphological and nutritional diversity induced through gamma radiation on Lehmann lovegrass. This, in order to select genotypes of better nutritional quality, which could be more accepted by the cattle and thus avoid their dispersion. For this, seed of Lehmann lovegrass was irradiated through gamma radiation with  $^{60}\text{Co}$ . The irradiation doses were 0 (control), 100, 200, 300, 450, 600, 900 and 1400 Grays (Gy). Ten plants per dose were produced under greenhouse conditions. These were evaluated during two years through 11 morphological characters related to forage quality. Outstanding individual were selected and characterized nutritionally by near-infrared spectrophotometry. The gamma irradiation generates morphological variability on Lehmann lovegrass, which allowed to select six mutants. Three of them (200-6, 300-7 y 1400-10) presented less ( $P<0.05$ ) lignin content and more ( $P<0.05$ ) protein, than the control plants. Nevertheless, these mutants did not present substantial changes that increase their cattle acceptance. Because of this, it is recommended to produce

the second generation of mutants using recurrent irradiation on the seed produced by the mutants selected.

## INTRODUCCIÓN

El pasto africano es una gramínea C4 perenne nativa del Sur de África. Esta especie se encuentra clasificada dentro de las invasoras de alto impacto para la biodiversidad (March y Martínez, 2007). Esto se atribuye a diferentes factores como su alta capacidad de establecimiento, producción de semilla y resistencia a fuego y sequía (Guevara *et al.*, 2007). No obstante, la principal causa de la capacidad invasiva de esta especie es que es poco consumida por el ganado (Chávez *et al.*, 2000), lo cual probablemente se debe a que presenta alto contenido de fibras, bajo contenido de proteína y en consecuencia poca digestibilidad (González-García *et al.*, 2017). A pesar de lo anterior, esta especie ha sido utilizada para rehabilitar pastizales degradados, ya que por su rusticidad puede establecerse en áreas altamente degradadas (Hupy *et al.*, 2004; McGlone y Huenneke, 2004). Sin embargo, la utilización del pasto africano implica un riesgo ecológico, debido a que puede dispersarse a áreas adyacentes al sitio de siembra y desplazar la vegetación nativa (Guevara *et al.*, 2007). Por esta razón, el pasto africano puede ser considerado para un programa de mejoramiento genético. Esto para incrementar su valor forrajero y con ello aumentar su aceptación por el ganado. De esta manera se podría aprovechar como forraje y reducir sus poblaciones.

Una limitante para el mejoramiento genético del pasto africano es que fue introducido en la mayoría de los países donde se utiliza, por lo que en ellos se dispone de poca diversidad genética de esta especie. Otra limitante es que esta especie lleva a cabo su reproducción de manera apomíctica (Voigt *et al.*, 1992). Por estas razones, el mejoramiento genético del pasto africano no puede ser

conducido mediante métodos tradicionales. En este sentido, la mutagénesis es una alternativa viable para su mejoramiento, ya que ha demostrado ser una técnica efectiva para inducir variabilidad genética (Aloowalia *et al.*, 2004). Algunas de los atributos que pueden modificarse para incrementar el valor forrajero del pasto africano son el ancho y largo de hoja, la proporción hojas-tallos y la altura de planta y follaje. Esto debido a que estas características son consideradas como algunos de los principales factores que afectan el valor forrajero de las gramíneas (Prakash *et al.*, 2010). Por lo anterior, el objetivo fue caracterizar la diversidad morfológica y nutricional inducida mediante radiación gamma en pasto africano. Esto con la finalidad de seleccionar individuos con mejores atributos forrajeros y encaminarse a la obtención de nuevos materiales de mayor valor nutricional; que puedan ser utilizados para rehabilitar pastizales degradados.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El experimento se llevó a cabo en condiciones de invernadero en la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Se evaluaron ocho dosis de irradiación: 100, 200, 300, 450, 600, 900, 1400 y 2000 Gy. Además, se incluyó como testigo la dosis de 0 Gy (material sin irradiar). El material irradiado fue semilla comercial de pasto africano. Los tiempos de exposición para las dosis evaluadas fueron determinadas utilizando el sistema Gafchromic dosimetry y una cámara de ionización marca RADCAL modelo Acudose No. de serie 4094118, USA. La irradiación de la semilla se realizó en el Complejo MOSCAFRUT SAGARPA/IICA en Metapa de Domínguez, Chiapas, México; en colaboración con el Campo Experimental Rosario Izapa, Chiapas del INIFAP. Las dosis se aplicaron dentro de un irradiador panorámico tipo Gamma Beam Modelo GB-127 MDS Nordion, con fuente de almacenamiento en seco, con una actividad de 15,000 Curies de  $\text{Co}^{60}$ . La semilla estuvo estática al momento de la irradiación para uniformizar la aplicación de los tratamientos. Los tipos de exposición y la distancia del material a la fuente radioactiva variaron según la dosis. Esto se debe a que para alcanzar las dosis altas el material se acercó a la fuente radiactiva para disminuir el tiempo de exposición.

### **Caracterización morfológica**

La prueba se condujo bajo un diseño experimental completamente al azar. Si bien se utilizaron 10 plantas por dosis de irradiación se analizaron como individuos y no como tratamiento. Las plantas se identificaron de acuerdo a la dosis de irradiación de la que provienen y el número de planta que tiene dentro de ese tratamiento; ejemplo: la planta 100-6 proviene de la dosis de 100 Gy y es la

planta seis dentro de ese tratamiento. Para asegurar emergencia y establecimiento, se sembraron 20 semillas por maceta; sin embargo, solamente se dejó una planta por maceta. La siembra se realizó en bolsas de polietileno negro de 26 cm de altura por 18 cm de diámetro, perforadas en la parte inferior. Las bolsas se llenaron con 23 cm de suelo franco-arenoso de origen aluvial y los riegos se suministraron hasta punto de saturación cada dos o tres días, según el desecamiento del suelo. La evaluación se llevó a cabo en dos periodos. El primero se realizó de junio a septiembre del 2016 y el segundo de junio a septiembre del 2017. En la primera evaluación las variables analizadas fueron peso de tallos (PT), peso de hojas (PH), peso total (PTO), proporción hoja-tallo (PHT), largo de hoja (LH), ancho de hoja (AH), altura de planta (AP), producción de semilla (PS), número de tallos (NT), diámetro de macollo (DM) e índice de concentración de clorofila (ICC). En la segunda evaluación las variables evaluadas fueron PT, PH, PTO, PHT, PS, ICC, AP, altura de follaje (AF) y proporción follaje-altura de planta (PFA). Para la cuantificación de los pesos, se cortó a cinco cm del suelo el total de la biomasa aérea y se separó tallos y hojas. Las muestras extraídas se secaron en una estufa de aire forzado a 65 °C durante 72 h. Una vez secas las muestras fueron pesadas en una balanza analítica A&D modelo GF-200, con precisión de 0.01 g. Con esto se obtuvo el PT y PH, y con la suma de ambos el PTO. La PHT se obtuvo del cociente de la división del PH entre el PT. El LH se midió desde la lígula hasta el ápice de la hoja y el AH se midió en la parte media de la lámina. Ambos se midieron en tres hojas seleccionadas al azar y se promediaron. Para obtener la AP se midió desde el suelo hasta la punta del tallo más alto de la planta y para la AF se midió del suelo hasta el término de la parte con mayor densidad de

hojas. La PFA se obtuvo del cociente de la división del AF entre el AP. El ICC se cuantificó con un dispositivo Opti-Sciences, modelo CCM-200 y se midió en la parte media de tres hojas seleccionadas al azar.

La temperatura (T) media durante el experimento fue de  $23.7 \pm 5.6$  °C, con una mínima de 10.1 y máxima de 44.7 °C. La humedad relativa (HR) media fue de  $52.0 \pm 16.8$  %. Las mediciones para caracterizar T y RH se realizaron con una sonda modelo HMP60 (Vaisala, Woburn, MA, USA). Estos datos se registraron en un datalogger CR1000 (Campbell Scientific Inc., Logan, UT, USA).

### **Caracterización Nutricional**

La caracterización nutricional se realizó en el laboratorio de nutrición animal de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Esta se llevó a cabo por medio de espectrofotometría de infrarrojo cercano, mediante el dispositivo SpectraStar 2600 XT (Unity Scientific). Para ello se utilizó el forraje producido en la evaluación del primer y segundo año en conjunto. Esto debido a que las plantas se analizaron individualmente y con la producción de un solo año no se obtuvo suficiente forraje para el análisis. En esta etapa se analizó únicamente los mutantes seleccionados como sobresalientes en la caracterización morfológica y las 10 plantas testigo. Para este análisis, las muestras obtenidas en la etapa anterior fueron molidas en un molino Wiley® con malla de 1 mm. Las variables analizadas fueron porcentaje de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), lignina detergente ácido (LDA), celulosa, hemicelulosa y proteína cruda (PC). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado para cada planta, en cada una de las variables. Los mutantes fueron molidos y analizados individualmente, mientras que las 10 plantas

del testigo se hicieron en conjunto. Los porcentajes de FDN, FDA, LDA y PC se obtuvieron directamente del NIR, mientras que la hemicelulosa y celulosa se calcularon mediante la diferencia entre FDN y FDA, y entre FDA y LDA, respectivamente.

### **Análisis Estadístico**

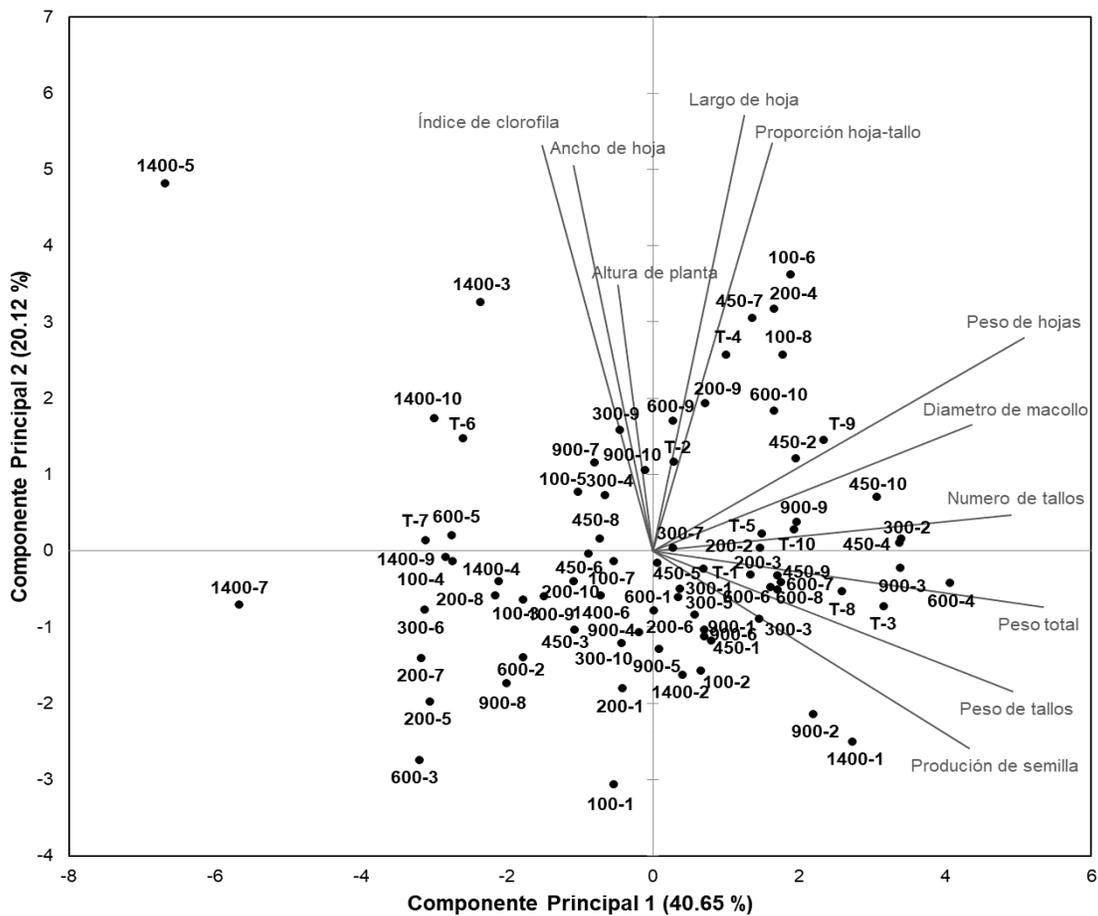
El diseño experimental fue un completamente al azar. A los datos de caracterización morfológica y nutricional se les aplicó un análisis de componentes principales (ACP), mediante la matriz de correlación. La asociación de las variables originales con los componentes principales se determinó mediante análisis de correlación. Posteriormente, a los datos se les aplicó un análisis de agrupamiento (AC) por el método de ligamiento Ward. En este análisis, el número de grupos se determinó con base en los pseudo estadísticos F y T<sup>2</sup>. Posteriormente, se realizó un análisis de varianza multivariado (MANOVA) y contrastes ortogonales, para evaluar las diferencias entre los grupos conformados por el AC. Adicionalmente, los datos de la caracterización se analizaron mediante ANOVA y comparación de medias con la prueba de Dunnett ( $\alpha=0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

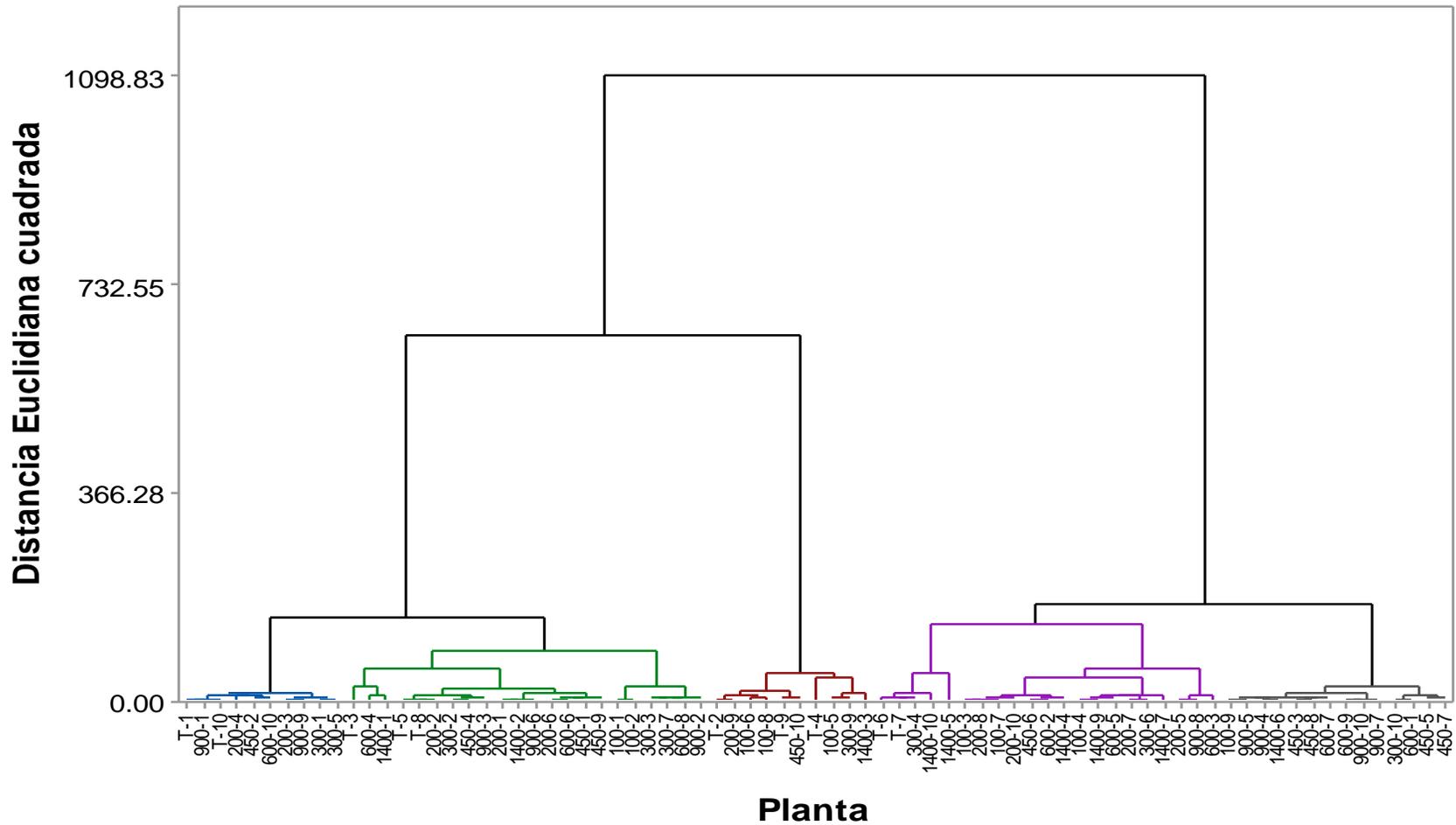
En la evaluación del primer año, el análisis de componentes principales mostró que los dos primeros componentes principales (CP) explicaron el 60.7 % de la variación total. Al incluir un tercer CP se explicó el 76.2 % de la variación total. Las variables relacionadas con rendimiento de forraje tuvieron mayor contribución con el CP 1: peso de tallos (R= 0.85; P<0.0001), peso de hojas (R= 0.88; P<0.0001), peso total (R= 0.92; P<0.0001), número de tallos (R= 0.85; P<0.0001), diámetro de macollo (R= 0.75; P<0.0001) y producción de semilla (R= 0.75; P<0.0001). En el CP 2 las relacionadas con calidad de forraje fueron las de mayor contribución: proporción hoja-tallo (R= 0.65; P<0.0001), largo de hoja (R= 0.69; P<0.0001), ancho de hoja (R= 0.61; P<0.0001) e índice de concentración de clorofila (R= 0.64; P<0.0001) (Gráfica 10).

El análisis de agrupamiento integró a cinco grupos ( $R^2 = 0.50$ ) de acuerdo a los pseudo estadísticos F y  $T^2$ , en la evaluación del primer año. Estos grupos fueron significativamente diferentes entre sí (P<0.0001) de acuerdo con el MANOVA y los contrastes ortogonales. No obstante, en solo uno de los grupos conformados no se integró alguna de las plantas testigo (Gráfica 11). Los mutantes integrados en este grupo se caracterizaron por presentar valores medios en las variables evaluadas. Debido a esto, el AC no permitió seleccionar mutantes sobresalientes en atributos relacionados con calidad de forraje, por lo que la selección se basó solamente en el ACP.

Para la evaluación del segundo año, los primeros dos CP explicaron el 59.9 % de la variación total, mientras que con los primeros tres se explicó el 73.4 %.



Gráfica 10. Distribución de la diversidad morfológica de 70 mutantes y 10 individuos control (provenientes de semilla sin irradiar) de pasto africano (*Eragrostis lehmanniana*), evaluados en etapa de madurez en su primer año de crecimiento.



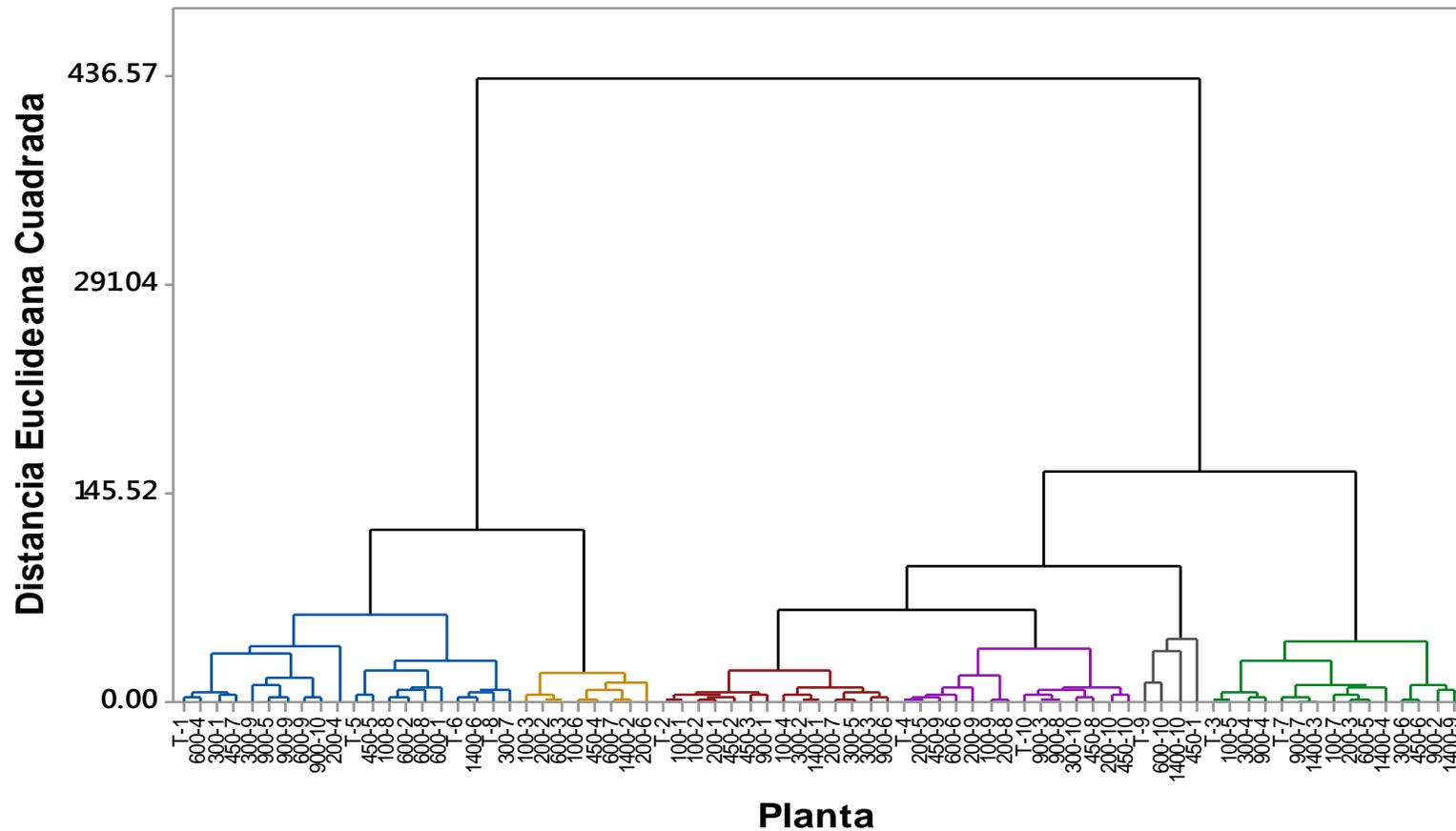
Gráfica 11. Dendrograma del análisis de 10 variables morfológicas evaluadas para 70 mutantes y 10 individuos control (provenientes de semilla sin irradiar) de pasto africano (*Eragrostis lehmanniana*), evaluados en etapa de madurez en su primer año de crecimiento.

Las variables de mayor contribución con el CP 1 fueron peso de hojas ( $R=0.90$ ;  $P<0.0001$ ), peso tallos ( $R=0.62$ ;  $P<0.0001$ ), peso total ( $R=0.78$ ;  $P<0.0001$ ), proporción hoja-tallo ( $R=0.78$ ;  $P<0.0001$ ), altura de follaje ( $R=0.72$ ;  $P<0.0001$ ), proporción follaje-altura ( $R=0.66$ ;  $P<0.0001$ ), largo de hoja ( $R=0.68$ ;  $P<0.0001$ ), ancho de hoja ( $R=0.57$ ;  $P<0.0001$ ) e índice de concentración de clorofila ( $R=0.68$ ;  $P<0.0001$ ). En el CP 2 las variables de mayor contribución fueron peso de tallos ( $R=0.71$ ;  $P<0.0001$ ), peso total ( $R=0.57$ ;  $P<0.0001$ ), producción de semilla ( $R=0.62$ ;  $P<0.0001$ ) y largo de hoja ( $R=-0.53$ ;  $P<0.0001$ ). Por lo anterior, los individuos con valores positivos en los CP 1 y 2 fueron los que presentaron valores sobresalientes en atributos relacionados con calidad de forraje como: proporción hoja-tallos, proporción follaje-altura, ancho de hoja y largo de hoja (Gráfica 12).

El AC separó a los individuos en seis grupos ( $R^2=0.51$ ), de acuerdo a los datos del segundo año. No obstante, en solo uno de estos grupos no se integró alguna planta testigo (Gráfica 13). Los mutantes integrados en este grupo se caracterizaron por presentar valores altos en atributos relacionados con producción y calidad de forraje. Además, este grupo fue significativamente diferente a los demás ( $P<0.0001$ ). En esta etapa, los mutantes seleccionados fueron los que presentaron valores altos en los CP 1 y 2, y aquellos que se integraron al grupo sin plantas testigo. Sin embargo, la selección de mutantes también se apoyó en los valores obtenidos en las variables originales.

En general se encontró variabilidad morfológica en ambas evaluaciones (primero y segundo año). Esto es congruente con diversas investigaciones donde a través del uso de irradiación gamma han logrado inducir variabilidad





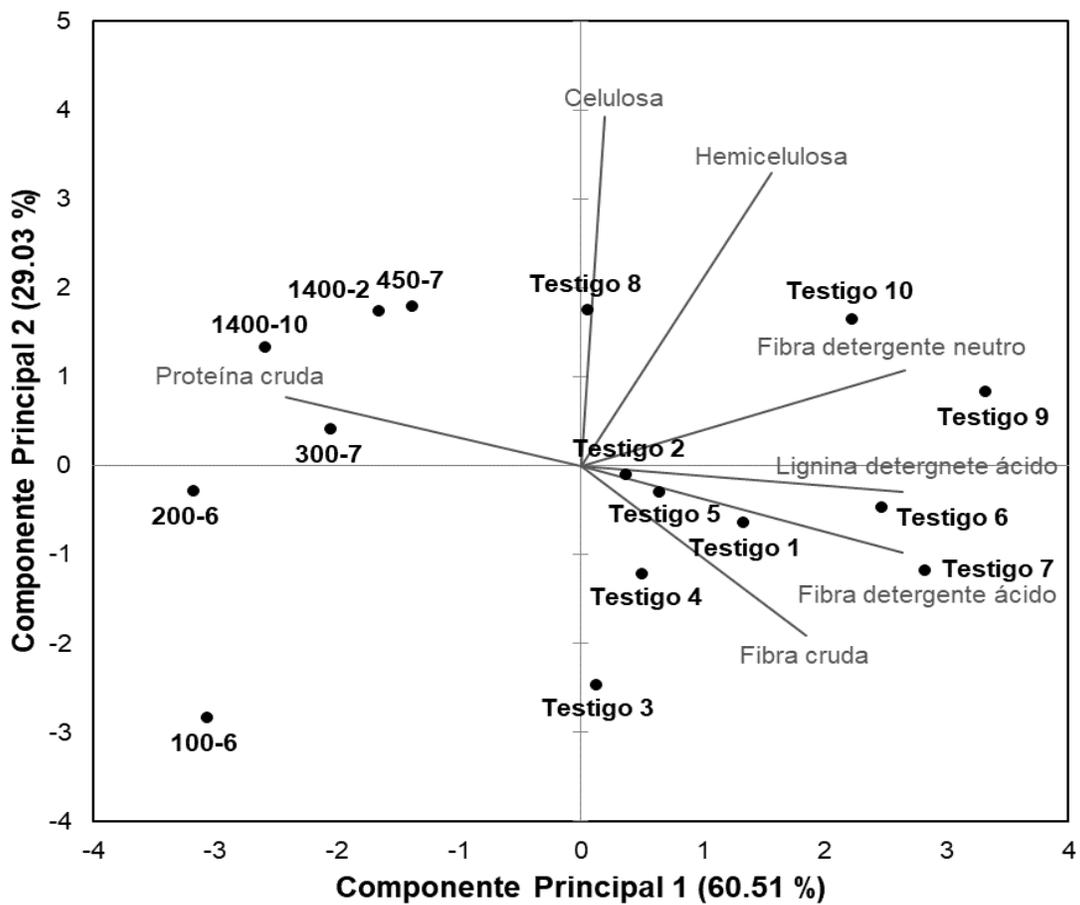
Gráfica 13. Dendrograma del análisis de 10 variables morfológicas evaluadas para 70 mutantes y 10 individuos control (provenientes de semilla sin irradiar) de pasto africano (*Eragrostis lehmanniana*), evaluados en etapa de madurez en su segundo año de crecimiento.

fenotípica en diversos cultivos, tanto para consumo humano como para forraje (Rashid *et al.*, 2009; Abtahi y Arzani, 2013). Así mismo, coincide con lo reportado en algunos trabajos realizados en pastos. Un ejemplo de esto es el realizado por Pongtongkam *et al.* (2006), quienes lograron obtener materiales de mayor resistencia al estrés salino en pasto guinea (*Panicum maximum*). También, los resultados coinciden con lo reportado por López *et al.* (2011), quienes lograron obtener nuevo germoplasma de pasto buffel, especie utilizada para rehabilitación de pastizales. Debido a la variabilidad morfológica inducida, fue posible seleccionar cuatro mutantes como sobresalientes en atributos relacionados con calidad de forraje; 100-6, 200-6, 300-7, 450-7, 1400-2 y 1400-10.

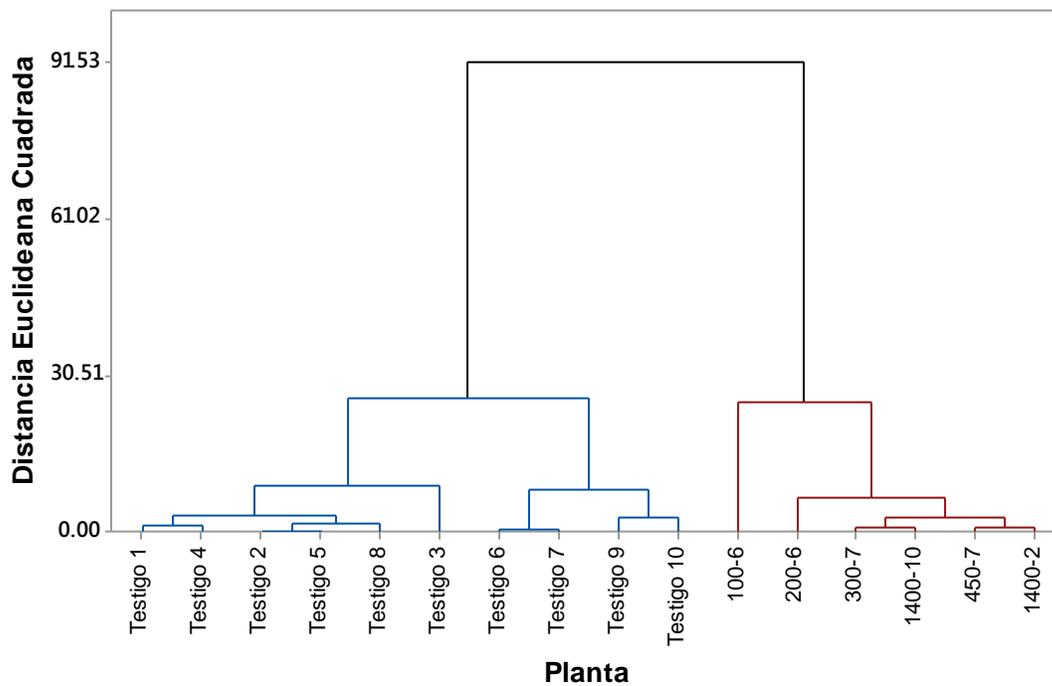
### **Caracterización Nutricional**

En esta evaluación, los primeros dos CP explicaron el 94.8 % de la variación total. Las variables de mayor contribución con el CP 1 fueron FDN (R= 0.98; P<0.0001), FDA (R= 0.91; P<0.0001), hemicelulosa (R= 0.66; p=0.005), LDA (R= 0.93; P<0.0001) y PC (R= -0.88; P<0.0001). Las únicas variables que tuvieron una contribución significativa con el CP 2 fueron porcentaje de hemicelulosa (R= 0.74; P=0.0009) y celulosa (R= 0.97; P<0.0001). Por esta razón, aquellos individuos con valores negativos en el CP 1 fueron los que presentaron menor contenido de fibras (FDN, FDA y LDA) y mayor contenido de PC (Gráfica 14).

El análisis de agrupamiento conformo solamente dos grupos ( $R^2= 0.82$ ), de acuerdo a los pseudo estadísticos F y  $T^2$  (Gráfica 15). El primer grupo quedo conformado únicamente por las plantas testigo, mientras que en el segundo se Los mutantes 100-6 y 200-6 fueron los únicos que presentaron menor contenido de fibras totales, ya que presentaron menor (P<0.05) porcentaje de FDN, respecto



Gráfica 14. Distribución de la diversidad morfológica de seis mutantes y 10 individuos testigo (provenientes de semilla sin irradiar) de pasto africano (*Eragrostis lehmanniana*).



Gráfica 15. Dendrograma del análisis de seis variables bromatológicas evaluadas para seis mutantes y 10 individuos testigo (provenientes de semilla sin irradiar) de pasto africano (*Eragrostis lehmanniana*).

integraron solo las plantas testigo. Además, estos grupos fueron significativamente diferentes entre sí ( $P < 0.0001$ ).

al testigo. No obstante, los mutantes 200-6, 300-7 y 1400-10 fueron los únicos que presentaron menor ( $P < 0.05$ ) porcentaje de LDA, que el testigo. Por otro lado, todos los mutantes evaluados presentaron mayor ( $P < 0.05$ ) contenido de PC que el testigo (Cuadro 4). Por lo anterior, los mutantes 200-6, 300-7 y 1400-10 pueden considerarse como materiales de mayor valor nutricional. Esto debido a que la digestibilidad de especies forrajeras esta inversamente relacionada con su contenido de estructuras fibrosas (Ávila *et al.*, 2010). Además, estos mutantes presentaron una disminución en el contenido de lignina en comparación al testigo de 20, 18 y 16 %, respectivamente. Este resultado puede indicar un importante incremento en la calidad nutricional de los mutantes, ya que la lignina es un componente indigestible que puede asociarse con la hemicelulosa mediante enlaces covalentes. Esto dificulta la acción de las enzimas microbianas y por lo tanto limita su digestión (Capanema *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2010). Sin embargo, los cambios tanto físicos como nutricionales observados en los mutantes probablemente no sean suficientes para que sean materiales mayormente preferidos por el ganado. Por esta razón, la semilla de los mutantes 200-6, 300-7 y 1400-10 se puede someter a irradiación recurrente, con la dosis optima de radiación gamma recomendada para esta especie (Álvarez-Holguín *et al.*, 2018). De esta manera, se podrían obtener materiales de pasto africanos que puedan sean más consumidos por el ganado.

Cuadro 4. Composición bioquímica de seis mutantes y el genotipo común de pasto africano (*Eragrostis lehmanniana*), en etapa de madurez

Genotipo	FDN	FDA	Hemicelulosa	Celulosa	LDA	PC
Testigo	74.2 ± 0.26	40.0 ± 0.17	34.1 ± 0.17	29.7 ± 0.15	4.47 ± 0.07	6.6 ± 0.09
100-6	70.4 ± 0.41*	38.4 ± 0.22*	32.0 ± 0.19*	28.1 ± 0.12	3.88 ± 0.07	10.3 ± 0.17*
200-6	71.2 ± 0.17*	38.0 ± 0.21*	33.1 ± 0.03	29.5 ± 0.03	3.54 ± 0.01*	11.1 ± 0.10*
300-7	72.0 ± 0.11	38.3 ± 0.08*	33.7 ± 0.19	30.0 ± 0.34	3.74 ± 0.14*	10.0 ± 0.09*
450-7	72.7 ± 0.34	38.1 ± 0.08*	34.5 ± 0.26	30.7 ± 0.05	3.80 ± 0.21	9.0 ± 0.06*
1400-2	72.7 ± 0.81	38.1 ± 0.58*	34.5 ± 1.40	30.6 ± 1.36	3.90 ± 0.04	10.4 ± 0.34*
1400-10	71.8 ± 1.98	37.7 ± 0.39*	34.0 ± 1.59	30.4 ± 1.23	3.65 ± 0.35*	10.4 ± 0.14 *

\*Diferencias estadísticas significativas (Dunnett; P<0.05)

## **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

El uso de radiación gamma generó amplia variabilidad morfológica en pasto africano. Lo anterior permitió seleccionar la primera generación de mutantes de mayor valor nutricional. Sin embargo, estos no presentaron cambios sustanciales que pudieran incrementar su aceptación por el ganado, en comparación con los materiales de pasto africano con los que actualmente se cuenta. Debido a esto, se recomienda producir la segunda generación de mutantes a través de irradiación recurrente en la semilla de los mutantes seleccionados.

## LITERATURA CITADA

- Abtahi, M. y A. Arzani. 2013. Molecular and morphological assessment of genetic variability induced by gamma radiation in canola. JPMB. 1:69-84.
- Aloowalia, B. S., M. Maluszynski y K. Nichterlein. 2004. Global impact of mutation-derived varieties. Euphytica. 135:187-204.
- Álvarez-Holguín, A., C. R. Morales-Nieto, C. H. Avendaño-Arrazate, E. Santellano-Estrada, A. Melgoza-Castillo, M. E. Burrola-Barraza y R. Corrales-Lerma. 2018. Dosis letal media y reducción media del crecimiento por radiación gamma en pasto africano (*Eragrostis lehmanniana* Ness). Ecosist. Recur. Agropec. 5:1-12.
- Ávila, R. E., O. Di Marco, M. Agnusdei y C. Mayoral. 2013. Digestibilidad de la fibra y materia seca de dos gramíneas megatérmicas (*Chloris gayana* y *Cenchrus ciliaris*) de diferente porte: relación con la edad y largo foliar. Rev. Arg. Prod. Anim. 30:1-13.
- Capanema, E. A., M. Y. Balakshin y J. F. Kadla. 2004. A comprehensive approach for quantitative lignin characterization by NMR spectroscopy. J. Agric. Food Chem. 52:1850-1860.
- Chávez, S. A. H., A. G. Pérez y E. J. G. Sánchez. 2000. Intensidad de pastoreo y esquema de utilización en la selección de la dieta del ganado bovino durante la sequía. Téc. Pecu. Méx. 38:19-34.
- González-García, H., A. Sánchez-Maldonado, A. J. Sánchez-Muñoz, A. Orozco-Erives, Y. Castillo-Castillo, R. Martínez-De la Rosa y J. A. González-Morita. 2017. Valor nutritivo del zacate rosado (*Melinis repens*) y del zacate africano (*Eragrostis lehmanniana*) en Chihuahua. Ciencia en la Frontera. 14:7-14.
- Guevara, J. C., O. R. Estevez y C. R. Stas. 2007. Influencia de la introducción de *Eragrostis lehmanniana* sobre la comunidad de gramíneas en la Reserva de Ñacuñán (Mendoza, Argentina). Rev. FCA UNCuyo. 1:1-7.
- Hupy, C. M., W. G. Whitford y E. C. Jackson. 2004. The effect of dominance by an alien grass species, Lehmann lovegrass, *Eragrostis lehmanniana*, on faunal-pedoturbation patterns in North American Desert grasslands. J. Arid Environ. 58:321-334.
- López, C. E., A. Prina, S. Griffa, A. N. Ribotta, E. Carloni, E. Tommasino, C. Luna, E. Biderbost y K. Grunberg. 2011. Obtaining new germplasm in *Cenchrus ciliaris* L. through induced-mutation and *in vitro* selection. Phytom. 80:59-64.

- March, M. I. J. y J. M. Martínez. 2007. Especies invasoras de alto impacto a la biodiversidad: Prioridades en México. IMTA-Conabio-GECI Arid América-The Nature Conservancy.
- McGlone, M. C. y F. L. Huenneke. 2004. The impact of a prescribed burn on introduced Lehmann lovegrass versus native vegetation in the northern Chihuahuan Desert. *J. Arid Environ.* 57:297-310.
- Pongtongkam, P., S. Peyachoknagul, J. Arananant, A. Thongpan y S. Tudsri. 2006. Production of salt tolerance dwarf napier grass (*Pennisetum purpureum* cv. Mott) using tissue culture and gamma irradiation. *Nat. Sci.* 40:625-633.
- Prakash, R., K. Ganesamurthy, A. Nirmalakumari y P. Nagarajan. 2010. Correlation and path analysis in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Electron. J. Plant Breed.* 1:315-318.
- Ramírez, J. L., D. Verdecia, I. Leonard y Y. Álvarez. 2010. Rendimiento de materia seca y calidad nutritiva del pasto *Panicum maximum* vc. Likoni en un suelo fluvisol de la región oriental de Cuba. *REDVET.* 11:1-14.
- Rashid, M., L. Ren-hu, J. Wei, X. Yong-han, W. Fu-lin, T. Yue-zhi, W. Jun-mei, A. A. Cheema, C. Jin-qing y G. He. 2009. Genomic diversity among Basmati rice (*Oryza sativa* L) mutants obtained through <sup>60</sup>Co gamma radiations using AFLP markers. *AJB.* 8:6777-6783.
- Voigt, P. W., B. L. Burson y R. A. Sherman. 1992. Mode of reproduction in cytotypes of lehmann lovegrass. *Crop Sci.* 32:118-121.