UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES

Tesis de grado previa la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

IRRADIACIÓN CON RAYOS GAMMA COBALTO 60 Y REGENERACIÓN DIRECTA EN *Limonium sinensis*

AUTOR

FRANCKLIN VILLEGAS

DIRECTORA

Ing. LAURA HUACHI

QUITO - ECUADOR

2012

A mis padres, Liliana y Franklin quienes caminan

Junto a mí, y durante el trayecto han sabido ser

Guías, testigos y amigos.

A Daniel y Sebastián hermanos míos de los

Que siempre aprendo.

Quisiera agradecer de manera especial a Ana María Quiñonez, directora de Esmeralda Breeding & Biotechnology por permitirme ser parte activa de las labores de investigación realizadas durante mi periodo de pasantía y por acceder al desarrollo de esta tesis.

De igual manera quisiera reconocer a Diandra Jurado quien está a cargo del área de Investigación y Servicios del laboratorio de Esmeralda Breeding& Biotechnology, por haber confiado en mis capacidades y darme el respaldo necesario para la realización de esta investigación; también quisiera agradecer el tiempo y dedicación que otorgó a mi trabajo, ciertamente fue una labor desafiante y sin sus recomendaciones y apoyo el desarrollo de esta tesis se hubiera tornado más complicado aún.

También quisiera mencionar a Rosalía Paladines jefe del laboratorio, por reconocer mi esfuerzo y dedicación durante la realización de esta investigación. De igual manera quisiera agradecer a personal que labora dentro del grupo Esmeralda y en especial al excelente grupo humano que conforman el laboratorio.

Igualmente agradezco a la Ing. Laura Huachi directora de este trabajo por haberme guiado durante todas las etapas del mismo, al Ing. Julio Sánchez quien amablemente prestó sus consejos y recomendaciones al momento de analizar los datos obtenidos durante esta investigación.

A todos aquellos docentes y profesionales quienes participaron en la revisión de este trabajo, a quienes participaron en mi formación personal, y especialmente a aquellos que ven lo maravilloso en lo pequeño.

ÍNDICE

Índice de tablas. viii

Capítulo I 1

1.1 Introducción 1

1.2 Objetivos. 2

1.2.1 Objetivo General: 2

1.2.2 Objetivos Específicos: 2

1.3 Justificación. 3

Capítulo II 5

2. Marco Teórico 5

2.1 Cultivo de tejidos vegetales. 5

2.1.2 Establecimiento de cultivos. 5

2.1.3 Planta donante. 6

2.1.4 Tipo de explante. 6

2.1.5 Asepsia. 7

2.1.6 Medio de cultivo. 8

2.1.7 Reguladores de crecimiento. 8

2.1.7.1 Efecto biológico de los reguladores de crecimiento. 9

2.1.7.2 Principales reguladores de crecimiento usados en el cultivo de tejidos. 9

2.1.8 Totipotencia. 11

2.3 Ciclo celular en plantas. 13

2.3.1 Mecanismos de revisión o "*Checkpoints*". 13

2.3.2 Regulación del ciclo celular. 14

2.3.3 Aspectos generales del ciclo celular en levaduras y mamíferos. 14

2.3.4 Aspectos específicos en ciclo celular de plantas. 14

2.4 Mecanismos de reparación del ADN. 15

2.4.1 Lesiones por oxidación. 15

2.4.2 Daño inducido por radiación ionizante. 16

2.4.3 Mecanismos de reparación de ADN producto de radiación ionizante. 17

2.4.4 Mecanismos de tolerancia. 17

2.5 Compromiso, determinación y diferenciación celular. 17

2.5.1 Linaje celular vs posición. 19
2.5.2 El desarrollo celular está dirigido por redes de células que interactúan entre sí. 19
2.5.3 La división celular y su papel en la determinación. 20
2.5.4 Mecanismos de diferenciación. 20
2.5.5 Genes regulatorios. 21
2.5.6 Silenciamiento de ciertas partes del genoma. 21
2.5.7 Dediferenciación y Rediferenciación. 22
2.6 Morfogénesis. 22
2.6.1Organogénesis directa e indirecta. 23
2.6.2 Organogénesis directa. 24
2.6.3 Meristemoides. 25
2.6.4 Organogénesis indirecta. 25
2.7 Fitomejoramiento mediante inducción de mutaciones. 25
2.7.1 Mutaciones para el incremento de la producción. 27
2.7.2 Mutaciones para el cambio de estructura. 27
2.7.3 Mutaciones en la inducción de resistencia. 27
2.7.4 Mutaciones espontáneas. 27
2.7.5 Mutaciones inducidas. 28
2.7.6 El uso de radiación en la inducción de mutaciones. 28
2.7.7 Radiación en la naturaleza. 29
2.7.8 Efectividad, eficiencia y eficacia. 30
2.7.8.1 Radiosensividad. 30
2.8 Rayos Gamma. 31
2.9 Contaminación Endógena. 33
2.9.1 La comunicación, un factor importante. 34
2.9.2 El agua y su relación en la contaminación foliar. 34
2.9.3 Biopelículas, una forma de vida. 36
Capítulo III 37
3. Metodología. 37
3.1 Materiales y equipos. 37
3.1.1 Reactivos. 37

3.1.2 Material vegetal. 38
3.1.3 Fuente de irradiación. 39
Procedimiento. 39
3.2 Etapa I: fase de campo. 39
3.3 Etapa II: fase de laboratorio. 41
3.3.2 Protocolo de desinfección utilizado. 41
3.3.3 Protocolo de irradiación y siembra en medios de cultivo 42
3.3.4 Variables a analizar. 45
3.3.5 Análisis estadístico. 47
Capítulo IV 48
4. Resultados. 48
4.1 Variable respuesta. 48
4.2 Variable brotes. 50
4.3 Variable mortalidad. 52
4.4 Variable contaminación. 54
Capítulo V 57
5. Discusión 57
5.1 Variable respuesta. 57
5.2 Variable brotes. 61
5.3 Variable mortalidad. 64
2.5 Variable contaminación. 65
Capítulo VI 68
6.1 Conclusiones. 68
Glosario. 72
CAPÍTULO VII 75
7.1 Anexo de figuras. 75
7.2 Anexo de tablas. 78
Protocolo de irradiación y regeneración directa utilizando segmentos de hoja de *Limonium sinensis.* 81
Bibliografía. 83

Índice de figuras

Figura 1: Estructura de un meristemo..... 18
Figura 2: Material vegetal utilizado durante el periodo de selección..... 39
Figura 3: Elección de los segmentos foliares de manera aleatoria entre el material vegetal disponible. 40
Figura 4: Desinfección de los segmentos foliares de *Limonium sinensis* var A, se muestra el proceso de enjuague con agua estéril. 42
Figura 5: Fuente de irradiación Cobalto 60, utilizada en esta investigación..... 44
Figura 6: Meristemoides formados al cabo de la cuarta semana de observación,..... 45
Figura 7: Brotes adventicios producidos durante las sexta semana de observación en la dosis 0 Gy, ... 46
Figura 8: Contaminación bacteriana registrada durante el tiempo de observación,..... 46
Figura 9: Segmentos de *Limonium sinensis* var B, de la dosis 0 Gy que no respondieron al proceso de regeneración, ... 47
Figura 10: Decrecimiento en la variable respuesta durante la aplicación progresiva de las dosis de irradiación..... 49
Figura 11: Crecimiento de brotes durante el experimento, al cabo de las ocho semanas de observación se pudo notar diferencias entre los brotes producidos en cada dosis. 51
Figura 12: Mortalidad de los segmentos foliares ante las dosis aplicadas. Se puede notar que el aumento de mortalidad va directamente relacionado con el aumento de la dosis. 53
Figura 13: Comportamiento de la contaminación bacteriana durante el proceso de irradiación en las tres repeticiones efectuadas..... 55
Figura 14: Contaminación bacteriana, puede notarse que un solo segmento es el que posee crecimiento bacteriano alrededor..... 75
Figura 15: Regeneración directa de *Limonium sinensis* variedad A en la dosis de 15 Gy, puede notarse la alta mortalidad en esta dosis..... 75
Figura 16: Segmentos de *Limonium sinensis* variedad B (0 Gy) que no respondieron al proceso de regeneración. 76
Figura 17: Proceso realizado para la identificación de la contaminación bacteriana en cultivo *in vitro* de *Limonium sinensis*, de izquierda a derecha se muestra el aislamiento y

reproducción de la bacteria (A), la caracterización bioquímica (B), identificación por medio del equipo Vitek 2 y finalmente la tipificación del género (C) y un antibiograma como posible método de control (D). 77
Figura 18: Toma semanal de datos (A) y arreglo al azar de los frascos en el cuarto de cultivo (B) 77
Figura 19: Variaciones morfológicas de los brotes obtenidos entre la dosis de 6 Gy (derecha) y la dosis de control. 78

Índice de tablas.

Tabla 1: Unidades de radiación y sus definiciones..... 32
Tabla 2: Composición de los medios de cultivo utilizados: medio de transporte, medio de regeneración y medio de crecimiento. 38
Tabla 3: Dosis de irradiaciones utilizadas, para cada variedad y se realizaron tres repeticiones. 43
Tabla 4: Tiempos de irradiación utilizados, con una actividad de 8.5623 Ci. 44
Tabla 5: Conteo de meristemoides obtenidos durante las ocho semanas de observación. ... 48
Tabla 6: Prueba de ANOVA realizada para el conteo de meristemoides durante las ocho semanas de observación..... 49
Tabla 7: Grupos conformados según la variable respuesta según la prueba de Tukey. Se puede notar el arreglo de subconjuntos de acuerdo a lo presentado en la tabla 4. 50
Tabla 8: Desarrollo de los brotes adventicios durante el periodo de observación. 50
Tabla 9: Prueba de ANOVA aplicada a la variable brotación. La alta significancia obtenida en esta prueba, asegura la significancia altamente significativa de esta variable para cada una de las dosis utilizadas..... 51
Tabla 10: Grupos conformados para las dosis utilizadas utilizando la prueba de Tukey..... 52
Tabla 11: Número de segmentos que no respondieron al proceso de regeneración (mortalidad), obtenidos durante el tiempo de observación. 52
Tabla 12: Prueba de ANOVA aplicada a la variable mortalidad. La alta significancia obtenida en esta prueba, asegura la diferencia de esta variable para cada una de las dosis utilizadas. 53
Tabla 13: Grupos conformados según la prueba de Tukey. El arreglo de los subcinjuntos conforma la hipótesis planteada para esta investigación. 54
Tabla 14: Índices de contaminación obtenidos durante esta investigación. 54
Tabla 15: Prueba de ANOVA aplicada a la variable contaminación. Se obtuvo una significancia altamente significativa entre las dosis utilizadas. 55
Tabla 16: Los subconjuntos obtenidos mediante la prueba de Tukey en la variable contaminación sugieren que su arreglo no está dictado por las dosis aplicadas, sino por factores exógenos al trabajo *in vitro*. 56

Tabla 17: Tabla que muestra que la relación entre las dosis utilizadas y la variable mortalidad es de tipo altamente significativa y de tipo positiva; corroborando los resultados antes presentados. 78
Tabla 18: Relación que existe entre las dosis utilizadas y la variable respuesta es altamente significativa y negativa, eso quiere decir que el aumento progresivo de las dosis genera un decrecimiento en la formación de meristemoides. 79
Tabla 19: Relación que existe entre el aumento de las dosis de irradiación y la formación de brotes. 79
Tabla 20: Coeficiente de correlación para la variable contaminación no es mayor a 0,5 por lo que indica que no existe una relación directa entre las dosis de irradiación y la contaminación obtenida dentro del experimento de irradiación. 80

Índice de anexos.

Figura 14 75
Figura 15 76
Figura 16 76
Figura 17 77
Figura 18 77
Figura 19 78
Tabla 17 77
Tabla 18 78
Tabla 19 78
Tabla 20 79

Resumen.

Palabras clave: regeneración directa, organogénesis, inducción de mutaciones, rayos gamma, *Limonium sinensis*.

En este trabajo se aplicó la inducción de mutaciones mediante rayos gamma cobalto 60 en *Limonium sinensis*, para la obtención de un protocolo de irradiación en especies ornamentales; este trabajo incluye el análisis de las distintas dosis (0, 3, 6, 9, 12, 15) Gy mediante el análisis de las variables: respuesta (crecimiento de meristemoides), brotación, contaminación y mortalidad.

El estudio de las variables propuestas confirmó la hipótesis planteada para esta investigación; ante un incremento de las dosis de irradiación se obtendrá un incremento en la mortalidad de tejidos; se plantea esta hipótesis como un indicador de la frecuencia de mutaciones, ya que según la literatura revisada, la alta tasa de mortalidad comúnmente está relacionada con un aumento en la frecuencia de mutaciones, cuando se aplican agentes mutagénicos físicos.

Uno de los resultados más importantes encontrados es que en *Limonium sinensis* var A, se obtuvo un buen índice de regeneración entre las dosis utilizadas, además se pudo confirmar la hipótesis de que ante un aumento progresivo de las dosis de irradiación, la regeneración celular disminuye.

También se concluyó que el origen morfogenético de una especie es un factor importante a tomar en cuenta al momento de realizar experimentos de regeneración.

Abstract.

Keywords: direct regeneration, organogenesis, mutation induction, gamma ray, *Limonium sinensis*.

In this work there had been applied the induction of mutations by cobalt 60 gamma rays in *Limonium sinensis*, to obtain a protocol of irradiation in ornamental species, this work includes the analysis of different doses (0, 3, 6, 9, 12, 15) Gy by analyzing the variables response (meristemoides growth), budding, pollution and mortality.

The study of the proposed variables confirmed the hypothesis for this research to an increase in irradiation dose will get an increase in mortality of tissues; this hypothesis as an indicator of the frequency of mutations, since according to literature revised, the high mortality rate is related to commonly an increase in the frequency of mutations, when applied physical mutagenic agents.

One of the most important results that have been found is that in *Limonium sinensis* var A, it is possible got a good regeneration rate between the doses used, could also confirm the hypothesis that with a progressive increase in the dose of irradiation, decreases cell regeneration.

It was also concluded that the morphogenetic origin of a species is an important factor to consider when making regeneration experiments.

Capítulo I

1.1 Introducción

Dentro de la morfología vegetal la organogénesis es el proceso mediante el cual las células vegetales "*experimentan una serie de cambios que tienen como resultado final la formación de una estructura unipolar, ya sea un primordio de brote o raíz*" (Pliego & Barceló Muñoz, 2001).

La organogénesis directa es la vía mediante la cual un tejido puede regenerar en ausencia de callo (masa celular sin diferenciación aparente) brotes idénticos al explante original; este tipo de regeneración está estrechamente relacionada con la acción y concentración de auxinas y citoquininas (George, 1993; Segura, 1993). Mientras que la organogénesis indirecta es el proceso mediante el cual las células de donde se derivan órganos se forman a través de un callo (George, 1993).

Este tipo de regeneración ha sido conseguida en distintas especies; por ejemplo, Sheeba et al. (2010) reporta que la regeneración directa de brotes partiendo de segmentos de hoja *in vivo* de *Physalis minima,* fue conseguida al cabo de cuatro semanas mediante la utilización de hormonas vegetales: BAP *bencil amino purina* (5mg/L) y AIA 3-*indol ácido acético* (0.25 mg/L) suplementadas en un medio básico MS (Murashige & Skoog, 1962).

Otro reporte interesante es el presentado por Hedayat et al. (2009) donde la regeneración directa a través de segmentos de hoja *in vivo* fue obtenida en *Tanacetum cinerariaefolium* mediante la utilización de hormonas vegetales: 2,4-D*ácido di cloro fenosa acético* (0.2 mg/L) y BAP (4 mg/L) suplementadas en medio básico MS; obteniendo una frecuencia de regeneración de brotes adventicios del 70%.

Abu-Qaoud (2004), utilizó distintos tipos de explantes como: secciones de bulbo, peciolo y hojas *in vivo* de *Cyclamen Persicum* Mill, siendo el explante con mayor frecuencia de regeneración de micro tubérculos los segmentos de hoja. En esta investigación se utilizó BAP y TDZ suplementado en un medio básico MS.

En los trabajos presentados por Jeong et al. (2001) Seelye et al. (1994) se logra evidenciar la regeneración directa partiendo de segmentos de hoja de *Limonium sp*, mediante la utilización de distintas hormonas vegetales como: TDZ *tidiazuron*, ANA *naftaleno ácido acético*, AIA.

Antes del inicio de esta investigación no se tenían registros de trabajos similares en especies ornamentales realizados en el Ecuador, sin embargo el grupo *Esmeralda Breeding & Biotechnology* había ya efectuado algunos ensayos de inducción de mutaciones *in vivo;* es por esto que la realización de esta investigación fue de suma importancia, tanto para el investigador de la misma como para el laboratorio, ya que se logró implementar un protocolo de irradiación *in vitro* para *Limonium sinensis.*

En este trabajo se aplicó la inducción de mutaciones mediante rayos gamma cobalto 60 en *Limonium sinensis*, para la obtención de un protocolo de irradiación en especies ornamentales; este trabajo incluye el análisis de las distintas dosis (0, 3, 6, 9, 12, 15) Gy mediante el análisis de las variables: respuesta (crecimiento de meristemoides), brotación, contaminación y mortalidad.

El estudio de las variables propuestas confirmó la hipótesis planteada en esta investigación; ante un incremento de las dosis de irradiación se obtendrá un incremento en la mortalidad de tejidos; se plantea esta hipótesis como un indicador de la frecuencia de mutaciones, ya que según la literatura revisada, la alta tasa de mortalidad comúnmente está relacionada con un aumento en la frecuencia de mutaciones, cuando se aplican agentes mutagénicos físicos.

Una de las mayores dificultades fue el fenómeno de contaminación *in vitro* dentro del periodo de regeneración directa, ya que resultaba contraproducente; el aumento de la concentración de soluciones al momento de realizar la desinfección impedía una regeneración de los explantes.

1.2 Objetivos.

1.2.1 Objetivo General:

- Desarrollar un protocolo de regeneración e irradiación con rayos gamma Cobalto 60 en segmentos de hoja *Limonium sinensis*, y realizar el estudio de los resultados obtenidos durante el mismo.

1.2.2 Objetivos Específicos:

- Analizar el índice de regeneración de los segmentos foliares entre las distintas dosis de irradiación empleadas y el grupo control.
- Comparar el índice de brotación entre el grupo control y las distintas dosis utilizadas, para analizar el comportamiento del tejido ante las distintas dosis de irradiación.
- Reportar la causa de la contaminación *in vitro* obtenida dentro del experimento.

1.3 Justificación.

La actividad de fitomejoramiento en *Limonium* sp., comenzó desde 1998 en el Instituto Experimental para floricultura en San Remo Italia, donde se obtuvieron nuevas variedades comerciales que fueron cultivadas en invernadero (Burchi et al., 2004).

Entre las especies más representativas de *Limonium* tenemos *L. vulgare, L. sinuatum, L. ferulaceum, L. bellidifoliu, L sinensis.* Estas especies son cultivadas alrededor del mundo por su fácil adaptabilidad a suelos pobres, poca necesidad de nutrientes y su estructura floral que le hace atractiva en el comercio de flores (Mercuri et al., 1999).

Dentro del grupo Esmeralda Ecuador se siembran alrededor de 478.483 plantas de *Limonium,* lo que representan 9,6 hectáreas de terreno utilizado para este género.
El género *Limonium* es un importante cultivo dentro del mercado de flores de verano, es por esto que para Esmeralda Breeding & Biotechnology (EB&B) (laboratorio especializado en la investigación y producción de nuevas variedades en cultivos ornamentales), de la empresa Hilsea Investments Ltd., la mejora en *Limonium* es importante por sus excelentes características agronómicas como son: alta producción, altura promedio de tallo (100 cm.), buena estructura floral, incremento en la densidad de infloresencia, ciclos de crecimiento de 15 a 18 semanas y su gran diversidad de flores tanto en color como en estructura.

En las últimas décadas, la inducción de mutaciones ha sido estudiada en algunos cultivos con fines de mejoramiento (van Harten, 1998). La inducción de mutaciones es una poderosa herramienta en la búsqueda de novedosas variedades dentro de cultivos ornamentales; como lo reporta (Datta, 2009; De la Cruz Torres, 2008; Jompuk et al., 2008 Zalewska et al., 2008;).

La regeneración directa a partir de segmentos de hoja es una técnica *in vitro* que permite obtener excelentes frecuencias de regeneración (Jeong et al., 2001; Hedayat et al., 2009; Seelye et al., 1994; Sheeba et al., 2010) además, una de las principales razones para utilizar la regeneración directa a través de hojas después del proceso de irradiación es que sera

posible obtener mutaciones puras; eliminando así el fenómeno de “mosaicos genéticos” (Kuo & Cheng, 2005).

Dentro de esta investigación se optimizó el protocolo de establecimiento y regeneración directa de segmentos irradiados; para que de esta manera, *Esmeralda Breeding & Biotechnology* posea un protocolo de irradiación con rayos gamma Cobalto 60 y regeneración directa en *Limonium sinensis*, y de esta forma, intentar extrapolar estos procedimientos a otros cultivos.

Con este trabajo se aumentó la diversidad genética dentro del género *Limonium*, se optimizó el protocolo *in vitro* de regeneración e inducción de mutaciones, y se pudo analizar de manera cuantitativa el efecto de la irradiación de rayos gamma Cobalto 60 sobre los segmentos de hoja utilizados.

Capítulo II

2. Marco Teórico

2.1 Cultivo de tejidos vegetales.

Se puede definir como la ciencia o conjunto de técnicas que permiten el crecimiento de células vegetales, tejidos, órganos tomados desde una planta donante o planta madre (George, 1993).

El cultivo de tejidos es un conjunto de procedimientos que consisten en aislar una parte de una planta (explante) y proporcionarle de las condiciones físicas, químicas y ambientales adecuadas para que expresen su potencial regenerativo (Roca & Mroginski, 1991).

Existen diferentes objetivos en la investigación en el cultivo de tejidos por ejemplo: investigación básica sobre procesos fisiológicos, bioquímicos, moleculares, genéticos de las plantas, investigación aplicada al mejoramiento o producción comercial (Roca & Mroginski, 1991).

2.1.2 Establecimiento de cultivos.

Nuevas plantas pueden ser obtenidas a partir de tres formas:

- Brotes, meristemos pre-existentes los cuales están ambientados para crecer y desarrollarse.
- A través de morfogénesis de nuevos brotes los cuales pueden ser inducidos a crecer en forma de tejidos no diferenciados u organizados.
- A través de embriones somáticos, que crecen igual que los embriones procedentes de semillas.

La principal razón por la cual distintos tejidos, órganos o incluso células vegetales pueden regenerar y formar un organismo vegetal completo es la ***totipotencia*** que es la capacidad celular de mantener latente la capacidad regenerativa de cada célula (George & Sherrington, 1984).

2.1.3 Planta donante.

La selección de la planta donante o planta madre es uno de los factores más importantes en las primeras fases del cultivo de tejidos. Se deben seleccionar organismos con las mejores características fenotípicas; dependiendo del fin con que se vaya a iniciar el cultivo de tejidos; de igual manera la planta donante debe estar libre de enfermedades o plagas (Roca & Mroginski, 1991).

Las plantas donantes que crecen en el exterior ya sea en el campo o en un invernadero están sujetas a estar contaminadas por microorganismos que en la mayoría de los casos se asientan en la superficie; aunque también existen agentes fitopatógenos endógenos (Sugio et al., 2011). La elección de la planta donante es un proceso muy importante en el cultivo de tejidos ya que depende de esta elección las características que se obtengan en las plántulas producidas. Entre las características que debe poseer la planta donante están: buen tamaño y vigor, carencia de enfermedades, estado fisiológico, edad y estado de las raíces (Roca & Mroginski, 1991), en resumen se podría decir que al momento de seleccionar una planta donante esta deberá poseer las mejores características fenotípicas.

2.1.4 Tipo de explante.

El cultivo de tejidos se forma a partir de pequeñas piezas que son de una planta entera; estas pequeñas piezas u órganos son llamados explantes (George, 1993), para tomar un explante deben tomarse en cuenta las siguientes observaciones:
(George, 1993).

- El tipo de cultivo a iniciar
- El propósito del cultivo
- La especie de planta a ser usada

Se pueden utilizar como explantes de partida:

- Callos
- Células en suspensión
- Protoplástos

- Anteras
- Meristemos
- Brotes adventicios
- Nudos, entre nudos
- Embriones
- Segmentos de raíz, hoja, pétalos

2.1.5 Asepsia.

Una de las principales estrategias para tener éxito en el cultivo de tejidos es prevenir la incidencia de contaminantes (Roca & Mroginski, 1991), las siguientes fuentes requieren especial observación al momento de iniciar el proceso de cultivo:

- Los tejidos: pueden llevar contaminantes en su superficie, interior o en ambas partes. Los contaminantes que se encuentran superficialmente se pueden eliminar siguiendo distintos protocolos de desinfección que generalmente utilizan: detergentes, hipoclorito de sodio (Na O Cl), etanol, agua des-ionizada; tanto los pasos a seguir como las concentraciones de las distintas sustancias dependen del tipo de explante así como también del tipo de cultivo a trabajar (George & Sherrington, 1984).

- Cuando la contaminación es de tipo endógena (bacterias o virus que viven dentro de la planta) la desinfección se vuelve más complicada y no siempre es eficaz.

Reportan Samuitiene et al. (2007) la existencia de *Phytoplasma* sp., (bacteria endógena) en algunas especies ornamentales: *Gladiolus* sp., *Limonium sinuatum, Delphinium cultorum, Eryngium alpinum,* entre otras.

Se recomienda utilizar antibióticos como gentamicina, penicilina, estreptomicina en el medio de cultivo; otra manera de lidiar con este problema es el tratamiento de plantas donantes a altas temperaturas (35-45 °C) (Roca & Mroginski, 1991).

2.1.6 Medio de cultivo.

El material vegetal *in vitro* solo puede crecer y mantenerse si está provisto de un medio especializado. Este medio generalmente está compuesto de sales minerales, fuente de carbono que substituyen a la mayoría de microelementos y macroelementos(George, 1993) suplementados muchas veces con otras moléculas como:

- Vitaminas
- Aminoácidos
- Reguladores de crecimiento
- Antibióticos
- Ácidos orgánicos

También se puede definir al medio de cultivo según (George et al., 1987) como una combinación de compuestos orgánicos e inorgánicos que sirven para el crecimiento y manipulación de los cultivos *in vitro.*

2.1.7 Reguladores de crecimiento.

Existen dentro de la planta compuestos que no cumplen funciones como nutrientes; sino más bien como elementos reguladores de crecimiento y desarrollo, estos compuestos son llamados *hormonas vegetales* (George & Sherrington, 1984; George et al., 1987).

Existen químicos sintéticos que cumplen funciones similares a las hormonas vegetales (que actúan endógenamente); estos son sintetizados a partir de procesos de fermentación y son añadidos en el medio de cultivo (actúan de manera exógena)(George, 1993), son llamados *reguladores de crecimiento.*

Es muy importante que el medio para cultivo de tejidos contenga la composición y cantidad correcta de reguladores de crecimiento, dependiendo de ciertas variables como (Kyte & Kleyn, 1996):

- Tipo de explante
- Estado fisiológico del explante
- Especie

- Objetivo del cultivo

2.1.7.1 Efecto biológico de los reguladores de crecimiento.

Generalmente los efectos biológicos de los reguladores de crecimiento no son absolutos ni específicos (George, 1993); la respuesta de los distintos tejidos, células, órganos depende del genotipo y de las condiciones antes mencionadas.

Continuamente la adición de distintos compuestos simultáneamente o por separado es necesaria para observar el efecto aparente (Bhojwani & Razdan, 1986).

2.1.7.2 Principales reguladores de crecimiento usados en el cultivo de tejidos.

- Auxinas
- Citoquininas
- Giberelinas
- Etileno
- Ácido abcísico

Auxinas: derivado del triptófano, son compuestos continuamente usados en micropropagación que son añadidos al medio de cultivo para la regulación del crecimiento y elongación celular.

Las auxinas pueden inducir el crecimiento de tejido desorganizado u organizado, "*dentro del crecimiento organizado las auxinas son responsables de la dominancia apical"*(George, 1993).

Las auxinas promueven el crecimiento primario en las células, iniciación de la raíz y la formación de brotes(Kyte & Kleyn, 1996), de igual manera están relacionadas con: elongación del tallo, entrenudos, tropismo, dominancia apical, abscisión, enraizamiento (Bhojwani & Razdan, 1986), principales auxinas utilizadas:

- 3-indolil-ácido acético (AIA)
- Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)
- 1-naftaleno ácido acético (ANA)

Citoquininas: pueden generar la síntesis de proteínas, maduración de cloroplastos y detener la senescencia de hojas, causa que un solo órganos tratado con esta hormona se vuelva un sitio activo de producción de aminoácidos (George, 1993), añadida al medio de cultivo este compuesto retrasa la dominancia apical e induce la aparición de brotes laterales, retrasa la senescencia (Kyte & Kleyn, 1996), principales citoquininas utilizadas:

- 4-hidroxi-3metil-trans-2-butenilaminopurina (Zeatina)
- N^6-(2-isopentil) adenina (2-iP)
- 6-furfurilaminopurina (Quinetina)
- 6-bencilaminopurina (BAP)

Los mejores efectos dentro del control y desarrollo de la planta *in vitro* se puede evidenciar cuando se añaden conjuntamente auxinas y citoquininas (Bhojwani & Razdan, 1986).

Giberelinas: pueden influenciar el crecimiento de distintas formas: incrementando el largo del tallo, promoviendo la floración o induciendo la floración. En el medio de cultivo al ácido giberélico tiende a comportarse como una auxina (Schroeder & Spector, 1957), la giberelina más utilizada es el ácido giberélico (GA_3)

Etileno: es un gas producido por las plantas, posee propiedades reguladoras como maduración de fruto, floración, abscisión de hojas (Kyte & Kleyn, 1996). La producción de etileno por parte de las plantas esta mediada por vías bioquímicas intrínsecas de la planta; estas vías bioquímicas están promovidas por la provisión de carbohidratos exógenos, luz, auxinas, citoquininas y dióxido de carbono, los efectos fisiológicos producidos por el etileno dentro del cultivo de tejidos son idénticos a los producidos por las auxinas (George, 1993).

Ácido abscísico: es una hormona que se puede encontrar de forma natural en las plantas, es producido directamente a través de la ruta del ácido mevalónico(Neill & Horgan, 1984). Este compuesto es el más común dentro de las plantas, se conoce que posee actividad inhibitoria de crecimiento ya que impide la acción de las auxinas dentro de la célula (George, 1993).

2.1.8 Totipotencia.

Una de las principales características que poseen los tejidos vegetales es la de tener la capacidad latente de producir una planta completa (totipotencia), sin importar el tipo de tejido del que se parta. Aunque en la práctica no todas las células o tejidos logran hacerlo eficientemente; los tejidos que poseen esta característica se denominan: morfogenéticos(George, 1993).

Inclusive muchas células somáticas, completamente desarrolladas y diferenciadas como el mesófilo de las hojas que poseen ADN mitocondrial, plástidos tienen la capacidad de regenerar plantas enteras. Esta plasticidad de las células vegetales difiere en gran manera en comparación con las células animales.

La totipotencia puede ser observada cuando se separan de su ambiente normal células, tejidos u órganos de una planta y estos son colocados sobre un medio que permita la regeneración, como se mencionó anteriormente una célula diferenciada posee la capacidad de “reprogramar” su información genética para generar una planta entera (Atwell et al., 1999).

Se podría decir que la gran mayoría de células y tejidos vegetales poseen esta característica totipotente en cualquier estado fisiológico, sin embargo algunas han perdido la carga génica necesaria para llevarla a cabo (George et al., 1987). Es importante mencionar que no solo las células diferenciadas como las hojas poseen esta característica sino también células no diferenciadas como callos o meristemos, raíces, pétalos etc.

El primer paso en la expresión de totipotencia regenerativa es que la célula debe re-ingresar al ciclo celular, es decir debe volver al ciclo de división celular; este conjunto de pasos se denomina de-diferenciación.

Este tipo de tejidos necesitan de condiciones endógenas y exógenas especiales para poder expresar su capacidad totipotente; una vez que el medio es el adecuado los tejidos u órganos seleccionados se transforman en centros activos de división celular (meristemos morfogenéticos).

Este proceso podría inducir la formación directa de un embrión (embriogénesis directa) o la formación de raíces, tallos, brotes (organogénesis directa); aunque en algunas ocasiones previa la formación de órganos diferenciados puede formarse agrupaciones celulares no diferenciadas (callos), que luego formaran los distintos órganos; esta vía regenerativa es llamada organogénesis indirecta (Atwell et al., 1999).

La totipotencia depende de factores como la competencia, que significa la capacidad de una célula de seguir una ruta específica de desarrollo, y la determinación, que significa la capacidad de una célula de comprometerse irreversiblemente a seguir una ruta específica.

Existen plantas que pueden seguir dos caminos de regeneración: formación de raíces o formación de brotes, es importante mencionar que si bien se puede llegar a formar un callo, este no siempre induce la organogénesis directa.

La capacidad de inducir la regeneración directa mediante totipotencia, puede estar ligada al estado en desarrollo del tejido o explante, ya que conforme las células envejecen pierden progresivamente su capacidad regenerativa, "*en células maduras se ha visto la tendencia a regenerar mediante la formación previa a un callo"* (George & Sherrington, 1984)

La pérdida de totipotencia puede estar ligada a cambios genéticos (cambios físicos en los cromosomas) y a cambios epigenéticos (cambios en la expresión de los genes por la metilación de ADN).

Además como lo menciona Verdeil et al., (2007) factores epigenéticos posiblemente jueguen papeles importantes en el desarrollo y capacidades de las células vegetales; de igual manera diferencias en las características de la cromatina pueden controlar y supervisar el desarrollo de células meristemáticas.

2.3 Ciclo celular en plantas.

El ciclo celular en eucariotas tiene cuatro fases, la fase denominada S donde el ADN se duplica y se sintetizan proteínas asociadas a su función como las histonas, la fase M (mitosis) donde ocurre la división celular seguida de la citocinesis, y los periodos de G1 y G2 que son etapas donde las células somáticas y vegetativas deben crecer antes de proseguir con la etapa de mitosis y donde factores que controlan la ***diferenciación celular*** y ciclo celular operan de manera activa (Hartwell & Weinert, 1989).

La duración de cada fase puede variar dependiendo del tejido y del órgano de la planta pero en términos generales las fases más largas suelen ser las de G1 y G2 mientras que las fases M y S no suelen durar mucho tiempo. Las células que por alguna razón interna o externa detienen su división celular son retenidas en las fases G1 o G2 del ciclo celular (Hartwell & Weinert, 1989).

2.3.1 Mecanismos de revisión o "*Checkpoints*".

Para un correcto proceso de desarrollo y diferenciación celular es necesario mecanismos que aseguren que cada paso dentro de este complicado y trascendental ciclo sea correcto y esté dentro de los parámetros adecuados, procesos como mitosis o citocinesis exigen este tipo de mecanismos de control (Hirt, 1996). El ciclo celular esta estrictamente regulado en las transiciones de G1 a S y de G2 a M, estos mecanismos aseguran que las células puedan entrar en la siguiente ronda de duplicación de ADN o que la célula este apta para el proceso de división celular (Hirt, 1996).

Se podría decir que los mecanismos de "*checkpoint*" aseguran el futuro celular de las siguientes generaciones, por ejemplo es necesario para la célula "conocer" que la mitosis y citocinesis fueron completadas exitosamente antes de iniciar otra ronda de duplicación de ADN, de igual manera para proteger y mantener la integridad del genoma vegetal la célula no puede entrar en la fase M desde la fase G2 a menos que la *síntesis y mecanismos de reparación de* ADN *hayan sido completados* (Jacobs, 1995)**.**

2.3.2 Regulación del ciclo celular.

La regulación del ciclo celular es proceso muy complejo que conlleva: activación de ciertas proteínas reguladoras que en consecuencia inician la activación de genes de transcripción y enzimas relacionadas con la síntesis de histonas, disolución del núcleo celular, reordenamiento de proteínas del citoesqueleto como la tubulina (Srivastava, 2001).

2.3.3 Aspectos generales del ciclo celular en levaduras y mamíferos.

Aunque en aspectos generales la transición de G1-S y de G2-M en eucariotas es similar existen diferencias en los mecanismos que activan y desencadenan estos acontecimientos, por ejemplo las células quiecentes de levaduras son retenidas en una fase denominada G0, y se necesitan señales químicas específicas para que estas puedan entrar al ciclo celular (Fosburg & Nurse, 1991), aspectos como tamaño y cantidad de nutrientes son monitoreados en células de levadura en la fase G1, si estos son adecuados se da una señal de inicio o (START) que desencadena la formación de ciclinas G1 las cuales promueven la transición a la fase S (Nurse, 1990).

Por otro lado cuando las células de mamíferos detienen su proceso de división estas empiezan a diferenciarse y son retenidas en la fase G0, es aquí donde se monitorean aspectos como: factores de crecimiento, mitógenos, antimitógenos y espacio; esta fase es denominada también fase R o (*restriction point*), si esta fase es superada se empiezan a sintetizar ciclinas del tipo D y E y la célula entrará a otra ronda de síntesis de ADN y mitosis (Nurse, 1990).

Es importante señalar que una vez que las células de levaduras o mamíferos han iniciado el ciclo celular estas completan todas las fases del mismo hasta llegar a la fase G1.

2.3.4 Aspectos específicos en ciclo celular de plantas.

Por otro lado cuando las plantas dejan de dividirse, estas son retenidas en las fases G1 o G2, aunque estén ya diferenciadas como una célula específica; además en plantas no parece existir un punto de arresto G0, señales de START o sitios de restricción (Srivastava, 2001). En contraste con lo descrito en levaduras o mamíferos una vez iniciado el ciclo celular en plantas estas no necesariamente deben cumplir todo el ciclo hasta llegar a la fase G1, las células pueden quedarse retenidas en la fase G2 o fase S.

Estas importantes diferencias entre el ciclo celular de plantas y levaduras, mamíferos se deben a las estrategias de “crecimiento abierto” y “diferenciación abierta”(Srivastava, 2001) ; esto quiere decir que dependiendo de las condiciones ambientales y de las necesidades nutricionales una planta puede “elegir” qué camino tomar en su desarrollo citológico; ya que a diferencia de otros organismos móviles las plantas son sésiles y están regidas por el ambiente que les rodea.

Factores ambientales como luz, situaciones de stress (heridas, falta de nutrientes), tratamientos hormonales son conocidos como los factores que desencadenan la división celular en plantas.

2.4 Mecanismos de reparación del ADN.

Siendo la molécula de ADN el “material” que guarda la información genética de los organismos, se entendería que esta molécula posea ciertas características que la hagan estable a lo largo del tiempo. Sin embargo día a día bajo condiciones normales (condiciones termodinámicas favorables) (Schrodinger, 1944), se producen cambios en las moléculas de ADN que generarían mutaciones, si es que estas no fueren reparadas.

Para que estas lesiones o modificaciones a nivel genético sean expresadas sin ser nocivas para el organismo que les adquiere, el ADN posee mecanismos de tolerancia; es decir estrategias que permiten a la célula seguirse dividiendo a pesar de la modificación sufrida (Britt, 1996).

El impacto biológico que tiene cualquier agente nocivo para el ADN considera dos tipos de aspectos: el tipo de daño químico que inducen las lesiones y la eficiencia en la reparación del ADN(Britt, 1996). Dados los distintos tipos de daño a nivel genético según lo descrito por (Britt, 1996) es recomendable abordar la variedad de lesiones que sufre el ADN y luego describir los distintos tipo de agentes que los causan para luego concluir con los principales mecanismos usados por las plantas para reparar estos daños.

2.4.1 Lesiones por oxidación.

Existe una gran variedad de lesiones producto de la oxidación en el ADN inducida por radicales hidroxilo y oxido nítrico, algunas bases lesionadas como la timina-glicol y su degradación actúan como agentes que bloquean la replicación del ADN pero no son agentes

mutagénicos (Dempple & Harrison, 1994). Uno de los agentes pre-mutagénicos más notables es la base 8-hidroxiguanina que puede emparejarse con igual facilidad a A o a C, la mayoría de lesiones a nivel de ADN por oxidación ocurren en el esqueleto que conforma la cadena de ADN (azúcar-fosfato) generando rupturas de una cadena (*single strand breaks*) este tipo de rupturas son reparadas de manera más eficiente por enzimas y proteínas especializadas (Britt, 1996).

Las mayores fuentes de oxígeno activado dentro de la célula son sin duda los organelos citoplasmáticos como cloroplastos y mitocondrias, muchas veces estos organelos dirigen de manera errónea electrones hacia el oxígeno generando así peróxidos (Wallace, 1992, Bowler et al., 1992).

2.4.2 Daño inducido por radiación ionizante.

La radiación ionizante difiere del demás tipo de radiaciones ya que esta carece totalmente de especificidad, es decir la probabilidad de que cualquier componente de la célula interactúe con la radiación depende absolutamente de la cantidad radiación que se le suministre a la célula (Britt, 1996), entonces se podría decir que el daño generado por la radiación ionizante (rayos gamma) depende enteramente de la dosis proporcionada al tejido, a mayor dosis mayor daño se proporcionara en la célula.

Por esta razón el blanco general de la radiación en las células es el agua, y la mayoría del daño que se causa es por la interacción de la radiación con radicales hidroxilo (Ward, 1975).

La absorción directa de la radiación también puede producir rupturas de simple cadena en el esqueleto de azúcar-fosfato, sin embargo el reconocimiento de una lesión por parte de una cadena no lesionada puede generar un aumento en el porcentaje de rupturas de doble cadena (Britt, 1996).

La radiación ionizante genera lesiones a gran escala, es decir rupturas cromosómicas como, inversiones, delesiones, duplicaciones y translocaciones en segmentos del cromosoma de tejidos vegetales, pero también puede generar mutaciones puntuales a causa del daño oxidativo de las bases (Sun et al., 1992).

2.4.3 Mecanismos de reparación de ADN producto de radiación ionizante.

La radiación ionizante no tiene un blanco específico dentro de las células en general, y el daño que causa dentro de la misma es proporcional a la cantidad de radiación utilizada, por estas características el tipo de lesión causada por radiación ionizante consiste en re-arreglos cromosomales como: inversiones, delesiones, duplicaciones y translocaciones en segmentos del cromosoma de tejidos vegetales en vez de mutaciones puntuales como lo hace el tipo de lesión causada por los agentes químicos como el etil-metil-sulfonato (EMS).

2.4.4 Mecanismos de tolerancia.

Los mecanismos de reparación mencionados anteriormente nos muestran como el segmento de una cadena lesionada es cortado y remplazado por otro hasta rellenar el espacio producido por la lesión, pero si la célula se replica antes de que la lesión sea reparada esta lesión detendrá la replicación; normalmente la ADN polimerasa reiniciará la síntesis en el sentido 3´ de la lesión pero aún queda un espacio sin empatar en la cadena naciente al sentido opuesto de la lesión (Britt, 1996).

Se esperaría entonces que ese espacio sin empatar se convierta en un fenómeno letal dentro de la célula, pero existen mecanismos por el cual la replicación se puede completar aún con la presencia de este tipo de fenómenos.

Estos mecanismos de tolerancia generalmente llamados “mecanismos de reparación post-replicación” se pueden dividir en: *bypass* de dímeros y reparación por recombinación (Britt, 1996)

2.5 Compromiso, determinación y diferenciación celular.

El crecimiento vegetal tiene lugar en dos etapas: la proliferación de células no diferenciadas (células que no han adquirido propiedades estructurales, metabólicas y funcionales distintas a su célula progenitora), crecimiento y diferenciación de las mismas (Cutler et al., 2007).

Dentro del crecimiento y desarrollo vegetal es importante mencionar a las células madre de las plantas o también llamadas meristemos, que son agrupaciones celulares en forma de anillos concéntricos que luego formaran los tejidos fundamentales de la planta, los meristemos son estructuras que poseen características embrionarias, es decir poseen la

información necesaria para generar tejidos que formarán el tejido de un brote, raíz o tallo (Lack & Evans, 2001).

La estructura básica de un meristemo puede ilustrarse de la siguiente manera:

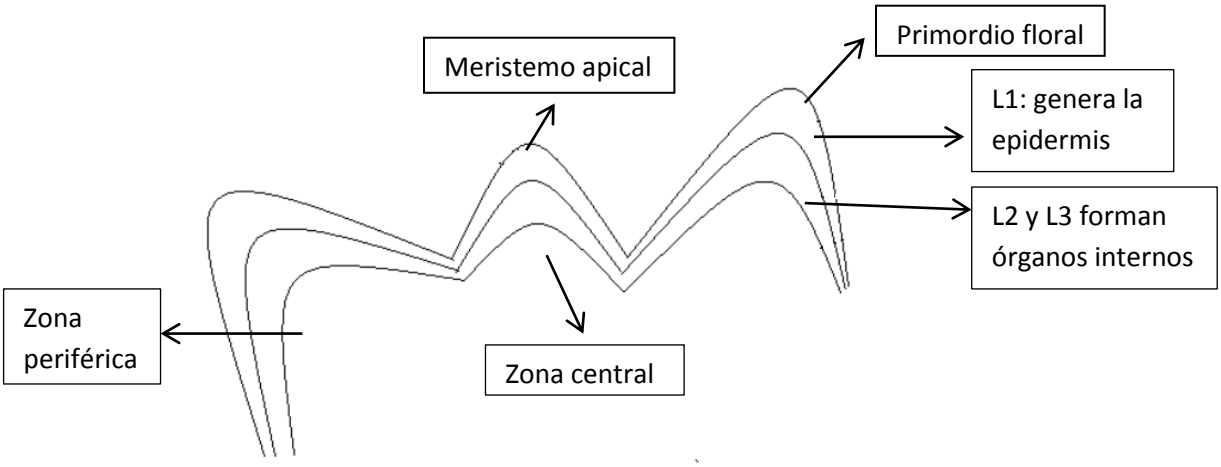

Figura 1: estructura de un meristemo.

Realizado por **Franklin Villegas Páliz 2012**

Las plantas poseen un crecimiento "abierto" eso quiere decir que poseen meristemos laterales y apicales que les permiten conservar células no-diferenciadas, también poseen la capacidad de revertir un estado o especialización de un tejido en determinadas circunstancias (Srivastava, 2001).

Se denomina "compromiso" celular al estado en que una célula ve restringido sus opciones de crecimiento, molecularmente se podría decir que "compromiso" celular se refiere a que solo ciertas partes del genoma de una célula serán transcritas hacia las células hijas(Srivastava, 2001)**.**

Determinación celular se refiere al estilo o tipo de crecimiento que elije la planta, por ejemplo puede generar brotes por medio de organogénesis o puede generar un embrión por medio de embriogénesis (Lintilhac, 1999).

Mientras que diferenciación celular se refiere a la expresión genética, proteica específica por parte de células o tejidos, también se pude definir como el proceso mediante el cual las

células que poseen un origen común se vuelven fisiológicamente y morfológicamente diferentes, en un contexto general se podría decir que la diferenciación es una manifestación detectable de la determinación celular (Lawson & Poething, 1995).

2.5.1 Linaje celular vs posición.

El destino de una célula se ve afectado de mayor manera por su posición dentro del cuerpo vegetal más que por su linaje (entiéndase linaje como el tipo célula madre de dónde provino la célula en cuestión), esto quiere decir que el compromiso que adquiere una célula está restringido dentro de ciertos límites: su posición dentro del cuerpo vegetal y su relación con los órganos y células vecinas (Meins & Wenzler, 1986).

En la mayoría de casos brotes generados a partir de células epidérmicas provienen de un pequeño grupo de células madre que residen en la capa L1 del meristemo (Figura 1). Sin embargo derivados de la capa L1 están "comprometidos" celularmente a generar células epidérmicas y no brotes adventicios ya que su posición más hacia el exterior de la célula facilita esa determinación (Taiz & Zeiger, 2006).

2.5.2 El desarrollo celular está dirigido por redes de células que interactúan entre sí.

El destino de una célula no está determinado por origen sino más bien por su posición, entonces las células necesitan comunicarse entre sí para coordinar la actividad celular.

Existe evidencia de que un componente de la pared celular una glicoproteína llamada arabinogalactan está relacionada con la comunicación posicional entre células vecinas, más no en comunicaciones de "larga distancia" (Taiz & Zeiger, 2006).

Todavía no se tiene claro cómo las células interactúan entre sí, pero se cree que componentes de la pared celular además de proteínas, mRNA y hormonas son posibles candidatos como moléculas que participen dentro de este proceso, además se ha encontrado evidencia de que la expresión proteica del gen *KNOTTED1* se transmite vía plasmodesmo a tejidos donde este no se encuentra activo (Srivastava, 2001).

Hormonas vegetales como: auxinas, citoquininas, etileno, ácido absícico y giberelinas juegan papeles fundamentales en el crecimiento y desarrollo vegetal, por ejemplo está ampliamente demostrado que la presencia de auxinas es necesaria para el crecimiento axial

de los tejidos vasculares, esta evidencia es corroborada con el trabajo de Mayer et al. (1993) que indica la presencia de genes envueltos en el desarrollo axial que dependen de la presencia de auxinas

2.5.3 La división celular y su papel en la determinación.

La división celular está directamente relacionada con la determinación y diferenciación, la división celular provee la información necesaria para organizar y estabilizar las principales diferencias citológicas que fundan las características de la determinación y diferenciación (Srivastava, 2001; Hemerly et al., 1999).

Se cree que las divisiones celulares asimétricas (divisiones celulares donde el material citoplasmático es repartido de manera desigual entre las células hijas, el tamaño entre las células y los productos genéticos como mRNA y proteínas son repartidos de manera desigual) tienen un papel preponderante en la determinación y diferenciación de las células, por concepto se debería aceptar que toda célula que difiere de célula progenitora es por que proviene de una división celular asimétrica (Scheres & Benfey, 1999).

Siendo la mayoría de divisiones celulares simétricas las diferencias entre las células resultan luego de la citocinesis, estas diferencias resultan de la expresión de distintos genes y de la síntesis de proteínas durante la fase G1 y G2 del ciclo celular (Torres-Ruiz &Jürgens, 1994), la acumulación de estos cambios pueden causar cambios abruptos en la célula o estos cambios pueden presentarse de manera gradual.

2.5.4 Mecanismos de diferenciación.

En los organismos multicelulares células y tejidos sirven para funciones específicas y especializadas, estas funciones son realizadas eficientemente en beneficio de todo el organismo pero a costa de células, tejidos y órganos especializados (Brand et al., 2000).

Por ejemplo las hojas y raíces poseen el mismo ADN pero están especializadas para distintas funciones porque distintos genes están expresados en estas células (Brand et al., 2000).

Debe entenderse a la expresión genética no solo como la acción directa de un gen, sino también todas las modificaciones post-traduccionales y post- transcripcionales así como también el silenciamiento de genes.

La actividad genética dentro de la diferenciación envuelve al menos tres tipos de genes: genes "*house keeping*" (genes que mantienen su función en la mayoría de células organismos como enzimas que participan en la respiración, absorción y fijación de azúcar, síntesis de proteínas o síntesis de nucleótidos), genes que expresan funciones específicas y son transferidos a través de células a tejidos, genes que regulan la expresión de células y tejidos, genes que son silenciados en determinadas ocasiones (Srivastava, 2001).

2.5.5 Genes regulatorios.

La mayoría de genes encargados de la regulación codifican factores de transcripción o proteínas que se encargan en señalar el estadio de distintos procesos como las quinasas. Muchos factores de transcripción codifican futuros patrones de desarrollo de genes estructurales que codifican proteínas específicas de células o tejidos, estas proteínas también están envueltas en la percepción de señales ambientales, hormonales y de células vecinas (Torres-Ruiz & Jürgens, 1994).

2.5.6 Silenciamiento de ciertas partes del genoma.

Existen algunas partes del genoma que no son transcritas durante el proceso de diferenciación, por ejemplo genes que transcriben proteínas que permiten a las semillas mantenerse latentes mientras están almacenadas no son transcritos a tejidos vegetativos, otro ejemplo interesante es que los genes asociados al desarrollo de cloroplastos no son transcritos a tejidos que no exhiben el color verde (Taiz & Zeiger, 2006).

Está claro que los genes que codifican la producción de citoquininas están distribuidos alrededor de toda la planta, pero en experimentos de cultivo de tejidos utilizando plantas de tabaco se ha logrado demostrar que si se toma partes distintas de una misma planta (tallo y hoja) se logra evidenciar que los cultivos que provienen del tejido de tallo muestran producción de citoquininas endógenas mientras que los cultivos provenientes de el cultivo de hojas no muestran producción de citoquininas, esto nos dice que existe un silenciamiento

durante la diferenciación y regeneración de ciertos genes involucrados en la producción de citoquininas (Theissen et al., 2000).

En resumen la diferenciación y supresión de ciertos genes conllevan a la diferenciación de células, tejidos y órganos en plantas (Srivastava, 2001).

2.5.7 Dediferenciación y Rediferenciación.

La dediferenciación significa una reprogramación en la maquinaria metabólica de la célula, silenciamiento de genes con determinadas funciones en la célula y un ajuste hacia nuevas condiciones (Srivastava, 2001). Esto es seguido por una nueva programación y transcripción de genes en la célula, fenómeno conocido como rediferenciación.

2.6 Morfogénesis.

La creación de una nueva "forma" y organización vegetal es llamada morfogénesis (George, 1993), es así como mediante el cultivo de tejidos nuevos brotes u órganos adventicios (tejidos u órganos recientemente conseguidos por la planta) son obtenidos.

Acorde con Segura (1993) la morfogénesis también puede definirse como la génesis o iniciación de la forma y función de un tejido en la planta, su estudio tiene como objetivo identificar los procesos bioquímicos y fisiológicos que conducen a la aparición de nuevas estructuras en la planta.

Mediante la morfogénesis podemos obtener las siguientes estructuras: brotes (caulogénesis), raíces (rizogénesis), embriones somáticos y flores (George, 1993). Dentro de la fase de multiplicación de plantas en el cultivo de tejidos vegetales es importante la caulogénesis, ya que mediante este proceso podemos obtener nuevas plantas a través de una parte o esqueje de la planta donante.

Tanto los brotes como raíces y embriones somáticos se forman a través de una o varias células, las cuales son inducidas por el medio de cultivo (George, 1993), luego estas células son convertidas en centros activos de división celular (meristemos morfogenéticos) cada uno capaz de producir distintos tejidos u órganos.

2.6.1 Organogénesis directa e indirecta.

Los puntos activos de división (meristemos morfogenéticos) pueden activarse teóricamente en las siguientes formas: a) transfiriendo un segmento de tejido, órgano o célula diferenciado hacia un medio que permite la formación directa de nuevas estructuras sin la proliferación de células no diferenciadas, b) desarrollo de estructuras a partir de células no diferenciadas y no determinadas, generalmente conocido como callo (George, 1993).

Se han descrito estos caminos morfogenéticos para las plantas; sin embargo es difícil distinguir entre ambos (George, 1993). Se ha visto evidencia de que meristemos formados directamente pueden crecer desde estructuras semejantes a un callo, además estos meristemos generalmente se encuentran rodeados de callos de-diferenciados.

Se cree que la capacidad morfogenética de determinadas células usualmente acarrea una inclinación hacia un desarrollo morfogenético en particular, sea este la formación de brotes o órganos (Segura, 1993), estas células son denominadas “competentes”.

Es también posible que si las células de un explante no son competentes al momento de ser transferidas estas pueden ser inducidas a este estado por medio de los componentes del sustrato de cultivo (George, 1993).

Durante la formación de nuevos meristemos durante la organogénesis directa o indirecta las células competentes adoptan cierta determinación, la cual dirige la siguiente etapa de desarrollo (Segura, 1993).

Aparentemente en la organogénesis indirecta la determinación está dictada por los reguladores de crecimiento, mientras que las células que se desarrollan bajo el esquema de organogénesis directa están ya inclinadas hacia un tipo de desarrollo determinado y que los componentes del sustrato facilitan su iniciación (George, 1993).

Se ha denominado a las células que siguen el camino de desarrollo directo son llamadas “permisivas” mientras que la células que siguen el camino indirecto son denominadas “inductivas” (George, 1993).

La determinación y competencia de las células varía según del explante del que parte y se cree que su capacidad morfogenética está ligada al historial genético de la planta. Es importante señalar que las células determinadas transmiten su “estado” hacia las células hijas, durante la división celular. Cuando la célula ha elegido un camino morfogenético en particular la determinación queda establecida y se vuelve irreversible, entonces se dice que las células están “canalizadas” (George, 1993).

2.6.2 Organogénesis directa.

Cuando segmentos de plantas son transferidos hacia un medio de cultivo nuevos brotes, raíces o embriones somáticos pueden ser producidos, es importante tomar en cuenta el tipo de explante que se utiliza ya que este determina el potencial morfogenético de la célula, entre los tipos de tejidos que podemos optar están: peciolos, raíces, hojas, cotiledones o tallos (Segura, 1993).

La iniciación de brotes formados directamente, se da a la par de la división celular, alrededor de las 48 horas después de que las células son transferidos hacia el medio de cultivo (George, 1993).

La característica principal de los brotes formados directamente de una sola célula es que cuando se aplican tratamientos mutagénicos se obtienen mutantes “sólidos”, esto quiere decir que todas las células de un mismo tejido exhiben el mismo número de material cromosómico, mientras que los mutantes quiméricos son células de tejidos que muestran distinto número de material cromosómico (Van Harten, 1998)

2.6.3 Meristemoides.

Son órganos que se forman en el tejido de las plantas, a partir de células individuales o a través de un grupo de células, que dan paso a estructuras esféricas y poseen un citoplasma densamente teñido y un núcleo largo (George, 1993).

2.6.4 Organogénesis indirecta.

Cuando los reguladores de crecimiento o fitohormonas exógenas favorecen la rápida proliferación de callos se dice que el explante se desarrolla de manera indirecta, generalmente los callos no dan paso a la formación de meristemos morfogenéticos, sin embargo se ha visto evidencia de que cuando los callos son dejados por largos periodos de tiempo en un medio el desarrollo de organogénesis es inevitable, mientras que en otros casos los callos deben ser transferidos hacia un medio de distinta composición para iniciar la regeneración de brotes o raíces.

2.7 Fitomejoramiento mediante inducción de mutaciones.

Una mutación puede ser definida como un cambio o modificación en el ADN que es heredable sufrido por una célula viva, y que no es causado por el fenómeno de segregación o recombinación genética. La aplicación de esta teoría en las plantas superiores se remonta al año 1590 donde tomo el nombre de "*mutation breeding*" o lo que hoy conocemos como fitomejoramiento (Van Harten, 1998).

La primera contribución hecha para este campo de estudio fue realizada por el botánico holandés Hugo de Vries (1848-1935), en su obra "*Die Mutations theorie"* donde se presenta la aparición de cambios repentinos en distintos caracteres que llevaron al origen de nuevas especies.

También hace mención sobre los tipos de radiación (rayos X y rayos γ) descubiertos por W. K. Röntgen en 1895, H. Becquerel en 1896 y M. Curie en 1897 y además sugirió que este tipo de agentes físicos pueden ser usados para inducir mutaciones (Van Harten, 1998).

Las mutaciones son la última fuente de variación genética, esta proveen un nuevo material sobre el cual nuevas especies pueden aparecer, el proceso de aparición de mutaciones se

denomina mutagénesis y, en conjunto con la recombinación de genes, cromosomas y la selección natural son las principales fuerzas evolutivas (Stebbind, 1950).

Si bien la recombinación es un proceso mediante el cual se generan nuevas especies mediante la combinación de genes, este proceso no altera la estructura de genes ni el número de cromosomas que se encuentran en el núcleo, es importante mencionar que existe material genético extra-nuclear y se encuentra dentro de cloroplastos y mitocondrias (Rieger et al., 1991)

Dentro del fitomejoramiento se considera el término "idiotipo" para indicar la suma total del contenido de ADN celular y extra-celular presente en una planta, es necesario remarcar en este contexto el término genotipo, que se refiere a la suma total de genes dentro de los cromosomas y fenotipo se refiere a la expresión de dichos genes (Rieger et al., 1991). Según este concepto se puede crear una nueva definición para mutación dentro de las plantas: *"cualquier cambio heredable en la constitución idiotípica que no es producto de recombinación o segregación"* (Van Harten, 1998).

Se ha demostrado ampliamente en la mayoría de libros de texto de genética, biología y biología molecular, como el uso de organismos mutantes ha ayudado a la comprensión sobre el funcionamiento y expresión de distintos genes así como también de vías bioquímicas, comportamiento de la mutación y expresión de proteínas, se sabe que se utilizan organismos modelos para este tipo de estudios como son *D. melanogaster, A. thaliana, C. elegans* (Beattie, 2011).

El objetivo principal del fitomejoramiento es el de incrementar o mejorar las características que hacen atractivas a un cultivo en particular, ya sea mediante cualquiera de las técnicas de biotecnología vegetal como: cultivo de tejidos, inducción de mutaciones o ingeniería genética (Van Harten, 1998). Entre los principales propósitos del fitomejoramiento tenemos: a) mejora en la producción, b) calidad, c) precocidad, d) resistencia a plagas y patógenos, e) costos de producción.

2.7.1 Mutaciones para el incremento de la producción.

El término "producción" no solo se refiere a la generación de mayor cantidad de frutos o semillas sino también en la obtención de cultivos con mayor rendimiento en la extracción de un compuesto determinado, por ejemplo almidón, enzimas o pigmentos (Van Harten, 1998).

Se han reportado resultados positivos en la utilización de agentes mutagénicos para el incremento de la producción de ciertos cultivos como *Hordeum vulgare,* donde la producción de este cultivo se incremento en un 11% (Bouma, 1967).

2.7.2 Mutaciones para el cambio de estructura.

Se han obtenido grandes resultados en las mutaciones inducidas para el cambio de estructura en plantas, se han registrado nuevas variedades de cereales que muestran resistencia a plagas ya que poseen un tallo más corto y que permite una mayor capacidad cultivo (Van Harten, 1998).

Otro cambio interesante en la estructura de una planta es la descrita por (Konzack, 1956) donde se indujo el "hábito" arbustivo en *Phaseolus vulgaris* mediante la utilización de radiación inducida.

2.7.3 Mutaciones en la inducción de resistencia.

La inducción de mutaciones para obtener resistencia a ciertas plagas ha sido una de las principales tareas por parte de los fitomejoradores, sin embargo poco provecho se ha logrado mediante esta técnica (Anónimo, 1977). La principal dificultad radica en que la resistencia de las plantas a ciertos patógenos suele ser parcial, ya que la alta tasa de reproducción de estos organismos le confiere la habilidad de obtener nuevas estrategias para romper los mecanismos de defensa adquiridos por la planta (Micke, 1993).

2.7.4 Mutaciones espontáneas.

Las mutaciones espontáneas son aquellas que se producen de manera natural, es decir sin la intervención del hombre, este tipo de mutaciones se producen *in-vivo* e *in-vitro* por acción de agentes mutagénicos naturales como: radiación UV, radiación emitida por elementos en desintegración (uranio, torio) (Van Harten, 1998).

Las mutaciones espontáneas pueden resultar por eventos que ocurren dentro de la célula o puede ser causado por factores exógenos; las principales causas para que ocurran este tipo de mutaciones son errores en: la replicación de ADN, recombinación y reparación de ADN, acción de transposones, daño de ADN por agentes mutagénicos naturales(Levvitt, 1972).

Cuando las plantas crecen bajo condiciones de stress como: heladas, ataque severo de insectos se ha demostrado en *Allium cepa, Spinacia oleracea* y algunas especies de la familia *Cruciferacea* que generan compuestos químicos como la isigrina, el cual es un precursor del aceite de mostaza y que se encuentra relacionado con el gas mostaza, el cual fue el primer agente químico responsable de causar mutaciones (Suzuki et al., 1989).

2.7.5 Mutaciones inducidas.

La inducción de mutaciones en plantas se basa en la aplicación artificial de agentes mutagénicos, siendo estos físicos o químicos. La frecuencia en que estas mutaciones aparecen es de 10^2 a 10^3 veces más frecuentes que en los procesos espontáneos (Lindgren, 1972).

Ichikawa et al. (1991) reporta que al utilizar bajas dosis de rayos gamma se incrementó la aparición de eventos mutagénicos en células de *Trandescantia*, la frecuencia de estos eventos fue de 10-20 células mutantes por 10^4 divisiones celulares.

Se ha visto que la frecuencia de mutaciones inducidas por agentes químicos es de 5 a 10 veces mayor que las obtenidas por agentes físicos, sin embargo en programas de fitomejoramiento la aparición de demasiados eventos mutagénicos en una sola célula no es tan aconsejable ya que se vuelve difícil estabilizar la mutación (Van Harten, 1998).

2.7.6 El uso de radiación en la inducción de mutaciones.

Dentro de la inducción de mutaciones en plantas se estudian dos tipos de radiación que pertenecen a distintas categorías: a) rayos X y rayos Gamma que viajan a través de ondas y pertenecen al espectro electromagnético y b) partículas móviles como: protones, neutrones y electrones que pertenecen al tipo de radiación corpuscular (Van Harten, 1998).

En la inducción de mutaciones se utilizan altos niveles de energía producto de los diferentes tipos de irradiación, esta liberación de energía al atravesar la materia es denominada

“ionización” (Van Harten, 1998)**,** entonces la radiación ionizante está formada por ondas o partículas que traviesan la materia.

Dentro de la práctica de fitomejoramiento es de uso común la radiación proveniente de rayos X y Gamma, ya que estos poseen la suficiente energía para “ionizar” las partículas y átomos con los que interactúan.

Dentro de los tipos de radiación antes mencionados se debe incluir a la radiación ionizante densa, a la cual pertenecen las partículas alfa y beta que son emitidas por los radionucléidos. Los nucleídos son átomos que poseen un número de específico de protones y neutrones en su núcleo, mientras que la expresión isotopo se refiere a los átomos que poseen las mismas propiedades químicas (igual cantidad de protones y electrones en el núcleo) pero diferente masa nuclear debido al diferente número de neutrones (Van Harten, 1998)**.**

Los radionucléidos y radioisótopos son elementos inestables y la liberación gradual de energía es forma de estabilizar su molécula. El tiempo necesario para estabilizar a un radionucléido o radioisótopo se denomina vida-media.

2.7.7 Radiación en la naturaleza.

El número de mutaciones en un proceso de irradiación depende de ciertos factores que son: el tipo de radiación utilizada, la dosis, el porcentaje de dosis así como también la especie de planta, diferencias en el estado fisiológico (Van Harten, 1998)**.**

La dosis se refiere a la cantidad de energía producida por una fuente, mientras que el porcentaje de dosis es el porcentaje en el cual una dosis es administrada o el cociente de una dosis para el tiempo.

De acuerdo con Van Harten (1998) la frecuencia de mutaciones genéticas, delesiones y rupturas de doble cadena son directamente proporcionales a la dosis administrada y no se ven influenciadas por el porcentaje de dosis, de igual manera se indica que ante un mayor incremento de la dosis los mecanismos de reparación de ADN dejan de funcionar.

Según González (1994) la radiación actúa en un solo sentido de interacción con las moléculas y que en células homogéneas esta distribución se configura de manera homogénea.

La relación matemática entre la dosis administrada y la expresión de un efecto atribuible a la radiación es descrito como la ecuación cuadrática linear, donde bajas dosis de radiación tienen menos probabilidades de interactuar (en un solo sentido) con una población de células (González, 1994).

2.7.8 Efectividad, eficiencia y eficacia.

Dentro del análisis de los diversos tratamientos mutagénicos se deben tomar en cuenta las siguientes definiciones: a) efectividad se refiere al número de mutaciones producidas por unidad de dosis, b) eficiencia indica la producción de cambios deseables sin la aparición de efectos adversos como infertilidad, daño de tejidos y c) eficacia que refiere al "poder" o capacidad de un mutagénico para producir mutaciones (Van Harten, 1998).

2.7.8.1 Radiosensividad.

Es una medida que indica la cantidad de efectos reconocibles en un material irradiado (plantas, partes de plantas). Las células que se encuentran en división celular activa son las más vulnerables a la radiación, la radiosensividad es una propiedad particular del sistema biológico en estudio, pero esta está sujeta a diversos factores modificantes (Van Harten, 1998).

Estos factores modificantes pueden ser factores internos (biológicos) y externos como: estado del material vegetal antes, durante y después de la irradiación, otro factor importante a tomar en cuenta es la diferencia en el tamaño del núcleo celular (NV) o también denominado volumen del cromosoma en interfase (ICV), que es el cociente de el tamaño nuclear de una célula dividido para el número de cromosomas somáticos propios de la especie.

La primera relación reportada entre el ICV y radiosensividad en plantas herbáceas se la hizo en 1963 por (Van Harten, 1998) y se encontró una relación negativa donde, ante un menor volumen nuclear mayor será la radiosensividad del organismo en estudio.

En estudios más recientes se reporta que el estudio de la radiosensividad es muy importante dentro de la inducción de mutaciones y el fitomejoramiento, el análisis de factores nucleares como: tamaño y número de cromosomas, número de centrómeros y su posición, grado de ploidía y contenido de ADN nuclear, además de otros factores como cantidad de humedad, color y forma de la flor, esto no quiere decir que la radiosensividad es un efecto dependiente del genotipo (Datta, 2009).

2.8 Rayos Gamma.

Los rayos gamma fueron descubiertos en 1900 por P. Villard, estos se originan en el núcleo atómico y son emitidos por un núcleo inestable. Pertenecen a la radiación electromagnética y poseen la longitud de onda más corta, así los rayos gamma poseen el nivel de energía más alto dentro de esta categoría (Van Harten, 1998)**.**

La radiación gamma se obtiene a través de la desintegración de radioisótopos ^{137}Cs y ^{60}Co, las fuentes de rayos gamma pueden usarse para irradiar diferentes tipos de material vegetal como: semillas, plantas enteras, partes de plantas, cultivos en agar, anteras, polen etc.

Los rayos gamma poseen un nivel de energía que va desde los 10 keV (kilo electrón voltio) hasta unos cientos (Androvic, 2012), son considerados como los más penetrantes dentro de los mutagénicos físicos.

La radiación gamma al igual que los rayos X puede atravesar fácilmente la materia, también conocidos como fotones tienen la capacidad de viajar a la velocidad de la luz (Androvic, 2012), además poseen la capacidad de ionizar la materia que atraviesan y por ende causar daño en células vivas, el daño producido por la radiación gamma es proporcional a las distintas vías ionizadas por el material que absorbió la radiación; el daño producido por la radiación gamma depende de tres factores: 1) cantidad de radiación emitida, 2) nivel de energía y 3) la distancia a la que fue sometido (Gager, 1907) .

Al interactuar con los componentes de la célula los rayos gamma producen radicales libres produciendo así un alto nivel de daño genético.

La sensibilidad de los organismos varía según complejidad, por ejemplo los mamíferos son los organismos más sensibles a la radiación gamma mientras que las bacterias son las más

resistentes, en especial aquellas que tienen la capacidad de formar esporas (Donelly et al., 2010) .

Las células en proceso de división son más sensibles a la radiación, la toxicidad de los radionucléidos depende de la cantidad absorbida, su distribución en el organismo, vida media de eliminación, tipo de radiación emitida y nivel de energía (Donelly et al., 2010).

Se ha estimado que la exposición a 1 Gy de irradiación es capaz de producir mil rompimientos de una cadena, 40 rupturas de doble cadena (Borrely et al., 1998), como se mencionó anteriormente la radiosensividad de un organismos está determinado por ciertos factores como: estadio del material irradiado, ICV; es importante tomar en cuenta también que la sensibilidad está afectada por la capacidad de un organismo en reparar rupturas de doble cadena, entonces se podría decir que aquellos organismos que no son capaces de reparar eficientemente las rupturas de doble cadena son más sensibles que otros (Broomfield et al., 2001).

Tabla 1: Unidades de radiación y sus definiciones.

Unidades de radiación	**Definición**
joule:	(J) es la unidad de energía recibida o emitida
electrón voltio:	(eV) es la unidad que describe el poder de penetración de un tipo específico de radiación
roentgen:	(R) antigua unidad para describir la exposición o la cantidad de ionizaciones en el aire
gray:	(Gy) es la unidad actual adoptada por el SI que describe la cantidad de dosis absorbida por radiación, (1 Gy= 1 J/Kg). La dosis absorbida se refiere a la energía transferida por radiación hacia un blanco.
rad:	(rad) es la antigua unidad que describe la cantidad de dosis absorbida por radiación. 1 Gy = 100 rad.

Realizado por **Franklin Villegas Páliz 2012.**

2.9 Contaminación Endógena.

La contaminación endógena en tejidos vegetales se debe a la presencia de la bacteria intracelular denominada *Phyto*plasma, estos patógenos causan grandes pérdidas económicas en diversos cultivos como: cereales, hortalizas, uvas (Sugio et al., 2011)**.**

La contaminación endógena (intra-celular) en *Limonium sinuatum* se debe a la presencia del *Phyto*plasma 6SrI-M (Samuitiene et al., 2007)**,** el cual causa grandes pérdidas económicas en este cultivo. Las enfermedades relacionadas con este patógeno se han registrado en más de 90 familias vegetales alrededor del mundo, análisis basados en las secuencias genéticas del rRNA 16S han clasificado a este patógeno en 18 grupos y 38 sub-grupos (Lee et al., 1998) .

Los *Phyto*plasma pertenecen a la clase *Mollicutes*, philum *Tenericutes*, y son todos patógenos de organismos vegetales, necesitan para su diseminación la intervención de insectos que se alimentan de la savia vegetal denominados vectores (Ammar & Hogenhout, 2006).

Dentro de los estudios de evolución bacteriana se ha determinado que existen dos grupos que evolucionaron rápidamente los denominados AAA (*Asteroplasma, Anearoplasma, Acholeplasma)* y SEM (*Spiroplasma, Entomoplasma, Mycoplasma)* es importante mencionar que los *Phyto*plasma pertenecen al grupo AAA (Sugio et al., 2011).

Las especies pertenecientes al género *Mycoplasma* son patógenos de animales y de seres humanos, por esta razón su investigación está un tanto más avanzada en relación a *Phyto*plasma, muchas especies de *Spiroplasma*y de *Mycoplasma* han sido cultivadas en medios artificiales fuera de sus huéspedes, mientras que no se ha podido cultivar hasta el momento en ningún medio artificial cepas de *Phyto*plasma, es por esta razón que se ha propuesto el nombre de *Candidatus* para este género (Taxonomy ISPWT-P Group Firrao G, 2001).

*Phyto*plasma se aloja en el citoplasma de las células del floema, que son parte del sistema vascular de las plantas, las células del floema son células a-nucleadas que poseen un número limitado de organelos, pequeñas vacuolas y grandes plasmodesmos (Sugio et al., 2011).

*Phyto*plasma posee un ciclo de vida dual único, como se menciono anteriormente son bacterias patógenas que se transmiten a través de un vector que se alimenta directamente del tejido vascular de la planta.

Para el primer paso en la adquisición de la enfermedad se requiere que un insecto se alimente del floema de una planta infectada, de esta manera *Phyto*plasma puede diseminarse e infectar de manera sistemática al insecto. Luego de un periodo de diez días donde *Phyto*plasma infecta la mayor parte del organismo del insecto, este se vuelve competente para transmitir la enfermedad, entonces cuando este insecto se alimente de una planta transmitirá la enfermedad completando así en ciclo (Fletcher et al., 1998).

Dentro de los estudios de fitopatología se ha puesto énfasis en el estudio de bacterias (*Pseudomonas, Ralstonia, Xanthomonas)* que colonizan el exterior de la planta por medio proteínas efectoras que aportan factores de virulencia en el huésped. Sin embargo estas bacterias permanecen fuera de la célula mientras que fitoplasma es capaz de habitar dentro del citoplasma de las células del floema es decir es un patógeno intracelular (Sugio et al., 2011).

Dentro de los efectos adversos que produce la contaminación por *Phyto*plasma están: amarillamiento de hojas, floración precoz, tamaño inferior al promedio, proliferación de tallos (escoba de bruja), tejidos de flores (no verdes) se tornan verdes y conversión de flores en hojas (Bertaccini, 2007).

2.9.1 La comunicación, un factor importante.

La señalización y comunicación cruzada entre los receptores de la célula vegetal y los patógenos foliares es un factor limitante en los mecanismos de defensa de la planta, se ha determinado que la hormona vegetal ABA (ácido abcísico) es un importante componente dentro de defensa de la planta; la hormona ABA se acumula en la planta en condiciones de stress causado por el potencial disponible de agua, promoviendo adaptaciones como cierre de los estomas en condiciones de baja humedad (Beattie, 2011).

2.9.2 El agua y su relación en la contaminación foliar.

Siendo el agua la fuente central de la vida, es lógico pensar que en las plantas el agua cumpla una función en dos vías, es decir, permite al organismo vegetal vivir a través del

transporte del líquido vital a través de sus raíces y conductos vasculares pero de igual manera facilita la colonización de patógenos en tejidos aéreos de la planta (Beattie, 2011).

Uno de los mecanismos por los cuales una planta puede defenderse de la infestación de sus tejidos aéreos es la deshidratación de la zona afectada, la reacción de la bacteria depende de la extensión de la zona desecada (Beattie, 2011), se ha podido comprobar que un rápido decrecimiento en la disponibilidad de agua produce una completa inhibición del crecimiento bacteriano (Kurz et al., 2010) .

De igual manera se evidenciado que un alto contenido de agua entre los espacios inter-celulares o apoplásticos suprime los mecanismos de defensa en la planta como: respuesta hiper-sensitiva, muerte celular programada.

Jambunathan *et al*, (2001) reporta que en altos niveles de humedad *Pseudomonas syringae* puede disminuir la respuesta de muerte celular programada en *Arabidopsis*, de igual manera se encontró valores menores al 75% del mecanismo de respuesta hiper-sensitiva en las hojas.

Sobre la naturaleza en el impacto de la contaminación por medio de agua en el tejido foliar depende de la disponibilidad de agua en los apoplástos, se conoce que los apoplástos poseen una fracción considerable de agua 5% al 50%, pero esto varía drásticamente según el ambiente (Wardlaw, 2005).

Las enfermedades foliares causadas por *Pseudomonas* y *Xantomonas* están asociadas con la saturación de agua, sugiriendo así que la abundancia de agua superficial favorece el crecimiento bacteriano (Beattie, 2011).

La mayoría de bacterias que colonizan las partes aéreas de la planta se localizan en la superficie de las hojas, sin embargo también habitan sobre la superficie foliar bacterias no patógenas que sirven como antagonistas ante los patógenos invasores (Beattie, 2011), entonces como se mencionó anteriormente la disponibilidad de agua en las partes aéreas es un factor fundamental en el desarrollo de comunidades bacterianas en el tejido foliar (Jambunathan et al., 2001).

Monier & Lindow (2005) reportan que ante un descenso en la humedad del ambiente el crecimiento bacteriano en las superficies foliares se redujo en un 40%, 30%, y 15% después de 3, 4, 5 días de baja humedad relativa; en contraste en condiciones de alta humedad el 90% de la población bacteriana prevaleció.

Se ha reportado que en ocho especies vegetales mediterráneas, el contenido foliar de agua está fuertemente relacionado con el crecimiento bacteriano (Yadav et al., 2005).

2.9.3 Biopelículas, una forma de vida.

En la superficie foliar las actividades de las plantas como la fitoexudación modifica de manera sustancial el ambiente, el abastecimiento de nutrientes hace que este hábitat sea mucho más accesible que el medio terrestre (Eberl et al., 2007), las distintas condiciones de cada tejido hace que las bacterias que colonicen los tejidos foliares deban adaptarse a variables como: disponibilidad de agua, temperatura y pH.

El tejido foliar tiende a acumular grandes cantidades de biomasa bacteriana, ya que las partes aéreas de una planta están expuestas constantemente a la variabilidad del clima, hidratación y otras condiciones de stress las poblaciones bacterianas tienden a secretar una biopelícula (Haggag, 2010), que es un agregado extracelular que permite a las bacterias adherirse entre ellas o a una superficie, estas biopelículas pueden proveer cierta protección en condiciones astringentes o ante la presencia de antibióticos (Beattie, 2011).

Las bacterias sintetizan una gran cantidad de polisacáridos, incluyendo polisacáridos intracelulares, polisacáridos estructurales y polisacáridos extracelulares (PEC). Estos polisacáridos (PEC) son el componente principal de las biopelículas estudiadas en *P. aeruginosa, P. fluoresces* (Haggag, 2010).

Hassett et al. (2002) sugiere que *Pseudomonas* posee la habilidad de metabolizar una gran cantidad de nutrientes, combinado con la capacidad de formar biopelículas convierte a estos microorganismos capaces de sobrevivir en los lugares más inhóspitos y en las condiciones más desafiantes (Haggag, 2010).

Capítulo III

3. Metodología.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio Esmeralda Breeding & Biotechnology de la empresa Hilsea Investments Ltd., una compañía dedicada a la producción, comercialización y exportación de flores, ubicada en la finca "La Mora", localidad de San Miguel de Atalpamba, parroquia El Quinche, provincia de Pichincha a 2420 m.s.n.m.

Esta investigación se realizó en dos etapas: la primera fue la etapa de campo que comprendió la selección y recolección del material vegetal, la segunda etapa fue la de laboratorio que comprendió el proceso de: desinfección, irradiación, cultivo de tejidos y toma de datos.

3.1 Materiales y equipos.

- Tijeras desinfectadas con etanol al 70% antes y después de la toma de cada muestra.
- Pinzas, bisturís, cuchillas, soporte de acero inoxidable; esterilizados.
- Esterilizador eléctrico para instrumentos.
- Cámara de flujo laminar BOECO
- Balanza analítica.
- Tarrinas de plástico medianas (1l)
- Frascos de vidrio estériles (500 ml)

3.1.1 Reactivos.

- Etanol 70%
- Hipoclorito de sodio 2% y 1,1%
- Medio básico Murashige & Skoog (MS).
- Medio de regeneración
- Medio de crecimiento
- Plaguicida comercial Vitek: 0,2 ml/l

Tabla 2: Composición de los medios de cultivo utilizados: medio de transporte, medio de regeneración y medio de crecimiento.

Medio de transporte	
Componente	Concentración
AGAR	0.7%
AZUCAR	3%
MS CON VITAMINAS	4.4g/l
Medio de regeneración	
Componente	Concentración
AGAR	0.8%
AZUCAR	3%
MS SIN VITAMINAS	4.3g/l
TIAMINA	0.4ml/l
GLICINA	2ml/l
VITAMINA A	1000ul/l
BAP	0.75ppm
IBA	0.05ppm
AG3	0.1ppm
Medio de crecimiento	
Componente	Concentración
AGAR	0.7%
AZUCAR	3%
MS CON VITAMINAS	4.4g/l
BAP	0.02ppm
ANA	0.04ppm

Realizado por **EB&B 2011.**

3.1.2 Material vegetal.

- Se trabajó con 10 plantas por cada variedad (variedad A y B), ubicadas en macetas plásticas individuales.
- Segmentos cuadriculares de hojas de *Limonium sinensis* (1 cm por lado), se seleccionó las hojas que no presentaron síntomas de mal nutrición, maltrato o enfermedad, para esta selección se utilizó el método observacional directo.
- Se seleccionaron las hojas más cercanas al ápice con un tamaño promedio de (8 cm de largo y 3 cm de largo) siguiendo las recomendaciones de Seelye et al. (1994).

3.1.3 Fuente de irradiación.

- Fuente de tipo “Gamma Cell” Cobalto 60 provista por el “Centro de Investigaciones y Aplicaciones Nucleares (SIAN)” del Ministerio de Energía Renovable del Ecuador ubicado en Aloag provincia de Pichincha.

Procedimiento.

Como primera actividad dentro de la etapa de campo se seleccionaron las plantas madres de *Limonium sinensis* variedad A y variedad B que fueron utilizadas dentro de este trabajo, estas plantas fueron seleccionadas según lo descrito en Seelye et al. (1994).

3.2 Etapa I: fase de campo.

Se eligió 10 plantas de *Limonium sinensis* por variedad, procedentes de un invernadero de producción ubicado en la misma finca, las plantas seleccionadas fueron trasladadas a un área de desinfección y lavado, antes de reubicarlas en el invernadero de plantas donantes.

Esta actividad es necesaria ya que las plantas se encontraban cerca de otras especies que contienen diversos patógenos, y con fin de llevar un control fitosanitario estricto cada planta que ingresó al invernadero de plantas donantes fue desinfectada y revisada por el técnico de turno.

Figura 2: Material vegetal utilizado durante el periodo de selección.

Realizado por **Franklin Villegas Páliz 2011.**

Las temperaturas en el día dentro del invernadero de plantas donantes oscilaron entre los 18°C y 24°C y en la noche de 12°C a 17°C, la humedad se encontraba entre 47 y 57 %, estas condiciones fueron controladas con equipos de ventilación automatizados mediante un controlador lógico programable (PLC).

En el invernadero de plantas donantes se alojan distintas especies ornamentales además de *Limonium;* cada espécimen se encuentra debidamente separado uno del otro y el control fitosanitario dentro del invernadero es monitoreado y revisado por el técnico de turno.

Para este pre-tratamiento de introducción se utilizó el plaguicida comercial Vitek con una concentración de 0,2 ml por litro de agua, para su aplicación se utilizó una fumigadora de mochila, este producto fue aplicado con el fin de eliminar enfermedades y plagas como fusariosis (*Fusarium graminearum)*, ácaros (*Tetranychus urticae)* polillas (*Endrosis saratrella)*, thrips (*Franklinella occidentalis).*

Luego se escindieron las hojas de las plantas de *Limonium sinensis*, las cuales fueron colocadas en una funda plástica; de esta manera se asegura una selección aleatoria de hojas.

Figura 3: Elección de los segmentos foliares de manera aleatoria entre el material vegetal disponible.

Realizado por **Franklin Villegas Páliz 2011.**

3.3 Etapa II: fase de laboratorio.

Se utilizó como unidad observacional frascos de vidrio y como unidad experimental segmentos de hoja de *Limonium sinensis* contenidas dentro de cada frasco.

Para cada tratamiento se utilizaron 15 frascos de vidrio, dentro de cada frasco se sembraron 10 segmentos de hoja, en cada frasco se numeró la posición de cada segmento que fue sembrado (1-10), de esta manera se pudo realizar el análisis individualizado de cada segmento a lo largo de 8 semanas de observación.

3.3.1 Condiciones del experimento: la temperatura, humedad y fotoperiodo fueron ajustadas dentro del cuarto de cultivo y estas fueron controladas mediante un sistema PLC (controlador lógico programable) por lo que fueron constantes durante el experimento.

- Temperatura dentro del cuarto de cultivo: 22°C
- Fotoperiodo: 16 horas luz (24.86 $umol.m^2.s^{-1}$)
- Humedad: 47-57 %

Desinfección: como primer procedimiento dentro de la fase de laboratorio se efectuó la desinfección de las hojas seleccionadas, el protocolo de desinfección se realizó en base a procedimientos previamente establecidos por el laboratorio EB&B, la desinfección de los explantes se elaboró en dos pasos: el primero que fue utilizando etanol al 70% y el segundo agregando hipoclorito de sodio con una concentración de 1.1% (Seelye et al., 1994; Jeong et al., 2001).

3.3.2 Protocolo de desinfección utilizado.

Primero se preparó una solución de 2 l de agua con una concentración de etanol del 70%, luego en condiciones estériles se colocó la solución dentro de cada tarrina que contuvo a los segmentos de hoja, se agitó continuamente por 1 minuto, se escurrió la solución dejando solo los segmentos, posteriormente se agregó agua autoclavada a todos los explantes y se agitó continuamente durante 3 minutos, finalmente se vuelve hacer un último enjuague agitando continuamente por 1 minuto y se escurrió la solución.

Luego se preparó una solución de agua e hipoclorito de sodio (1.1%), la presentación comercial de hipoclorito sodio utilizado fue del (5%), se colocó esta solución en las tarrinas que contenían las hojas y se agitó continuamente por 15 minutos, se escurrió la solución y se realizó un enjuague con agua estéril durante 5 minutos; se repite este proceso de enjuague dos veces más variando el tiempo de agitación por 3 y 1 minutos.

Figura 4: Desinfección de los segmentos foliares de *Limonium sinensis* var A, se muestra el proceso de enjuague con agua estéril.

Realizado por **Franklin Villegas Páliz 2011.**

3.3.3 Protocolo de irradiación y siembra en medios de cultivo

- **Siembra en medio transporte:** una vez realizada la desinfección dentro de la cámara de flujo laminar se sembraron 20 hojas de manera vertical sobre el medio de transporte, este procedimiento se aplicó para cada una de las dosis propuestas (O, 3, 6, 9, 12, 15) Gy.

Una vez sembrados 20 explantes en cada tarrina (una tarrina por cada dosis) estas fueron trasladadas al SIAN donde recibieron las dosis de irradiación previamente propuestas,

también se trasladó la dosis control para mantener la homogeneidad en las condiciones de stress aplicadas a los tejidos.

- **Irradiación del material vegetal:** se procedió a irradiar el material vegetal utilizando la fuente tipo "Gamma Cell" Cobalto 60, las dosis fueron establecidas mediante ensayos preliminares realizados en el laboratorio, estas dosis fueron establecidas en base a líneas de investigación del año 2010, sin embargo los resultados arrojados demostraron que estas dosis no permitían el desarrollo de los tejidos por lo que se decidió cambiar a las siguientes dosis.

Tabla 3: Dosis de irradiaciones utilizadas, para cada variedad y se realizaron tres repeticiones.

Dosis (Gy)	Unidad experimental
0	Tarrina (20 segmentos)
3	Tarrina (20 segmentos)
6	Tarrina (20 segmentos)
9	Tarrina (20 segmentos)
12	Tarrina (20 segmentos)
15	Tarrina (20 segmentos)

Realizado por **Franklin Villegas Páliz 2012.**

El tiempo de irradiación estuvo en función de la vida media del equipo y de la actividad de la fuente de irradiación, según información provista por el CIAN el cálculo de la actividad de la fuente de irradiación se calcula de la siguiente manera:

$A = Ainicial * e^{0.5(\Delta T/vida\ media)}$, una vez obtenida la actividad esta sirve como cociente para la dosis requerida, y la razón obtenida es el tiempo de irradiación.

Tiempo de irradiación=$\frac{dosis}{actividad\ a\ la\ fecha}$

Tabla 4: Tiempos de irradiación utilizados, con una actividad de 8.5623 Ci.

Dosis	Tiempo
3 Gy	0.35 min
6 Gy	0.70 min
9 Gy	1.05 min
12 Gy	1.40 min
15 Gy	1.75 min

Realizado por **Franklin Villegas Páliz 2012.**

Figura 5: Fuente de irradiación Cobalto 60, utilizada en esta investigación.

Realizado por **Franklin Villegas Páliz 2011.**

- **Siembra en medio de regeneración:** luego del proceso de irradiación se procedió a extraer los segmentos cuadriculares de cada explante, de cada frasco se tomó una hoja que luego fue escindida en 10 segmentos cuadriculares, esto segmentos fueron sembrados en el medio regeneración. Este procedimiento se siguió para cada dosis incluida la dosis control, y para cada variedad.

- **Toma de datos:** durante 8 semanas de observación se tomaron los datos correspondientes a las variables a analizar, una vez por cada semana se tomaron los datos para cada dosis y para cada variedad.

3.3.4 Variables a analizar.

- **Respuesta (número de meristemoides)** es el conteo acumulativo de meristemoides (proliferación de agrupaciones celulares que poseen actividad meristemática sobre el tejido foliar (George et al., 1987), el conteo se lo realizó durante las ocho semanas de investigación.

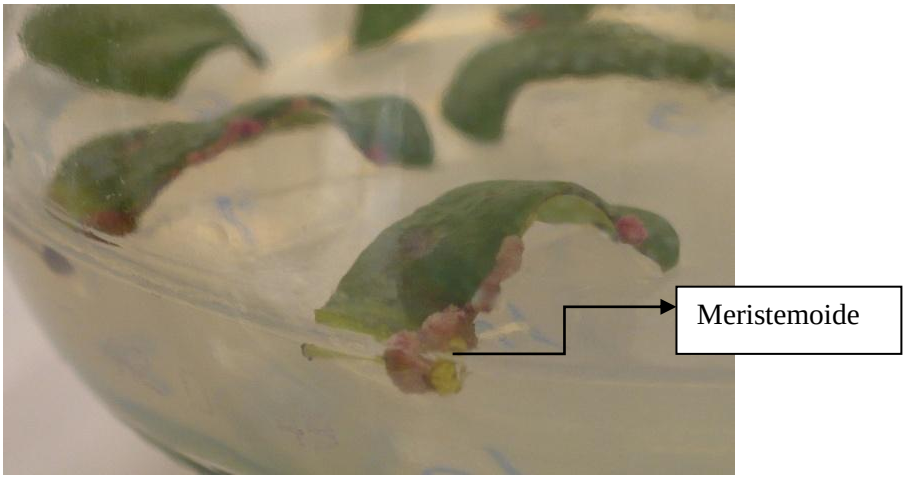

Figura 6: Meristemoides formados al cabo de la cuarta semana de observación,

Realizado por **Franklin Villegas Páliz 2011.**

- **Brotación:** se realizaron conteos individualizados de los brotes adventicios formados en cada segmento durante las 8 semanas de observación, la formación de brotes adventicios se da previa la formación de los meristemoides.

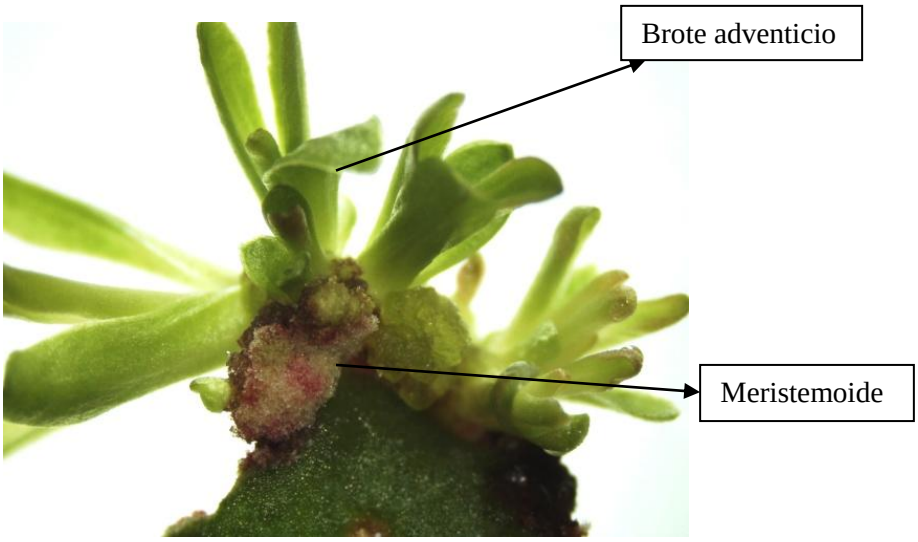

Figura 7: Brotes adventicios producidos durante las sexta semana de observación en la dosis 0 Gy,

Realizado por **Franklin Villegas Páliz 2011.**

- **Contaminación:** se registró el número de segmentos que se contaminaron durante el experimento, el conteo se lo realizó individualizando cada segmento que mostró el crecimiento de un halo bacteriano.

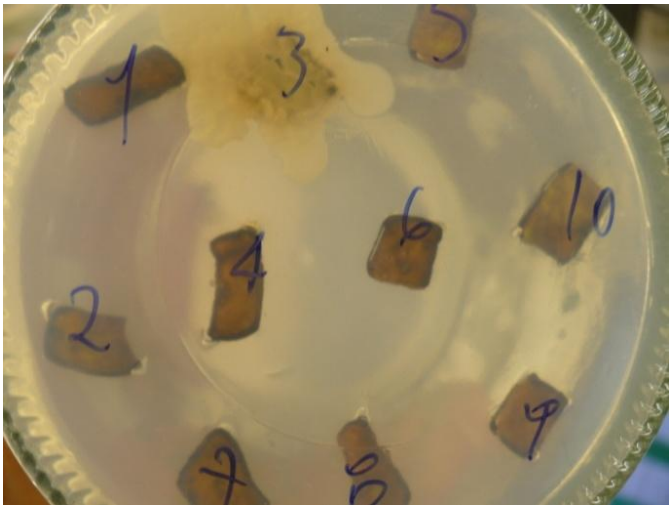

Figura 8: Contaminación bacteriana registrada durante el tiempo de observación,

Realizado por **Franklin Villegas Páliz 2011.**

- **Mortalidad:** se contaron los segmentos que presentaron necrosis durante el tiempo de observación (8 semanas), cada segmento que presentó mortalidad fue contabilizado individualmente.

Figura 9: Segmentos de *Limonium sinensis* var B, de la dosis 0 Gy que no respondieron al proceso de regeneración,

Realizado por **Franklin Villegas Páliz 2011.**

3.3.5 Análisis estadístico.

Para el estudio de los datos obtenidos en las variables propuestas se decidió aplicar la prueba de ANOVA de un factor, ya que los únicos elementos diferentes en el experimento fueron las dosis de irradiación aplicadas; además los datos provenientes de las variables propuestas se obtuvieron a través de conteos acumulativos durante ocho semanas de observación, para el análisis estadístico se utilizó el paquete informático PASW versión 18.

Capítulo IV

4. Resultados.

Los resultados presentados a continuación pertenecen únicamente a la variedad A de *Limonium sinensis* utilizada en esta investigación, ya que la variedad B, aunque pertenece a la misma especie (*Limonium sinensis)* no respondió al proceso de regeneración en la dosis control ni en las dosis de irradiación utilizadas.

Una de las posibles razones para esta notable diferencia es que la variedad A proviene de experimentos de regeneración directa utilizando segmentos foliares, mientras que la variedad B posee un origen morfogenético diferente; entonces podríamos asumir que la variedad A estaba acostumbrada a seguir una ruta morfogenética específica que es la de regeneración directa, cuando se utilicen segmentos foliares como material de partida.

4.1 Variable respuesta.

Tabla 5: Conteo de meristemoides obtenidos durante las ocho semanas de observación.

	Dosis					
Tiempo en semanas	**0 Gy**	**3 Gy**	**6 Gy**	**9 Gy**	**12 Gy**	**15 Gy**
1	9	5	1	0	0	0
2	73	42	9	7	1	0
3	190	178	120	54	4	4
4	307	237	163	61	9	8
5	307	237	163	61	9	8
6	307	237	163	61	9	8
7	307	237	163	61	9	8
8	307	237	163	61	9	8

Realizado por **Franklin Villegas Páliz 2012.**

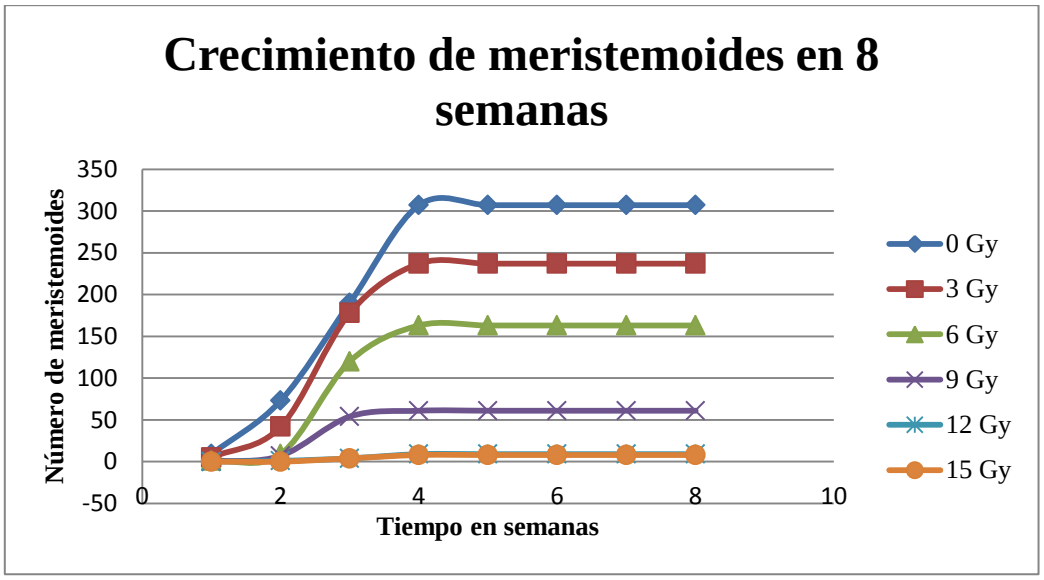

Figura 10: Decrecimiento en la variable respuesta durante la aplicación progresiva de las dosis de irradiación.

Realizado por **Franklin Villegas Páliz 2012.**

Tabla 6: Prueba de ANOVA realizada para el conteo de meristemoides durante las ocho semanas de observación.

	SUMA DE CUADRADOS	GL	MEDIA CUADRÁTICA	F	SIG.
Inter-grupos	202,544	5	40,509	29,847	0
Intra-grupos	259,224	191	1,357		
Total	461,768	196			

Realizado por **Franklin Villegas Páliz 2012.**

Tabla 7: Grupos conformados según la variable respuesta según la prueba de Tukey. Se puede notar el arreglo de subconjuntos de acuerdo a lo presentado en la tabla 4.

	Dosis	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			3	2	1
Tukey B	15	32	,05		
	12	32	,10		
	9	32	,66		
	6	41		1,36	
	3	35			2,24
	0	25			2,91

Realizado por **Franklin Villegas Páliz 2012** en PASW versión 18.

4.2 Variable brotes.

Tabla 8: Desarrollo de los brotes adventicios durante el periodo de observación.

Tiempo en semanas	**0 Gy**	**3 Gy**	**6 Gy**	**9 Gy**	**12 Gy**	**15 Gy**
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	87	15	7	3	0	0
5	238	106	32	20	0	0
6	347	195	88	40	2	1
7	535	307	137	54	10	4
8	540	309	148	96	10	4

Realizado por **Franklin Villegas Páliz 2012.**

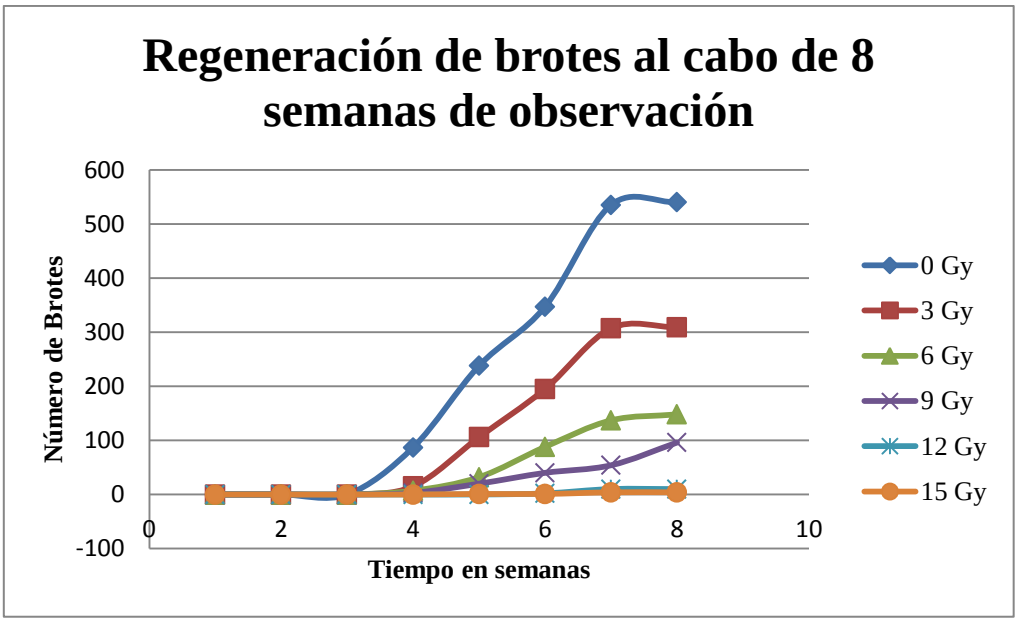

Figura 11: Crecimiento de brotes durante el experimento, al cabo de las ocho semanas de observación se pudo notar diferencias entre los brotes producidos en cada dosis.

Realizado por **Franklin Villegas Páliz 2012.**

Tabla 9: Prueba de ANOVA aplicada a la variable brotación. La alta significancia obtenida en esta prueba, asegura la significancia altamente significativa de esta variable para cada una de las dosis utilizadas.

	SUMA DE CUADRADOS	GL	MEDIA CUADRÁTICA	F	SIG.
Inter-grupos	275,187	5	55,037	40,632	0
Intra-grupos	237,041	175	1,355		
Total	512,228	180			

Realizado por **Franklin Villegas Páliz 2012** en PASW versión 18.

Tabla 10: Grupos conformados para las dosis utilizadas utilizando la prueba de Tukey.

	Dosis	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
			4	3	2	1
Tukey B	15	25	,03			
	12	34	,05			
	9	33	,59			
	6	32		1,23		
	3	32			2,11	
	0	25				3,71

Realizado por **Franklin Villegas Páliz 2012** en PASW versión 18.

4.3 Variable mortalidad.

Tabla 11: Número de segmentos que no respondieron al proceso de regeneración (mortalidad), obtenidos durante el tiempo de observación.

	Dosis					
Tiempo en semanas	**0 Gy**	**3 Gy**	**6 Gy**	**9 Gy**	**12 Gy**	**15 Gy**
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	9	0	0	35
4	0	14	28	7	26	66
5	0	20	46	9	26	79
6	8	20	53	24	33	89
7	8	24	69	36	50	139
8	8	24	69	36	50	139

Realizado por **Franklin Villegas Páliz 2012.**

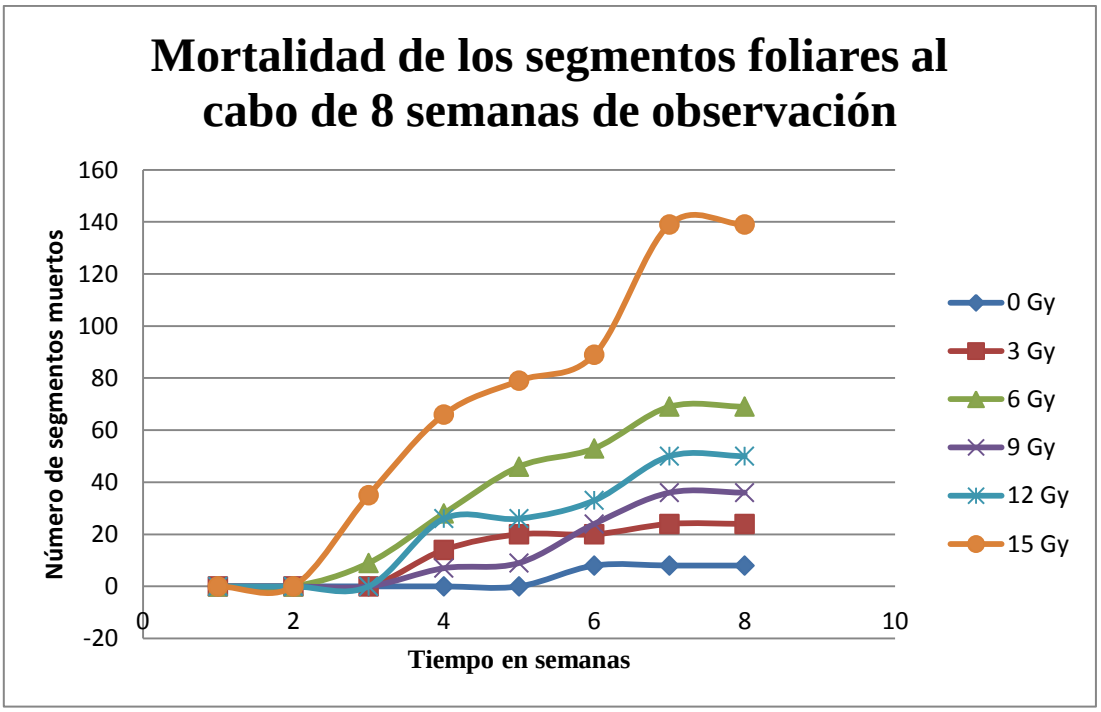

Figura 12: Mortalidad de los segmentos foliares ante las dosis aplicadas. Se puede notar que el aumento de mortalidad va directamente relacionado con el aumento de la dosis.

Realizado **por Franklin Villegas Páliz 2012**.

Tabla 12: Prueba de ANOVA aplicada a la variable mortalidad. La alta significancia obtenida en esta prueba, asegura la diferencia de esta variable para cada una de las dosis utilizadas.

	SUMA DE CUADRADOS	GL	MEDIA CUADRÁTICA	F	SIG.
Inter-grupos	5,038	5	1,008	7,067	0
Intra-grupos	29,225	205	0,143		
Total	34,263	210			

Realizado **por Franklin Villegas Páliz 2012** en PASW versión 18.

Tabla 13: Grupos conformados según la prueba de Tukey. El arreglo de los subcinjuntos conforma la hipótesis planteada para esta investigación.

	Dosis	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
Tukey B	0	31	,1742	
	3	42	,2619	
	6	35	,2714	
	9	33		,5121
	12	38		,5342
	15	32		,5781

Realizado por **Franklin Villegas Páliz 2012** en PASW versión 18.

4.4 Variable contaminación.

Tabla 14: Índices de contaminación obtenidos durante esta investigación.

Dosis	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
0	79	131	1
3	56	109	11
6	21	34	7
9	80	96	9
12	80	86	0
15	106	139	7

Realizada por **Franklin Villegas Páliz 2012.**

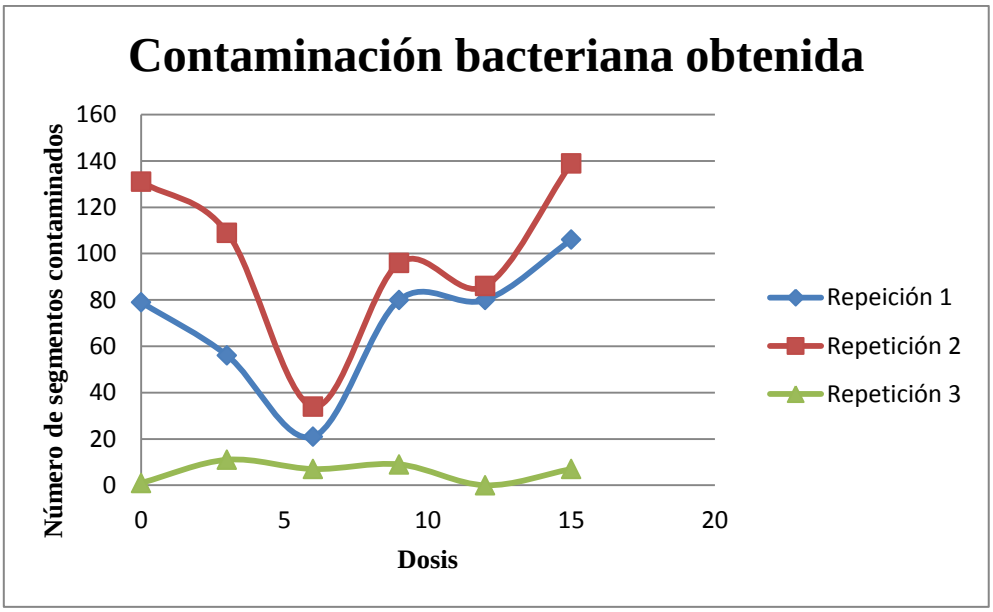

Figura 13: Comportamiento de la contaminación bacteriana durante el proceso de irradiación en las tres repeticiones efectuadas.

Realizado por **Franklin Villegas 2012.**

Tabla 15: Prueba de ANOVA aplicada a la variable contaminación. Se obtuvo una significancia altamente significativa entre las dosis utilizadas.

	SUMA DE CUADRADOS	GL	MEDIA CUADRÁTICA	F	SIG.
Inter-grupos	4,496	5	,899	4,518	,001
Intra-grupos	52,341	263	,199		
Total	56,838	268			

Realizado por **Franklin Villegas Páliz 2012.**

Tabla 16: Los subconjuntos obtenidos mediante la prueba de Tukey en la variable contaminación sugieren que su arreglo no está dictado por las dosis aplicadas, sino por factores exógenos al trabajo *in vitro.*

	Dosis	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
Tukey B	6,00	45	,1444	
	12,00	45	,3689	,3689
	3,00	45		,4022
	9,00	44		,4295
	,00	45		,4711
	15,00	45		,5667

Realizado por **Franklin Villegas Páliz 2012** en PASW versión 18.

Capítulo V

5. Discusión

Durante el análisis de las distintas variables se obtuvo un alto coeficiente de variación (cercano al 24% en todas las variables), esto se debió a que durante las repeticiones realizadas en la variedad A, la contaminación bacteriana de los segmentos y la eliminación de los mismos ocasionó que la población de análisis variara sustentablemente entre cada repetición.

La alta incidencia de contaminación bacteriana fue un factor intrínseco dentro del material vegetal utilizado, esto ocasionó un alta valor en la desviación estándar de los datos recolectados. No obstante las diferencias altamente significativas mostradas en las tablas 6, 9, 12 y 15 indican que los datos obtenidos para las variables respuesta, brotes, mortalidad y contaminación son diferentes en cada dosis, por lo que es aceptable utilizar un análisis paramétrico en este trabajo (comunicación personal Ing. Julio Sánchez).

5.1 Variable respuesta.

Es importante mencionar que la variedad A utilizada en este experimento proviene de experimentos previos de regeneración directa y mutagénesis por lo que se infiere que esta variedad está genéticamente “acostumbrada” a comprometerse en la vía de regeneración directa.

Para esta variable se obtuvieron diferencias altamente significativas (0,000) en la prueba de ANOVA (tabla 6), por lo que se entiende que existen diferencias claramente marcadas en el conteo de meristemoides, entre las dosis utilizadas.

En la (tabla 7) se puede apreciar los subconjuntos conformados por la prueba de Tukey al 0,005%, puede verse que para la variable respuesta se conformaron 3 subconjuntos: el primero compuesto de las dosis de 0 y 3 Gy el segundo conformado por la dosis de 6 Gy y el último compuesto por las dosis de 9, 12 y 15 Gy; estos grupos se conforman de acuerdo al similitud entre el número medio meristemoides obtenidos.

En la dosis de 0 Gy se puede ver la acción del medio de regeneración sobre los explantes utilizados, básicamente la influencia de las distintas hormonas utilizadas permite la regeneración por medio de organogénesis directa.

Como se mencionó anteriormente la regeneración directa depende de algunos factores entre ellos ambientales, concentración de hormonas endógenas, composición del medio y disposición genética del tejido a seguir y comprometerse en una vía regenerativa.

En cuanto a la composición del medio la alta concentración de citoquininas asegura la dominancia apical y diferenciación, mientras que la adición de vitaminas no solo sirven de factores nutricionales para los tejidos si no también ayudan a activar el mecanismo de "*riboswitches",* mecanismos claves en el proceso de regulación de la molécula de mRNA.

El conteo de meristemoides en la dosis de 0 Gy(tabla 5 indica) una excelente proceso de regeneración por parte de los segmentos de hoja utilizados; obteniendo un número de meristemoides al cabo de la cuarta semana de 307, y un número medio de 2,91 meristemoides por segmento(tabla 7), esto muestra un buen rendimiento de la variedad A al medio regenerativo.

Para la dosis de 3 Gy el número medio de meristemoides formados no es significativamente diferente uno del otro, apenas 0.67 meristemoides de diferencia(tabla 7), esto permite inferir que las dosis de 3 Gy es una dosis que permite la reparación efectiva y continua división celular; además siendo el daño celular mínimo basados en el número de medio de meristemoides en comparación al grupo control podríamos sugerir que en esta dosis es poco probable encontrar mutaciones fisiológicamente atractivas desde el punto de vista comercial para la industria florícola; ya que basados en estudios anteriores se ha corroborado que la mayor frecuencia de mutaciones se encuentran entre las dosis más altas (Cardarelli et al., 2002), (Yamaguchi et al., 2008).

El segundo grupo en conformarse es el de 6 Gy (tabla 7), este posee un número medio de meristemoides de 1,36 por segmento; en comparación con el número medio de meristemoides del primer grupo (0 y 3) Gy la diferencia es de 1,55 y 0,88 segmentos respectivamente.

En términos de desarrollo morfológico durante el tiempo de observación los meristemoides observados no mostraron mayor diferencia, solamente era notorio el número con que estos aparecían en cada dosis.

La diferencia entre el grupo control y la dosis 6 Gy es apreciable (tabla 7); es por esto que se puede entender, por qué la dosis 6 Gy forma un conjunto separado. Es importante notar que el crecimiento de meristemoides se detiene en el grupo control a partir de la 4 semana de observación, al igual que en la dosis de 6 Gy; esto pone en evidencia que el daño a nivel celular en la dosis de 6 Gy todavía no obliga un gasto mayor de tiempo en la reparación de células.

Se observa que la dosis de 9 Gy (tabla 7) forma un tercer grupo conjuntamente con las dosis de 12 y 15 Gy, la diferencia del número medio de meristemoides entre la dosis 9 Gy y las dosis anteriores es más notoria, siendo el número medio para la dosis 9 Gy de 0.66 meristemoides por segmento, en comparación con las dosis anteriores la diferencia es de: 0,7-1,58-2,25 números medios de meristemoides para las dosis 6-3-0 respectivamente, esta diferencia en el conteo acumulado de número medio de meristemoides sugeriría que ante esta dosis el daño a nivel celular es más evidente.

Se observa que para la dosis de 9 Gy (tabla 5) en la primera semana de observación el número de meristemoides contabilizados fue de 0, en la segunda semana fue apenas de 7, si comparamos con el grupo control el crecimiento de meristemoides de la primera a la segunda semana fue de 7 a 73 tabla 5, esto nos sugiere que a esta dosis podemos ver un retraso sustancial en el proceso de división celular y diferenciación producto de la terapia de irradiación a 9 Gy.

Analizando el tercer grupo formado(tabla 7), se encuentra que la dosis de 12 Gy posee un número medio de 0,10 meristemoides por segmento, el bajo número medio de meristemoides nos indica que solo un pequeño grupo de células han logrado dividirse correctamente, esto nos daría visos optimistas de que las células que logren dividirse y sobrevivir hasta la fase de aclimatización guarden mutaciones interesantes, además por los resultados presentados por (Cardarelli et al., 2002) las modificaciones florales más atractivas

logradas en *Limonium sinatum*las consiguieron con 10 Gy de irradiación utilizando rayos gamma Cobalto 60.

Es importante notar que en la primera semana de observación (tabla 5) el número de meristemoides contabilizados en la dosis de 12 Gy es 0, en la segunda semana apenas se logró contar un meristemoide, llegando a un número tope de 9 meristemoides.

El tiempo de exposición para la dosis de 12 Gy es de 1,40 minutos (tabla 4), este lapso de tiempo asegura de manera más confiable que todos los tejidos expuestos a la fuente sean estimulados por los rayos gamma, que una mayor cantidad de células sean dañadas y por ende un menor grupo de células puedan sobrevivir.

Es también lógico pensar que la mayoría de segmentos que no respondieron ante la inducción de regeneración directa murieron a causa del proceso de irradiación. No se encontraron diferencias visibles entre los meristemoides desarrollados a partir de la dosis control en comparación con esta dosis.

Siendo la dosis de 15 Gy la más alta utilizada en esta investigación se encuentra que el número medio de meristemoides por segmento es de 0,05; según la bibliografía revisada en (Datta, 2009) las mutaciones más atractivas se logran utilizando las dosis más altas, aunque la supervivencia sea inversamente proporcional al aparecimiento de nuevas variantes.

Corroborando los bajos índices de supervivencia mostrados por el número medio de meristemoides en esta dosis(tabla 7) se esperaría que la frecuencia de mutantes en esta dosis sea alta, sin embargo para aseverar eso es necesaria la evaluación en campo.

Se puede notar que al cabo de 8 semanas de observación para la dosis de 0 Gy se tienen un número de 307 meristemoides mientras que para la dosis de 15 Gy se tiene solamente 8 meristemoides (tabla 5), esto da una idea de lo nocivo que son los rayos gammas para el tejido foliar y la sensibilidad del mismo ante este tipo de daño (Androvic, 2012).

5.2 Variable brotes.

Para esta variable se obtuvo diferencias altamente significativas (0,000) entre las dosis utilizadas al igual que en la variable respuesta (tabla 9), mientras que para la prueba de Tukey al 0,005% (tabla 10), se obtuvo 4 subconjuntos: el primero conformado por la dosis de 0 Gy, el segundo conformado por la dosis de 3 Gy, el tercero con la dosis de 6 Gy, y el cuarto compuesto por las dosis de 9, 12 y 15 Gy, estos subconjuntos se conforman de acuerdo a la similitud en el número medio de brotes obtenidos.

Como se muestra en la tabla (tabla 8), para la dosis de 0 Gy el primer subconjunto que se forma es el de 3,71 (número medio) brotes por segmento, la formación de brotes está directamente relacionada con la generación de meristemoides, ya que estas estructuras están diferenciadas y fisiológicamente "comprometidas" a seguir una ruta morfogenética específica, en este caso la regeneración directa de brotes.

Como se menciona en Mothersill & Seymour (2006) la capacidad regenerativa está relacionada con el pasado y estructura genética de cada organismo, y la concentración de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo.

La generación de brotes adventicios para el grupo control demostró ser una buena técnica de propagación mostrando un excelente rendimiento para el género utilizado, la generación de 3,71 brotes por segmento (tabla 10) de hoja utilizado es sin duda una excelente demostración de la capacidad regenerativa del medio utilizado así como también la buena adaptabilidad de esta variedad al medio de cultivo.

La variable brotes en la dosis de 0 Gy no tiene ninguna similitud estadística con las demás dosis (tabla 10), si bien la marcada diferencia en el número medio de brotes para cada dosis podría llevar a suponer que la inducción de mutaciones con rayos gamma cobalto 60 es una buena técnica mutagénica, basándose en la ya antes mencionada premisa de que "*ante un decremento en la población regenerada la frecuencia de mutaciones es mayor"*.

En la dosis de 3 Gy es obtuvo una media de 2,11 brotes por segmento (tabla 10), mientras que en la variable control tenemos una media de brotación de 3,71; esta diferencia de 1,6 brotes podría deberse a varios factores incluyendo obviamente la terapia de irradiación.

El tiempo de irradiación utilizado para esta dosis fue de 0,35 minutos en este corto lapso de irradiación es difícil comprobar si todos los segmentos fueron estimulados por los rayos gamma.

La diferencia de brotes obtenidos muestran de alguna manera el efecto de los rayos gamma sobre el tejido foliar de *Limonium sinensis* var A, la diferencia de 231 brotes entre la dosis de 0 Gy y la dosis de 3 Gy (tabla 8), no es una prueba concluyente de que se obtengan mutaciones en la dosis de 3 Gy pero nos indica que en esta primera dosis existe un decremento en la regeneración y división de células.

Con esto se puede ver que el comienzo del análisis producto de la terapia de irradiación es en la contabilización de brotes, obviamente el estudio genético, molecular y morfológico nos confirmará la presencia o no de mutaciones, pero lo importante de este análisis es que el inicio y verificación del estudio de la terapia de irradiación es el conteo de brotes más no el conteo de meristemoides; ya que son los brotes las estructuras de las cuales inician el proceso de micropropagación y posteriormente obtener una mayor cantidad de brotes que permitan un estudio en campo sólido, es trascendente añadir que los brotes obtenidos para la dosis de 3 Gy no diferían en términos de altura y vigorosidad en comparación con la dosis de 0 Gy (comentario personal)

En la (tabla 10), se observa que la dosis de 6 Gy es un límite entre las dosis de 0-3 y las dosis de 9-12-15 ya que a partir de la dosis de 6 Gy la brotación en las demás dosis decrece dramáticamente, el gradiente notablemente diferente entre el número de brotes remarca lo propuesto en la hipótesis inicial, "*ante un aumento progresivo de la dosis de irradiación, disminuirá el proceso de regeneración".*

Es importante señalar lo presentado en la (tabla 8) donde se nota la diferencia en el número de brotes obtenidos, al cabo de la octava semana; para la dosis de 0 Gy se tienen 540 brotes mientras que para la dosis de 6 Gy se tienen 148 brotes. Este notable decrecimiento puede mostrar el efecto de la terapia de irradiación en esta variable, ante este recuento en la dosis de 6 Gy se podría pensar que podrían obtenerse mutaciones expresables fenotípicamente, sin embargo por lo presentado en (Cardarelli et al., 2002) esta dosis difícilmente generaría variaciones interesantes para el comercio florícola.

Una característica importante de esta variable, es que los brotes obtenidos en las dosis de irradiación de 6 Gy, poseen diferencias morfológicas, de altura y vigorosidad (figura 9) si se comparan con los brotes obtenidos en la dosis de 0 Gy y las dosis de 3 Gy.

Ahora estas diferencias ya visibles no siempre son señal de una mutación consolidada ya que estas diferencias pueden ser producto de variaciones somaclonales (Datta, 2009).

El número medio de brotes para la dosis de 9 Gy fue de 0,59 (tabla 10) brotes por segmento de hoja, este número es notablemente bajo si se lo compara con los números medios de brotación mostradas en las dosis de 0, 3 y 6 Gy.

La razón para este decremento posiblemente sea que el tiempo de irradiación utilizado (1,05 minutos) permitió que una mayor cantidad de tejidos sean estimulados por los rayos gamma, o que los tejidos expuestos hayan recibido la totalidad de la dosis suministrada.

Es importante recalcar este punto, ya que el equipo de irradiación utilizado fue adquirido en el año 1988 con una actividad de 10000 Ci, a la fecha en que se realizaron los experimentos de irradiación la fuente poseía una actividad de 500 Ci; este descenso en la actividad radioactiva se debe a la estabilización de los niveles de energía de isótopo de cobalto, si se toma cuenta en cuenta que los blancos de irradiación fueron segmentos de hoja confinados a un frasco estéril que hace difícil la comprobación de la irradiación suministrada y que el equipo utilizado si bien se encontraba en funcionamiento; este no aseguraba un irradiación eficiente de los tejidos; entonces se supone que las dosis más altas permitieron que la totalidad de los tejidos expuestos hayan recibido de manera eficiente la dosis suministrada.

Para la dosis de 12 Gy se obtuvo un número medio de 0,05 (tabla 10) brotes por segmento sembrados, claramente para esta dosis el efecto de la terapia de irradiación es notorio, conjuntamente con la baja producción de meristemoides 0,10, se puede inferir que el tiempo utilizado para esta dosis (1,40 minutos) permite que la totalidad de los segmentos expuestos a la irradiación sean golpeados por los rayos gamma, quizás no solo una vez sino varias veces generando así una baja regeneración.

Los brotes obtenidos para esta dosis mostraban diferencias en tamaño y vigorosidad, lo que podría significar el gasto de energía extra que tuvieron que realizar las células primero para

reparar y depurar el daño generado tanto en el citoplasma como en la molécula de ADN y posteriormente continuar con el proceso de regeneración con que estaban comprometidas.

La generación de meristemoides para la dosis de 12 Gy demoró una semana más que en las demás dosis utilizadas, esto indica que se generó un daño celular de mayor nivel y por esta razón las células demoraron más tiempo en regenerarse (tabla 8).

El número de brotes obtenidos para la dosis de 15 Gy fue de 4 brotes (tabla 8), lo que indica el gran daño ocasionado en los segmentos expuestos a esta dosis si los comparamos con la dosis de 3 Gy o con la dosis control. Como se explicó en la dosis de 12 Gy los daños generados en la célula aumentan según la dosis, si la dosis aumenta se logrará que ninguna célula pueda ser reparada y la mayoría opte por la apoptosis celular, expresándose de manera general el fenómeno de necrosis.

5.3 Variable mortalidad.

En la (tabla 13), puede verse la conformación de 2 grupos, el primero conformado por las dosis de 0, 3 y 6 Gy, y el segundo grupo compuesto por las dosis de 9, 12 y 15 Gy. Este arreglo muestra que según el número medio de brotes muertos, las primeras 3 dosis usadas son estadísticamente parecidas, eso sugeriría que en la elaboración de un protocolo de irradiación mediante rayos gamma cobalto 60, en una fuente de irradiación tipo *"Gamma Cell"* las dosis a ensayar partiendo de segmentos de hoja de *Limonium sinensis* serían las dosis de 9, 12 y 15 Gy para posiblemente lograr modificaciones comerciales de interés.

Ya que en la presente investigación no se ha utilizado herramientas moleculares ni se ha realizado una inspección morfológica de los brotes obtenidos en los distintos ensayos, el único instrumento que se posee para determinar la eficacia del proceso de irradiación es la alta tasa de mortalidad; la cual, como se ha mencionado ya muchas veces en este trabajo está inversamente relacionada con la frecuencia de mutaciones.

Para las dosis que conforman el segundo subconjunto. siendo el tiempo de irradiación mayor, el *stress* aplicado en los tejidos se incrementa generando así un mayor daño en el citoplasma, demandando una mayor cantidad de energía para depurar y reparar los daños generados y finalmente ocasionando mayores daños en la molécula de ADN, imposibilitando la replicación de la plantilla en la fase S y arrestando a la célula en la fase

G2; todos estos efectos generan la muerte celular, además de los efectos antes mencionados la competición celular dentro del recipiente en estas tres últimas dosis es mayor imposibilitando que la mayoría de los tejidos puedan desarrollarse igual que el primer grupo (Britt, 1996).

2.5 Variable contaminación.

Con el análisis de esta variable se pudo reconocer que la contaminación bacteriana, no es un factor asociado a las dosis de irradiación, por lo presentado en la (tabla 16) prueba de Tukey al 0,005 puede notarse que los segmentos contaminados se encuentran repartidos entre las dosis utilizadas, sin seguir un patrón u orden; por esto se puede afirmar que la fuente de contaminación bacteriana es de origen ambiental.

Durante las fases que contienen el cultivo *in vitro*: selección del material vegetal, desinfección dentro y fuera de cámara de flujo, cortes y siembra de los segmentos de hoja en los diferentes medios de cultivo, proceso de irradiación; todos estos fueron llevados con extremo cuidado con fin de eliminar las posibles causas de contaminación ambiental o por manipulación.

Sin embargo como se muestra en la (figura 13), la contaminación en las distintas repeticiones se establecía como un fenómeno intrínseco dentro del proceso de regeneración.

Durante el presente trabajo los equipos y material del laboratorio fueron minuciosamente revisados para eliminar cualquier causa de contaminación, es así que los filtro HEPA utilizados en la cámara de flujo para este trabajo fueron monitoreados y sustituidos para asegurar un ambiente estéril. De igual manera el agua utilizada para realizar las soluciones y enjuagues durante la desinfección fue analizada y se aseguró su esterilidad.

Sobre la posibilidad de la contaminación a causa de la manipulación, esta queda descartada ya que el comportamiento de la curva mostrada en la (figura 13), se muestra una conducta ligada a un factor posiblemente ambiental, que para la repetición uno y dos estuvo presente mientras que en la repetición tres no.

Como se menciona en Beattie (2011) los altos niveles de humedad son claves en el aumento de la contaminación foliar, es por esto que posiblemente el alto índice de

contaminación obtenido en esta investigación se deba a valores altos de humedad en el invernadero de plantas donantes.

Aun cuando la sanidad dentro del invernadero de plantas donantes es estricta y el control fitosanitario se lo lleva cuidadosamente es difícil manejar las poblaciones bacterianas ambientales que se mantienen en equilibrio sobre las superficies de las hojas, esto quiere decir que poblaciones bacterianas de *Pseudomonas* o *Xanthomonas* que generalmente no causan efectos dañinos sobre la superficie foliar (Beattie, 2011) se encuentran viviendo en equilibrio de condiciones con la planta y el ambiente.

Cuando se toman secciones de estas hojas, y se las someten a condiciones astringentes; como el proceso de desinfección con alcohol e hipoclorito de sodio; posiblemente se generan biopelículas por parte de estas bacterias ambientales.

Esta es una estrategia defensiva que permite a estos organismos adherirse a las superficies en que viven cuando el ambiente cambia de manera drástica, así una vez que las condiciones son favorables las bacterias inician su ciclo de vida normal; y ya que el segmento foliar en el que vivían se encuentra ya no en un ambiente externo sino en un medio rico en carbohidratos y nutrientes; esto favorece la colonización del medio de cultivo y el aumento de la contaminación bacteriana.

Posiblemente durante las dos primeras repeticiones los niveles de humedad estuvieron cercanos o superiores al 70 %, lo cual favorece el establecimiento de poblaciones bacterianas sobre la superficie foliar, mientras que en la tercera repetición posiblemente existieron condiciones de humedad más bajas que en las anteriores.

Durante este trabajo se decidió analizar los segmentos contaminados por bacterias para saber el tipo de bacteria que atacaba el cultivo; con la ayuda del laboratorio Zurita & Zurita, se logó identificar a un género de bacteria, que fue la más recurrente durante el proceso de regeneración: *Pseudomonas* sp.

Es ampliamente conocido que este género bacteriano puede colonizar una gran cantidad de hábitats y posee una increíble capacidad de adaptación a ambientes astringentes, por esta

razón no es de extrañar que haya sobrevivido al protocolo de desinfección, utilizando una biopelícula, como lo menciona Haggag, 2010.

Es importante mencionar el tema de la contaminación endógena en especies de *Limonium*, como lo menciona Bertaccini (2007), se ha identificado que este género sufre la vulnerabilidad de ser huésped de *Phytoplasma*, sin embargo no hay registros de que el país se hayan realizado análisis para saber si efectivamente las plantaciones de *Limonium* están infectadas con este patógeno intracelular.

Sin embargo entre los síntomas verificables se observan fenómenos como: floración precoz, amarillamiento de hojas, bajo tamaño en relación al promedio apuntando estos síntomas a la infectación con *Phytoplasma*. No obstante en el cultivo de tejidos es poco probable obtener la colonización del medio por parte de *Phytoplasma* ya que una de las principales características que poseen estas bacterias es su reducido genoma y la incapacidad de metabolizar azúcares mediante el ciclo de Krebs (Sugio et al., 2011) imposibilitando su adaptación inmediata a condiciones extracelulares, otra de las características de *Phytoplasma* es que hasta el momento no se ha logrado obtener un cultivo artifiacial en el que pueda vivir esta bacteria, por esta razón se propone el nombre de *Candidatus* para el género de esta bacteria (Sugio et al., 2011).

En una comunicación personal la investigadora Gamma Assante quien a participado en investigaciones concernientes al estudio de *Phytoplasma*, comentó que "*se encuentra segura que la contaminación obtenida en mi cultivo no se trata de* Phytoplasma" por lo que las fuentes de la contaminación obtenida deben ser de orden fitosanitario.

Capítulo VI

6.1 Conclusiones.

- La utilización de segmentos foliares como método de propagación en *Limonium sinensis* var A., resultó ser una buena alternativa, por su rápida adaptabilidad al medio de regeneración y la excelente cantidad de brotes generados.
- La utilización de las dosis propuestas en este trabajo causaron efectos cuantificables mediante las variables utilizadas (respuesta, brotación y mortalidad), por lo que, se podría utilizar esta metodología en especies florales relacionadas con *Limonium sp.*
- Para la variable respuesta se conformaron tres subgrupos durante el conteo de meristemoides; el primero con las dosis de 0 y 3 Gy el segundo con la dosis de 6 Gy y el tercero con las dosis de 9, 12 y 15 Gy, entre las dosis aplicadas no se encontraron diferencias morfológicas entre los meristemoides formados, la única diferencia fue la cantidad con que aparecieron en cada grupo, esta diferencia en la se debió al incremento en las dosis de irradiación que al ser gradualmente mayor generaron mayor daño en organelos citoplasmáticos y posiblemente generaron lesiones en la molécula de ADN que imposibilitaron la correcta replicación del mismo y por la detención del ciclo celular.
- El número medio de meristemoides obtenido en la dosis control fue de 2,91 mientras que en la dosis de 15 Gy el número medio obtenido fue de 0,05; esta notable diferencia corrobora la hipótesis planteada al comienzo de esta investigación.
- En la variable de brotes se obtuvieron cuatro subgrupos, donde el grupo control forma un solo subconjunto con una media de brotes por segmento de 3,71; para la dosis de 3 Gy se obtuvo una media de brotación de 2,11. Estas dosis mostraron el mayor índice de brotación, y no mostraron diferencias morfológicas; para las dosis de 6, 9, 12 y 15 Gy la cantidad de brotes disminuyó notablemente, además los brotes formados en estas dosis mostraron diferencias de altura, vigor y estructura en comparación al grupo control.

- La mortalidad en la inducción de mutaciones está directamente relacionada con la dosis de irradiación, en este trabajo se registró a la dosis de 3 Gy como la dosis de mortalidad mínima (24 segmentos al cabo de la octava semana de observación), mientras que la dosis de 15 Gy fue la dosis más nociva (tabla 11), sin embargo no fue una dosis letal ya que se lograron obtener brotes (tabla 8).
- La dosis de 6 Gy es una dosis "límite" ya que a partir de esta, la mortalidad aumenta de manera proporcional a la dosis utilizada.
- La alta incidencia de contaminación dentro de este trabajo se debe a la persistencia de bacterias ambientales que formaron biopelículas sobre las superficies foliares, al momento de realizar la desinfección, una vez que las condiciones en el cuarto de cultivo se estabilizaron las bacterias foliares pudieron establecerse sobre el medio de cultivo.
- El contenido de agua y su relación con la contaminación foliar es una de las posibles causas de la contaminación foliar obtenida en el cultivo *in vitro*.
- La variedad B no mostró ningún indicio de formación celular o regenerativa ante el estímulo de las hormonas presentes en el medio de regeneración; aun cuando se usaron exactamente las misma condiciones experimentales y operacionales que en la variedad A, esta no respondió ante el proceso regenerativo. La variedad B pertenece a la especie *Limonium sinensis*, sin embargo su "origen genético" es distinto a la variedad A, quizás por esta razón la variedad B no respondió al proceso regenerativo.
- El protocolo de desinfección establecido para esta investigación permitió el proceso de regeneración directa en el grupo control así como también en los segmentos que fueron irradiados con las distintas dosis; si bien la contaminación bacteriana fue un fenómeno recurrente, el aumento de las concentraciones de hipoclorito de sodio y alcohol en el proceso de desinfección disminuyó notablemente la capacidad regenerativa de los segmentos foliares.

6.2 Recomendaciones.

- Para obtener un menor índice de contaminación se recomienda utilizar material vegetal *in vitro*, así la esterilidad del material asegurará un porcentaje de contaminación mínimo.
- Si el material vegetal proviene de un invernadero *in vivo*, se recomienda controlar las condiciones de humedad, de esta manera se reducirá la población de bacterias ambientales en la superficie foliar.
- Después de aplicar dosis de irradiación sobre segmentos foliares se recomienda trasladar los segmentos irradiados a los medios regenerativos, lo más rápido posible, así las células pueden empezar a repararse y el proceso regenerativo será más efectivo.
- Sería interesante registrar los cambios moleculares generados a partir de la irradiación de segmentos de hoja *Limonium sinensis*, con las dosis de 3, 6, 9, 12, 15 Gy.
- Como continuación a esta investigación sería interesante aplicar la técnica de secuenciación de ADN, de las plantas de *Limonium sinenesis* var A que lograron establecerse en el campo y comparar con el grupo control, los cambios genéticos producidos.
- Siendo la regeneración directa a través de segmentos foliares excelente técnica de propagación *in vitro* sería recomendable aplicar la metodología propuesta en este trabajo en otra clase de cultivos de interés comercial.
- En un trabajo de irradiación y regeneración de tejidos vegetales es recomendable utilizar protocolos de desinfección que no sean tan agresivos con el material vegetal, ya que las condiciones de irradiación generan un *stress* considerable en las células vegetales.
- Las características fitosanitarias del material de partida deben ser lo más estrictas posibles, con el fin de evitar un proceso de contaminación *in vitro.*
- Para realizar el método de regeneración directa a través de segmentos foliares es recomendable utilizar cultivares que se hayan originado mediante la técnica antes

mencionada, de esta manera posiblemente el material vegetal esté “predispuesto” a comprometerse a una ruta morfogenética específica.

Glosario.

- 2,4-D: auxina empleada en la preparación de medios de cultivo; ácido 2,4 di-clorofenoxiacético.
- AIA: auxina empleada en la preparación de medios de cultivo; 3-indolil-ácido acético.
- Antera: en las plantas angiospermas, la antera es la parte terminal del estambre de una flor, y forma parte del aparato reproductor masculino de la flor.
- Auxinas: son compuestos derivados del triptófano usados en micropropagación, son añadidos al medio de cultivo para la regulación del crecimiento y elongación celular.
- BAP: citoquinina empleada en la preparación de medios de cultivo; 6-bencilaminopurina
- Brote: estructura unipolar generada por organogénesis directa o por micropropagación.
- Callo: agrupación de células no diferenciadas.
- Citoquinina: hormona vegetal que retrasa la dominancia apical y promueve la aparición de brotes.
- Embrión: huevo o zigoto que proviene de la unión del gameto femenino y masculino de un flor.
- Embriones somáticos: células idénticas a un embrión, pero no provienen de la unión de dos gametos.
- Fenotipo: expresión de características genéticas.
- Fitopatógeno: dícese del organismo que ataca o parasita a una planta.
- Infloresencia: es la disposición de las flores sobre las ramas o la extremidad del tallo; su límite está determinado por una hoja normal.
- Irradiación: aplicación de un elemento radioactivo sobre otro cuerpo.
- Meristemo: centro de división celular.
- Morfogénesis: iniciación, determinación de la forma y función de un determinado grupo de células.
- Mutación: expresión fenotípica de un daño causado a nivel genómico.

- Mutagénico: capacidad que posee un elemento de generar mutaciones.
- Nudo: zonas del tallo desde donde nacen las hojas.
- Organogénesis: ruta morfogenética donde se generan estructuras unipolares (brotes) sin la formación previa de un callo.
- Plántula: primera etapa de formación de un zigoto; consta de raíz y de primordios foliares.
- Protoplásto: célula vegetal que carece de pared celular.
- Rayos gamma: tipo de radiación electromagnética, constituida por fotones, producida generalmente por elementos radiactivos.
- Regeneración directa: actividad celular que se pone en manifiesto luego de efectuar algún estímulo (daño, corte, adición de hormonas) sobre el tejido vegetal.
- TDZ: citoquinina empleada en la preparación de medios de cultivo, tidiazuron.
- Totipotencia: capacidad de las células vegetales de regenerar cualquier órgano desde una célula diferenciada.
- Citoesqueleto: es un entramado tridimensional de proteínas que provee soporte interno en las células, organiza las estructuras internas de la misma e interviene en los fenómenos de transporte, tráfico y división celular.
- Tubulina: denomina tubulina a un heterodímero formado por dos subunidades (α y β) que al ensamblarse de manera altamente organizada genera uno de los principales componentes del citoesqueleto, los microtúbulos.
- Quiescente: es un estado celular donde la célula cumple todas sus funciones metabólicas pero sin dividirse.
- Mitógeno: son factores que estimulan el proceso de división celular.
- Antimitógeno: son moléculas que impiden el avance del ciclo celular.
- Ciclina: son una familia de proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular, las ciclinas forman complejos con enzimas quinasas dependientes de ciclinas (Cdks) activando en estas últimas su función quinasa.
- Quinasa: son un tipo de enzimas que transfieren grupos fosfatos desde ATP a un sustrato específico o diana, el proceso se llama fosforilación.

CAPÍTULO VII

7.1 Anexo de figuras.

Figura 14: Contaminación bacteriana, puede notarse que un solo segmento es el que posee crecimiento bacteriano alrededor.

Obtenida por **Franklin Villegas Páliz 2012.**

Figura 15: Regeneración directa de *Limonium sinensis* variedad A en la dosis de 15 Gy, puede notarse la alta mortalidad en esta dosis.

Obtenida por **Franklin Villegas Páliz 2012.**

Figura 16: Segmentos de *Limonium sinensis* variedad B (0 Gy) que no respondieron al proceso de regeneración.

Obtenida por **Franklin Villegas Páliz 2012.**

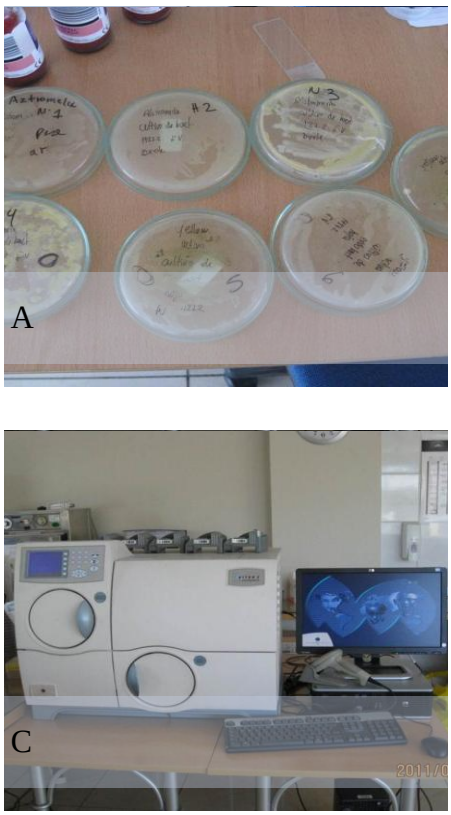

Figura 17: Proceso realizado para la identificación de la contaminación bacteriana en cultivo *in vitro* de *Limonium sinensis*, de izquierda a derecha se muestra el aislamiento y reproducción de la bacteria (A), la caracterización bioquímica (B), identificación por medio del equipo Vitek 2 y finalmente la tipificación del género (C) y un antibiograma como posible método de control (D).

Obtenida por **Franklin Villegas Páliz 2011.**

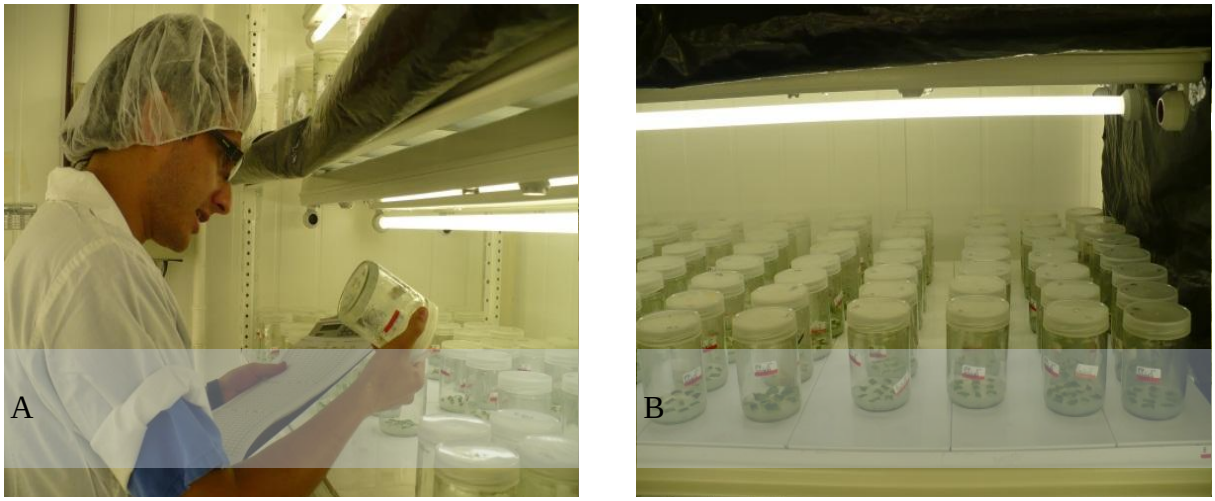

Figura 18: Toma semanal de datos (A) y arreglo al azar de los frascos en el cuarto de cultivo (B)

Obtenida por **Franklin Villegas 2012.**

Figura 19: Variaciones morfológicas de los brotes obtenidos entre la dosis de 6 Gy (derecha) y la dosis de control.

Obtenida por **Franklin Villegas Páliz 2012.**

7.2 Anexo de tablas.

Tabla 17: Tabla que muestra que la relación entre las dosis utilizadas y la variable mortalidad es de tipo altamente significativa y de tipo positiva; corroborando los resultados antes presentados.

Dosis vs Mortalidad			Dosis	Mortalidad
Rho de Spearman	Dosis	Coeficiente de correlación	1	,315**
	Mortalidad	Coeficiente de correlación	,315**	1

Realizado por **Franklin Villegas Páliz 2012** en PASW versión 18.

Tabla 18: Relación que existe entre las dosis utilizadas y la variable respuesta es altamente significativa y negativa, eso quiere decir que el aumento progresivo de las dosis genera un decrecimiento en la formación de meristemoides.

Dosis vs Respuesta			Dosis	Respuesta
Rho de Spearman	Dosis	Coeficiente de correlación	1	-,436**
	Respuesta	Coeficiente de correlación	-,436**	1

Realizado por **Franklin Villegas Páliz 2012** en PASW versión 18.

Tabla 19: Relación que existe entre el aumento de las dosis de irradiación y la formación de brotes.

Dosis vs Brotes			Dosis	Brotes
Rho de Spearman	Dosis	Coeficiente de correlación	1	-,487**
	Brotes	Coeficiente de correlación	-,487**	1

Realizado por **Franklin Villegas Páliz 2012** en PASW versión 18.

Tabla 20: Coeficiente de correlación para la variable contaminación no es mayor a 0,5 por lo que indica que no existe una relación directa entre las dosis de irradiación y la contaminación obtenida dentro del experimento de irradiación.

Correlación entre variables			Dosis	Contaminación
Rho de Spearman	Dosis	Coeficiente de correlación	1	0,051
	Contaminación	Coeficiente de correlación	0,051	1

Realizado por **Franklin Villegas Páliz 2012** en PASW versión 18.

Protocolo de irradiación y regeneración directa utilizando segmentos de hoja de *Limonium sinensis.*

1. Seleccionar el material vegetal de partida, se recomienda utilizar material vegetal de origen *in vitro* para evitar la contaminación bacteriana. Si se va a trabajar con material *in vivo,* asegurar que el material se encuentre libre de plagas y enfermedades; es importante notar las condiciones de humedad al que están expuestas las plantas en el ambiente, ya que altos niveles de humedad favorecen la disposición de bacterias ambientales en la superficie foliar.
2. Tomar hojas de *L. sinensis* que se encuentren cerca al ápice, las hojas deberán tener alrededor de 8 cm de longitud.
3. Una vez seleccionadas las hojas, se colocarán en una funda sellada, y serán transportadas al área de lavado.
4. En recipientes de plástico por separado se colocarán los segmentos de hoja, y se realizarán lavados con agua potable, 5 minutos con agitación contante y enjuague.
5. Para la desinfección dentro de la cámara de flujo se deberá preparar: una solución de alcohol metílico al 70% y una solución al 1,1% de hipoclorito de sodio, la cantidad de las soluciones depende del número de segmentos a utilizar.
6. Dentro de la cámara de flujo laminar se coloca la solución de alcohol metílico dentro de los recipientes que contienen los segmentos hasta que la solución cubra las mismas y se mantiene a las mismas con agitación constante durante 1 minuto.
7. Se descarta a la solución utilizada, y con agua estéril se realizan dos enjuagues, el primero de 3 minutos con agitación y el segundo de 1 minuto con agitación.
8. Luego se coloca la solución de hipoclorito de sodio hasta que cubra las hojas, se mantiene durante agitación constante por 10 minutos.
9. Se desecha la solución, y con agua estéril se realizan tres enjuagues con agitación constante: el primero de 5 minutos, el segundo de 3 minutos y el tercero de 1 minuto.
10. Se trasladan los segmentos desinfectados a otra cámara de flujo.
11. Las hojas desinfectadas se siembran de manera vertical sobre el medio de transporte (tabla 2), de manera que estas puedan ser estimuladas de una manera homogénea por la fuente de irradiación.

12. Una vez que el material vegetal fue irradiado, inmediatamente los segmentos deben ser procesados dentro de una cámara de flujo y sembrados en el medio de regeneración (tabla 2), se deben descartar los bordes de la hoja y con el bisturí deben realizarse cortes, de manera que se obtengan segmentos cuadriculares de alrededor de 1 cm por lado. Es recomendable sembrar 5 segmentos por frasco, y numerar la posición donde estos son sembrados.
13. Una vez procesados los segmentos, estos deben ser colocados en un cuarto de cultivo con las siguientes condiciones: fotoperiodo 24.86 $umol.m^2.s^{-1}$, humedad 47-57%, temperatura de 22°C.
14. Los contenedores que muestren presencia de contaminación fúngica o bacteriana deben ser eliminados.
15. Se debe monitorear una vez por semana las variables: respuesta, brotes, contaminación y mortalidad.

Bibliografía.

- Abu-Qaoud, H., 2004. Direct Regeneration in Cyclamen Persicum Mill. *An-Najah Univ. J. Res. (N. Sc.)*, 18(2), pp.149-54.
- Ammar, E.D. & Hogenhout, S.A., 2006. Insect symbiosis. In K. Bourtzis & T.A. Miller, eds. *Mollicutes associated with arthropods and plants*. Boca Raton: FL:CRC. pp.97-118.
- Androvic, F., 2012. *Gamma Radiation*. I ed. Rijeka: InTech.
- Anónimo, 1977. Plant breeding for resistance to insect pests: considerations about the use induced mutations. Viena, 1977. TECDOC.
- Atwell, B.J., Kriedemann, P.E. & Turnbull, C.G., 1999. *Plants in Action*. Melbourne, Nueva Zelanda, Australia: Macmillan Education Australia Pty Ltd.
- Beattie, G.A., 2011. Water Relations in the Interactions of Foliar Bacterial Pathogens with Plants. *Annual Reviews of Pathology*, 49, pp.533-55.
- Bertaccini, A., 2007. Phytoplasmas: diversity, taxonomy and epidemiology. *Frontier in Bioscience*, 12, pp.673-89.
- Bhojwani, S.S. & Razdan, M.K., 1986. *Plant tissue culture*. Amsterdam, The Neatherlands: Elsevier Science Publishers.
- Borrely, S.I. et al., 1998. Radiation processing of sewage and sudge. *Progress in Nuclear Energy*, 33, pp.3-21.
- Bouma, J., 1967. *A new variety of spring barley "Diamant" in Czechoslovakia*. Berlin: Academie-Verlag.
- Bowler, C., Van Montagu, N. & Inzé, D., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Reviews Plant Molecual Biology*, 43, pp.83-116.
- Brand, U. et al., 2000. Dependence of stem cell fate in Arabidopsis on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science*, 289, pp.617-19.
- Britt, A.B., 1996. DNA damage and repair in plants. *Annual Reviews Plant Molecular Biology*, 100, pp.47-75.
- Broomfield, S., Hryciw, T. & Xiao, W., 2001. DNA postreplication repair and mutagenesis in Saccharomyces cerevisiae. *Mutation Research*, 486, pp.167-84.

- Burchi, G. et al., 2004. New varieties of Limonium obtained by the experimental institute for floriculture. *Proceedings of the XLVIII Italian society of agricultural genetics*, pp.5-8.
- Cardarelli, M.T., Temperini, M.T., Vitti, D. & Saccardo, F., 2002. Mutagenesi Fisica in Limonium sinatum. *Italus Hortus*, 9(5), pp.85-87.
- Cutler, D.F., Botha, T. & Stevneson, D.W., 2007. *Plant Anatomy : An applied approach*. I ed. Oxforf: Blackwell Publishing.
- Datta, S.K., 1998. Performance of mutagen treated Jatropha curcas (Petro crop) on alkali soil. *J. Nuclear Agric. Biol*, 27(3), pp.165-71.
- Datta, S.K., 2009. A Report on 36 Years of Practical Work on Crop Improvement Through Induced Mutagenesis. In Q.Y. Shu, ed. *Induced Plant Mutations in the Genomic Era*. Viena: FAO/IAEA. p.458.
- Datta, S.K., 2009. Induced Plant Mutations in the Genomics Era. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, pp.253-56.
- De la Cruz Torres, E., 2008. The role of mutation breeding on plant improvement in Mexico. In *Induced Mutations in Food and Agriculture*. Ocoyoacac, 2008.
- Dempple, B. & Harrison, L., 1994. Repair of oxidative damage to DNA—enzymology and biology. *Annual Reviews Biochemestry*, 63, pp.915-48.
- Donelly, E.H. et al., 2010. Acute radiation syndrome: assessment and management. *Southern Medical Journal*, 6(103), pp.541-46.
- Eberl, L., von Bodman, S.B. & Fuqua, C., 2007. Biofilms on Plant Surfaces. In S. Kjelleberg & M. Givskov, eds. *The Biofilm Mode of Life : Mechanisms and Adaptions*. Norfolk: Horizon Bioscience. p.217.
- Fletcher, J., Wayadande, A., Melcher, U. & Ye, F., 1998. The phytogenic mollicute insect-vetor interface: a closer look. *Phytopatology*, 88, pp.1351-58.
- Fosburg, S.L. & Nurse, P., 1991. Cell cycle regulation in the yeasts Saccharomyces cerevisiae and Schizosaccharomyces pombe. *Cell Biology*, 7, pp.227-56.
- Gager, C., 1907. Some effects of radioactivity on plants. *Science*, (25), p.264.
- George, E.F., 1993. *Plant propagation by tissue culture*. 2nd ed. Edington, Wilts, England: Exegetics, Ltd.

- George, E.F., Puttock, D.M. & George, H.J., 1987. *Plant culture media: formulations and uses*. Westbury, England: Exegetics.
- George, E.F. & Sherrington, P.D., 1984. *Plant propagation by tissue culture*. Basingstoke, Eversley, England: Exegetics Ltd.
- González, A.J., 1994. Biological effects of low doses of ionizing radiation. *Bulletin International Atomic Energy Agency*, 2, pp.2-11.
- Haggag, W.M., 2010. *The role of Biofilm Expolysaccharides on Biocontrol of Plant Diseases*. I ed. Rijeka: Sciyo.
- Hedayat, M., Abdi, G.H. & Kosh-Kui, M., 2009. Regeneration via Direct Organogenesis from Leaf and Petiole Segments of Tanacetum cinerariifolium (Trevir.) Schultz-BiP. *American-Eurasian Journal Agriculture & Environment Science*, 1(6), pp.81-87.
- Hemerly, A.S., Ferreira, P.C., Van Montagu, M. & Inze, D., 1999. Cell cycle control and plant morphogenesis: Is there an essential link? *BioEssays*, 21, pp.29-37.
- Ichikawa, S., Imai, T. & Nakano, A., 1991. Comparison of somatic mutation frequencies in the stamen hairs of one mutable and to stable clones of Trandescantia treated with small doses of gamma rays. *Japanese journal of Genetics*, 66, pp.513-25.
- Jain, S.M., 2008. Prospects of induced mutations and biotechnology in vegetatively propagated crop improvement. In *Mutation Induction and Breeding of Ornamental and Vegetatively Propagated Plants*. Helsinski, 2008.
- Jambunathan, N., Siani, J.M. & McNellis, T.W., 2001. A humidity sensitive Arabidopsis copine mutants exhibits precocious cell death and increased disease resistance. *Plant Cell*, 13, pp.2225-40.
- Jeong, J.H., Murthy, H.N. & Paek, K.Y., 2001. High frequency adventitious shoot induction and plant regeneration from leaves of statice. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65(2), pp.123-28.
- Jompuk, P., Wongpiyasatid, A., Laamseejan, S. & Chusreeaeom, K., 2008. Mutation induction using acute and chronic gamma irradiation on some vegetatively propagated ornamental crops in Thailand. In *Mutation Induction and Breeding of Ornamental and Vegetatively Propagated Plants*. Bangkok, 2008.

- Konzack, C.F., 1956. Role of induced mutations. In P.B. Vose & S.G. Blixt, eds. *Crop breeding , A contemporary Basis*. Oxford: Oxford Pergamon Press. pp.216-92.

- Kuo, H. & Cheng, J., 2005. Efficient Plant Regeneration through Direct Somatic Embryogenesis from Leaf explants of Phalaenopsis 'Little Steve'. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 41(4), pp.453-56.

- Kurz, M. et al., 2010. Genome-driven investigation of compatible solute biosynthesis pathways of Pseudomona syringae and their contribution to water stress tolerance. *Applied Environmental Microbiology* , 76, pp.5452-62.

- Kyte, L. & Kleyn, J., 1996. *Plants from Test Tubes*. 3rd ed. Portland, Oregon: Timber Press.

- Lack, A.J. & Evans, D.E., 2001. *Instant notes Plant Biology*. II ed. New York: Taylor & Francis e-Library.

- Lawson, E.J. & Poething, R.S., 1995. Shoot development in plants: Time for a change. *Trends Genetics*, 1, pp.263-68.

- Lee, I.M., Gundersen-Rindal, D.E., Davis, R.E. & Bartoszyk, I., 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analysis of 16S-rRNA and ribosomal gene protein sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 48, pp.1154-69.

- Levvitt, J., 1972. *Responses of plants to Environmental Stress*. New York: Academic Press.

- Lindgren, D., 1972. The temperature influence on the spontaneous mutation rate. *Hereditas*, 70, pp.165-78.

- Lintilhac, P.M., 1999. Toward a theory of cellularity: Speculations on the nature of the living cell. *Bio Science*, 49, pp.59-68.

- Mayer, U., Buettner, G. & Jürgens, G., 1993. Apical-basal pattern formation in the Arabidopsis embryo: Studies on the role of the gnom gene. *Development*, 117, pp.149-62.

- Meins, F.J. & Wenzler, H., 1986. Stability of the determined state. "Plasticity in Plants". In D.H. Jennings & A.J. Trewavas, eds. *"Plasticity in Plants"*. Cambridge: The Company of Biologists Ltd. pp.155-70.

- Mercuri, A. et al., 1999. Manipolazione in vitro di Limonium. *lture protette: orticoltura e floricoltura*, 28(1), pp.89-93.

- Micke, A., 1993. Durability of resistance in induced mutants. In T. Jacobs & J.E. Parlevliet, eds. *Durability of disease resistance*. Dordrecht: Kluwer Academic Press. p.336.
- Murashige, T. & Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tabacoo tissue cultures. *Physiology.Plant*, pp.473-97.
- Neill, S.J. & Horgan, R., 1984. *Biosinthesis of abscic acid*. Crozier and Hillman.
- Nurse, P., 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*, 344, pp.503-08.
- Pliego , F. & Barceló Muñoz, A., 2001. *Introducción a la biotecnología Vegetal*. Córdoba, España: CajaSur.
- Rieger, R., Michaelis, A. & Green, M.M., 1991. *Glossary of Genetics*. 5th ed. Berlin: Springer-Verlag.
- Roca, W.M. & Mroginski, L.A., 1991. *Cultivo de tejidos en la agricultura*. Cali, Colombia: CIAT.
- Samuitiene, M. et al., 2007. Phytoplasma strains detected in ornamental plants in Lithuania. *Bulletin of Insectology*, 60(2), pp.137-38.
- Samuitiene, M. et al., 2007. Phytoplasma strains detected in ornamental plants in Lithuania. *Bulletin of Insectology*, pp.137-38.
- Scheres, B. & Benfey, P.N., 1999. Asymmetric cell division in plants. *Annual Revission of Plant Physiology*, 50, pp.505-37.
- Schrodinger, E., 1944. ¿Qué es la vida? Dublin, 1944.
- Schroeder, C.A. & Spector, C., 1957. Effect of giberellic acid and indoleacetic acid on growth of excised fruit tissue. *Science*, pp.701-02.
- Seelye, J.F., Maddocks, D.J., Burge, G.K. & Morgan, E.R., 1994. 1.Shoot regeneration from leaf discs of Limonium perigrinum using thidiazuron. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 22(1), pp.23-29.
- Segura, J., 1993. Morfogénesis in vitro. In Azcon Bieto, J. & Talon, M. *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Madrid: McGRAW-HILL-INTERAMERICANA DE ESPAÑA. pp.381-581.

- Segura, J., 1993. Morfogénesis in vitro. In A. Bieto & M. Talon, eds. *Fisiología y bioquímica vegetal*. Madrid: McGRAW-HILL-INTERAMERICANA DE ESPAÑA. pp.381-92.

- Sheeba, E., Parvathy, S. & Palanivel, S., 2010. Direct Regeneration from leaves and nodes explants of Physalis Minima Linn. *European Journal of Applied Sciences*, (2), pp.58-61.

- Srivastava, L.M., 2001. *Plant Growth and Development*. I ed. San Diego: Elsevier Science.

- Srivastava, L.M., 2001. *Plant Growth and Development*. I ed. Sann Diego: Elsevier Science.

- Stebbind, G.L., 1950. *Variation and Evolution in Plants*. New York: Columbia University Press.

- Sugio, A. et al., 2011. Diverse targets of phytoplasma effectors: from plant development to defense against insects. *Annual Review of Phytopathology*, pp.175-95.

- Sun, T.P., Goodman, H.M. & Ausubel, F.M., 1992. Cloning the Arabidopsis GA1 locus by genomic subtraction. *Plant Cell*, 4, pp.119-28.

- Suzuki, D.T., Griffiths, A.J., Miller, J.H. & Lewontin, R.C., 1989. *An introduction to Genetic Analysis*. 4th ed. New York: W.H. Freeman and Company.

- Taiz, L. & Zeiger, E., 2006. *Plant Physiology*. Fifth Edition ed. Sinauer Associates, Incorporated, 2010.

- Taxonomy ISPWT-P Group Firrao G, 2001. "Candidatus Phytoplasma" a taxon for the wall-less non helical prokaryotes that colonizes plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 54, pp.1243-55.

- Theissen, G. et al., 2000. A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Molecular Biology*, 42, pp.115-49.

- Torres-Ruiz, R.A. & Jürgens, G., 1994. Mutations in the PASS gene uncouple pattern formation and morphogenesis in Arabidopsis development. *Development*, 120, pp.2967-78.

- van Harten, A.M., 1998. *Plant Mutation Breeding*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press.

- Van Harten, A.M., 1998. *Plant mutation breeding*. I ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- Wallace, D.C., 1992. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases ? *Science*, 256, pp.628-32.
- Ward, J.F., 1975. Molecular mechanisms of radiation-induced damage to nucleic acids. In J.T. Lett & H. Adler, eds. *Advances in Radiation Biology*. London: Academic. p.277.
- Wardlaw, I.F., 2005. Consideration of apoplastic water in plant organs: a reminder. *Functional Plant Biology*, 32, pp.561-69.
- Yadav, R., Karamanoli, K. & Vokou, D., 2005. Bacterial colonization of the phyllosphere of Mediterranean perennial species as influenced by leaf structural and chemical features. *Microbiology Ecology*, 50, pp.185-96.
- Yamaguchi, H., Shiumizu, A., Degi, K. & Morishita, T., 2008. Effects of dode and dose rate of gamma ray irradiation on mutation induction and nuclear DNA content in chrysanthemum. *Breeding Science*, pp.331-35.
- Zalewska, M., Miler, N., Drzewiecka, B. & Winiecki, J., 2008. Results of mutation breeding activity on chrysanthemum in Poland. In *Mutation Induction and Breeding of Ornamental and Vegetatively Propagated Plants*. Bydgoszcz, 2008.