

00381

14.5

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA.



EFECTO PROTECTOR DE LA AET (AMINOETIL ISOTIOUREA) Y DE LA L-CISTEINA EN SEMILLAS DE CEBADA, SOMETIDAS A LA IRRADIACION GAMMA DEL 60 CO. EVALUACION DE LOS SIGUIENTES PARAMETROS, UTILIZANDO PLANTULAS DE LA GENERACION M1: PROPORCION DE SEMILLAS GERMINADAS, ALTURA DE LA PLANTULA, ALTURA DEL COLEOPTILO, NUMERO Y TAMAÑO DE LAS CELULAS DE LOS COLEOPTILOS.

GUADALUPE

PALOMINO

HASBACH

T E S I S

PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

MEXICO, 1982.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

	<u>Páginas</u>
RESUMEN	
INTRODUCCION	1
1. Características físicas de la radiación usada como mutágeno	2
2. Efecto químico de las radiaciones ionizantes . . .	4
3. Muerte reproductiva e interfásica	5
4. Daño al ADN	6
5. Influencia del LET y efecto del oxígeno	7
6. Reparación del ADN	8
7. Materiales biológicos y condiciones de tratamiento usados en mutagénesis	10
8. Razón de dosis	10
9. Sensibilidad a la radiación y factores que la mo- difican: Oxígeno y contenido de agua	11
10. Efectos mutagénicos en la generación M1	13
11. Sustancias químicas usadas como radioprotectoras . .	11
Aminotioles	
L-cisteína	
12. Material biológico utilizado	23
13. Objetivos	24

MATERIALES Y METODO	25
1. Material biológico utilizado	25
2. Reactivos empleados	25
3. Contenido de humedad de las semillas	25
4. Tratamiento con los protectores y con la irradiación gamma de 60Co	26
5. Determinación de los números, longitudes y anchos celulares	27
6. Fuentes de irradiación gamma de 60Co.	28
Gammacell 200	
Gammabeam 650	
7. Dosimetría	29
Dosimetría química	30
8. Determinación de la estabilidad de la AET y de la L-cisteína	33
9. Tratamiento estadístico	35
RESULTADOS Y DISCUSION	38
1. Determinación del efecto protector de la AET y la L-cisteína en el crecimiento al término de la plántula	38
2. Determinación del efecto protector del AET y la L-cisteína en los coleóptilos	41
3. Cuantificación del efecto protector del AET y la L-cisteína en el número, anchos y largos celulares	

de los coleóptilos de semillas irradiadas con rayos gamma	46
4. Determinación de las dosis letales 50 (DL_{50}) para las semillas de cebada tratadas con AET y L-cisteína antes de ser irradiadas	50

CONCLUSIONES

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

A B R E V I A T U R A S

- ADN - Acido desoxirribonucléico
- ARN - Acido ribonucléico
- LET - Transferencia linear de energía
- ATP - Adenosin trifosfato
- UV - Rayos ultravioleta
- G₂ - Etapa G₂ del ciclo celular
- RBE - Efectividad biológica relativa
- OER - Proporción de aumento por el oxígeno
- AET - Aminoetil isotiourea
- GED - Guanidín etilo
- DL₅₀ - Dosis letal 50
- DTNB - Acido 5-5' dithiobis -2 nitrobenzoico

RESUMEN

La ampliación de la variabilidad genética por mutaciones inducidas por radiaciones, es común en programas de fitomejoramiento.

Las semillas tratadas con radiaciones, sufren daños fisiológicos que disminuyen la efectividad mutagénica del agente, por lo que se ha introducido el uso de radioprotectores, sustancias químicas que protegen a los organismos tratados, de los efectos secundarios producidos por las radiaciones ionizantes, permitiendo que un mayor número de plantas expresen los cambios genéticos producidos por el agente mutagénico.

En los experimentos que se reseñan, se usó la cebada variedad himalaya como material biológico, en virtud de que existen amplios antecedentes de su uso como vegetal superior en investigaciones de mutagénesis y de radiobiología.

En el presente trabajo se trataron semillas de Hordeum vulgare variedad himalaya con diferentes dosis de rayos gamma de 60 Co. Las semillas fueron pretratadas con agua AET y L-cisteína con el objeto de evaluar sus efectos protectores contra el daño fisiológico. Los tratamientos se diseñaron siguiendo un modelo factorial completamente al azar de 3 x 9 con 3 repeticiones. Las plántulas de la generación M1 fueron evaluadas al término del crecimiento en condiciones de laboratorio con luz, temperatura y humedad controladas, mediante el porcentaje de la germinación, la altura del coleóptilo y la plántula, así como el número, tamaño, longitudes y anchos celulares de los coleóptilos, a fin de cuantificar el efecto de las radiaciones y las sustancias protectoras.

Este trabajo demuestra que el tratamiento administrado ofrece protección a altas dosis de radiación, de 100 a 1400 kr, expresado ligeramente en la altura de la plántula y notablemente en el promedio de la altura de los coleóptilos. Esta protección se expresó también en la longitud y ancho de las células de los coleóptilos. Así mismo la protección se expresó en el porcentaje de supervivencia, cuando las dosis de radiación estuvieron entre 100 y 600 a 1400 kr, en comparación con el control

donde la mortalidad de 100% se obtuvo desde la dosis de 1200 kr.

A fin de tener parámetros de comparación se obtuvieron las DL50 y fueron de 852.79 kr para el lote tratado con agua y de 1125.46 y 1089.55 kr para los lotes tratados con AET y L-cisteína.

Se discuten los posibles mecanismos radioquímicos y bioquímicos o metabólicos en donde actúan los protectores en el material irradiado. Se coincide con otros autores en la opinión de que la elongación celular es un proceso sobre el cual la radiación tiene menos efecto en relación a la división celular, debido a la protección brindada por las sustancias estudiadas. También se vieron favorecidos otros procesos enzimáticos, que elevan significativamente la supervivencia del material tratado con las sustancias protectoras.

INTRODUCCION

La evolución biológica es el proceso de cambio y diversificación de los organismos a través del tiempo. Los cambios evolutivos afectan todas las características de las formas vivas: su morfología, fisiología, comportamiento y ecología.

Estos cambios fundamentalmente son genéticos, cambios en los materiales hereditarios, que transmitidos de generación en generación y manifestados en el fenotipo interaccionan con el medio ambiente, determinando lo que el organismo es.

Esta evolución sólo puede ocurrir si hay variabilidad hereditaria, cuya primera fuente es la mutación.

El modelo de Watson y Crick, planteado para la estructura molecular del ADN ha dado un sustrato formal a la teoría de las mutaciones explicando satisfactoriamente los fenómenos moleculares involucrados así como sus implicaciones biológicas.

La mutación es considerada como un cambio en la estructura química del ADN, por lo tanto es mutación, todo cambio cualitativo y cuantitativo en el material hereditario.

Estas alteraciones pueden llevarse a cabo en 3 niveles.

- 1) Al cambiar el número de los cromosomas: ploidias o aneuploidias.
- 2) Cuando se altera la estructura de los cromosomas como en las translocaciones, inversiones, fusiones, fisiones, etc.
- 3) Al alterar la información de los cromosomas por mutaciones puntuales.

La variabilidad obtenida por mutaciones inducidas, no difiere de la causada por mutaciones espontáneas durante la evolución. Los métodos usados para inducir mutaciones en los programas de fitomejoramiento, incluyen básicamente los mismos mecanismos que ocurren en mutaciones espontáneas.

Los programas de fitomejoramiento incrementan notoriamente la frecuencia de mutaciones (Sigurbjörnsson y Micke, 1974).

En este tipo de programas, las mutaciones pueden obtenerse de muy diversas maneras: (Sigurbjörnsson, 1977).

I.- Buscando la mutación puntual.

- 1) Mutantes usados directamente como variedades mejoradas.
- 2) Haciendo cruzas de mutantes con variedades parentales.
- 3) Cruzando dos variedades que aparentemente llevan el mismo mutante, etc.

II.- Buscando mutaciones cromosómicas.

- 1) Por el uso de translocaciones, transfiriendo caracteres de otras especies o géneros.
- 2) Diploidización de poliploides, etc.

III.- Por el uso de agentes mutagénicos.

- 1) Uso de radiación para producción de haploides y sexualidad transitoria.
- 2) Uso de mutágenos físicos o químicos para aumentar o bajar la frecuencia de quiasmas.
- 3) Para obtener mutaciones inducidas en estudios especiales de genética o procesos fisiológicos, morfológicos o bioquímicos en plantas de importancia agronómica.

De hecho se ha considerado que el fitomejoramiento inducido por el uso de radiaciones, constituye una rama muy importante de la radiobiología (Sigurbjörnsson y Micke, 1974). Tablas 1 y 2.

1.- Características físicas de la Radiación usada como Mutágeno

Los principales tipos de radiación usadas como agentes mutagénicos en los programas de fitomejoramiento, son las radiaciones ionizantes como rayos X y gamma, que son radiaciones electromagnéticas que contienen gran cantidad de energía, lo que les confiere una propiedad de ionización y excitación sobre átomos y moléculas. Las longitudes de los rayos X es entre 3×10^{-9} m a 3×10^{-12} m, las de los rayos gammas son de 3×10^{-12} m, y poseen más energía por fotón que los rayos X.

TABLA 1. LISTA DE VARIETADES PRODUCIDAS POR MUTACIONES INDUCIDAS
POR DIVERSAS CLASES DE MUTAGENOS FISICOS

Nueva variedad	Rayos Gamma del 60 Co	Características mejoradas de la variedad	Fuente de inofrmación
<u>Trigo Panadero</u>			
Sonora Sharbati	Semillas. 20 Kr	<ul style="list-style-type: none"> - Color ambar del grano - Tallo corto - Maduración temprana - Alta calidad de pro- terfina y lisina 	Swaminathan 1967
Sinvalocho Gam- ma.	Semillas. 20 Kr	<ul style="list-style-type: none"> - Más resistencia a la ro ya negra del tallo y de la hoja 	Favret y Ryan 1962
Novosibirskaia	Semillas 20 Kr	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento en la resisten- cia y calidad de la leva- dura. 	Cherny et al., 1970
		<ul style="list-style-type: none"> - Incremento caract. agro nómicas - Resistencia a enfermeda des. - Mayor contenido protef- nico 	Parodi et al., 1970

TABLA 1. LISTA DE VARIEDADES PRODUCIDAS POR MUTACIONES INDUCIDAS
POR DIVERSAS CLASES DE MUTAGENOS FISICOS

Nueva variedad	Rayos Gamma del 60 Co	Características mejoradas de la variedad	Fuente de información
<u>Arroz</u>			
Iratom 38		- Variedad tempranera por 3 a 4 semanas y 2% más en proteína que la variedad madre.	Shamsul 1970
PARC-2	40 Krad	- Granos más largos con me nos áreas de blanquesines - Alta calidad comestible	Santos et al., 1970
Pelita I/1		- Madurez temprana - Producción varias estacio ciones del año. - Mayor resistencia de la ho ja a enfermedades	Ismachin y Mickaelsen 1976
Nihanbare	20-30 Krad	- Aumento de proteína por Unidad de área	Tanaka 1976

TABLA 1. LISTA DE VARIEDADES PRODUCIDAS POR MUTACIONES INDUCIDAS
 POR DIVERSAS CLASES DE MUTAGENOS FISICOS

Nueva variedad	Rayos Gamma del 60 Co	Características mejoradas de la variedad	Fuente de información
<u>Avena</u>			
Iratom 38		- 2% de incremento en pro- teína con relación a la variedad progenitora.	Shamsul 1970
Parc I	40 KR	- Granos más grandes y del- gados con menos áreas - blancas.	Santos et al., 1970
<u>Cebada</u>			
Gamma No. 4		- Variedad de tallo corto	Yamaguchi 1969

TABLA 2 Variedades obtenidas por medio de mutaciones inducidas

PERIODO DE OBTENCION	NUMERO DE VARIEDADES OBTENIDAS	
	Plantas de Cosecha	Plantas Ornamentales
Antes de 1951	3	-
1952 - 1956	4	-
1957 - 1961	11	
1962 - 1966	18	15
1967 - 1971	51	25
1972 - 1973	11	7
T O T A L	98	47

Tomada de Sigurbjörnsson y Micke 1974

Otro tipo de radiaciones son las corpusculares, compuestas de partículas subatómicas como electrones, rayos α y neutrones. La energía de electrones y protones se puede incrementar con el uso de máquinas aceleradoras, pudiendo incluso acelerarse elementos que han perdido uno o más electrones orbitales. Tanto las radiaciones electromagnéticas como las corpusculares producen ionización y excitaciones en el material en que inciden presentándose diferencias en los mecanismos de interacción.

En la interacción de los rayos X y gamma con la materia, pueden ocurrir tres procesos: el efecto fotoeléctrico, el efecto Compton y la producción de pares del tipo electrón-positrón. El efecto fotoeléctrico se presenta cuando la radiación electromagnética incidente, cede toda su energía a un átomo y éste al expulsar a un electrón queda ionizado, mientras que el electrón expulsado provoca a su vez, ionizaciones secundarias que pueden ser más trascendentes que la ionización primaria.

El efecto Compton puede considerarse como el choque elástico del fotón incidente con los electrones orbitales, una fracción de la energía del fotón se utiliza en expulsar un electrón, la otra se dispersa con una energía menor, es decir con una longitud de onda mayor y propagándose en una nueva dirección.

La producción del par iónico electrón-positrón, donde la interacción se realiza con el núcleo atómico, el proceso es complejo y consiste en la conversión de la radiación incidente en un electrón y un positrón, produciéndose de esta forma la conversión de energía en materia. Las radiaciones corpusculares difieren unas de otras en tamaño y carga, pero el mecanismo por el que pierden energía al interactuar con la materia es el mismo. La excepción a estos mecanismos lo constituyen los neutrones, que al no poseer carga, sacan a los protones de los núcleos atómicos, los que disipan su energía por diversos procesos. Las partículas cargadas interactúan en forma inelástica con los electrones de los átomos que atraviesan a los cuales expulsan, produciendo iones. A su vez los electrones expulsados pueden producir más ionizaciones. Puede también ocurrir el fenómeno de excitación electrónica cuando la energía sumi

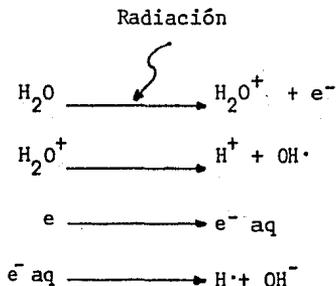
nistrada al átomo por la partícula cargada no es suficiente para producir la ionización y el electrón sólo se desplaza a un nivel de mayor energía, quedando un átomo excitado.

La densidad de ionización es expresada en valores de LET (transferencia lineal de energía), que es la energía disipada por unidad de longitud a través del trayecto de las partículas ionizadas.

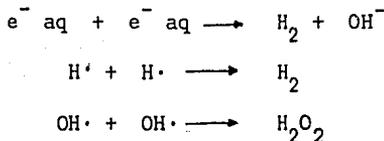
Los rayos X y gamma son ejemplos de radiaciones de bajo LET, donde las ionizaciones son muy esparcidas a lo largo del camino de la onda. Contrariamente a lo sucedido con las partículas ionizadas como los rayos α , protones o neutrones donde las ionizaciones ocurren mucho más densamente a lo largo del camino de ionización. (Reyes y Flores, 1972).

2. Efecto Químico de las Radiaciones Ionizantes

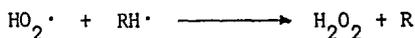
Las radicales OH hidroxilo son agentes fuertemente oxidantes que se producen con la radiólisis del agua. El electrón libre puede polarizar un número grande de moléculas de agua, por lo que se le llama electrón hidratado. (Ahnström, 1977).



La recombinación entre radicales libres resulta en la producción de :



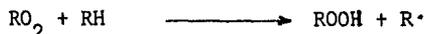
Para los radicales libres hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) que se producen en sistemas biológicos, las bases púricas y pirimídicas constituyen uno de sus blancos más importantes (Schmidt y Borg, 1976). A los radicales OH se adjudican los daños producidos por las radiaciones y también la peroxidación de los lípidos que se encuentran en las estructuras membranosas (Tappel, 1972), Vladimirov y Archakov, 1972). Cuando la radiólisis se efectúa en presencia del oxígeno, se forman radicales peróxido ($\text{HO}_2\cdot$) que pueden reaccionar con las moléculas de ácidos grasos



con O_2 en el medio se forma un nuevo radical



que puede reaccionar con otra molécula de ácidos grasos



Los radicales obtenidos pueden reaccionar entre sí y con iones metálicos de valencia variable formando productos moleculares activos.

3. Muerte reproductiva e interfásica

La acción letal de las radiaciones ionizantes se mide normalmente en pérdida de actividad mitótica. La evidencia indirecta de estos resultados, son las aberraciones cromosómicas encontradas en varios sistemas. Así Grote y Rewell (1972), encuentran en cultivo de células irradiadas de hamster, una absoluta correlación entre la aparición de fragmentos y la pérdida en la habilidad de las células para formar colonias, las que después morían. Sin embargo, en células de líneas tumorales, se observó resistencia y tolerancia a la pérdida de material cromosómico sin morir. Aunque parece evidente que la pérdida de una cantidad considerable de material genético conduce a la muerte celular, ésto no sucedía en células que no se estaban dividiendo; significando lo anterior que la muerte interfásica requiere una dosis mayor que la muerte durante la etapa de re-

producción.

La muerte interfásica en células irradiadas es acompañada por la salida de varios componentes al medio, de tal manera que puede registrarse liberación de histonas, enzimas nucleares, disminución de síntesis en ATP, alteración de la permeabilidad de la membrana, desorganización nuclear, etc. en células irradiadas (Sutherland et al., 1967; Ahnström, 1977).

4. Daño al ADN

La irradiación de ADN ya sea en solución o en estado sólido, produce un gran número de cambios químicos, como liberación de fosfatos y de bases. Las bases son modificadas por deaminación, por rompimiento de la estructura cíclica y por formación de peróxidos. En la desoxirribosa se lleva a cabo la oxidación del grupo alcohol y también son comunes los rompimientos de los enlaces de carbón. Por ejemplo, un ataque a una desoxirribosa, permite un rompimiento de una cadena y pueden también encontrarse rompimientos en ambas bandas.

Como ya se dijo, hay una serie de cambios químicos en la irradiación de ADN y es difícil dilucidar cuál de ellos es más importante en el material biológico, además de que el espectro original de cambios químicos, es alterado por las enzimas reparadoras.

También es interesante analizar que cierto número de cambios químicos en la región central del ADN permitirán su rompimiento. En el caso del rompimiento de una banda, la integridad de la cadena se mantendrá; si hay dos rompimientos en bandas opuestas, puede resultar en un rompimiento de doble banda, entonces la molécula se partirá en dos piezas.

Fragmentos de las moléculas de ADN pueden seleccionarse de acuerdo a su tamaño por ultracentrifugación. Un método muy sensible para encontrar el rompimiento de las bandas del ADN es el estudio de sedimentación.

Para evaluar los rompimientos de una banda en el ADN, tiene que

separarse la doble espiral, lo que se obtiene por sedimentación en condiciones alcalinas.

Así fue posible medir los rompimientos sencillos y dobles en la cadena de ADN provocados por los rayos X, así como también verificar que los rompimientos de doble banda eran letales a un fago integrado en él (Freifelder, 1965). Sin embargo, los rompimientos de una sola banda y que se producían diez veces más frecuentemente que los primeros, eran aparentemente inofensivos. McGrath y Williams (1966), probaron en bacterias irradiadas que la extracción de ADN se llevaba a cabo en un gradiente de sacarosa alcalina, así que la inducción de rompimientos podía estudiarse en un rango de dosis donde la bacteria sobrevivía y así demostraron que la bacteria era capaz de reparar rompimientos de una banda; Dean et al., (1966), demostraron que los rompimientos de doble banda también son reparables y propusieron que una diferencia de radiosensibilidad podría deberse a la capacidad del organismo para reparar rompimientos de doble banda.

Hay indicaciones de que los rompimientos de doble banda representan el daño más importante inducido por la radiación del ADN, y probablemente el responsable de las lesiones que traen como consecuencia un efecto letal en bacterias y organismos superiores, provocado por radiaciones. (Ahnström, 1977).

Lo anterior se apoya en el hecho de que las células irradiadas en etapa G2, producen aberraciones cromosómicas detectables en las mitosis subsecuentes, mientras que tratadas con sustancias químicas radiomiméticas o rayos UV, únicamente se provocan aberraciones cromatídicas. Si suponemos que los cromosomas de estas células en etapa G2 contienen una espiral de ADN superenrollada, las aberraciones cromosómicas indicarían daño en la doble banda, en tanto que las cromatídicas indicarían rompimiento de una sola banda.

5. Influencia del LET y efecto del Oxígeno

La presencia del oxígeno aumenta el efecto letal y mutagénico

de la radiación ionizante. Esto se explica por el hecho de que el oxígeno reacciona con la radiación, produciendo radicales los cuales incrementan la producción de productos y modifican el aspecto de cambios químicos. Un componente del efecto del oxígeno es probablemente solo químico aunque parece que también interactúa por la vía físico-química.

Con la ayuda de la resonancia del espín electrónico, se puede demostrar la aparición al azar de los electrones no apareados en las moléculas. El ADN irradiado a bajas temperaturas, da un espectro que indica la posición aleatoria de los radicales libres. Cuando el ADN se calienta, el espectro cambia y se transforma en un estado similar al obtenido al irradiar solamente timinas, lo que hace suponer que procesos similares podrían llevarse a cabo en sistemas biológicos; es decir, que los radicales presentes originalmente en el ADN, por ejemplo en la región central de la espiral y con posibilidad de provocar un rompimiento de la banda, pueden ser transferidos al residuo tímínico o aún a los componentes proteínicos de los cromosomas. En ambos casos el daño será inofensivo. Si el oxígeno está presente puede reaccionar con el radical primario y fijar el daño en una posición más vulnerable (Ahnström, 1977).

Cuando se comparan los efectos de los rayos gamma, por ejemplo con neutrones rápidos, se encuentra que la dosis de rayos gamma tiene que ser mayor que la de los neutrones para inducir un determinado efecto biológico. La efectividad biológica relativa (RBE) de los neutrones es mayor.

Varios investigadores han demostrado que el RBE es función del LET, aunque los valores máximos de RBE varían, dependiendo del efecto y del organismo estudiado (Okada, 1970).

6. Reparación del ADN

Es sabido que el daño primario inducido por la radiación ionizante es modificado por procesos de reparación enzimática y sólo una pequeña fracción del daño es detectada como un cambio biológico (Lea, 1955).

Es posible que las bacterias que han recibido una dosis letal

de luz UV, se recuperen si antes de la resiembra se iluminan con luz visible. Se encontró que el principal evento letal producido por la radiación UV, fue la formación de dímeros de timina en el ADN. Estos fueron monome-
rizados in situ y una enzima fue responsable del efecto de reparación. La enzima requirió para llevar a cabo su función de una fuente de energía que fue la luz visible. Este efecto se conoce como reparación por foto-
reactivación. Pronto se reconoció que la bacteria podía llevar a cabo la reparación en ausencia de luz (Howard-Flanders y Boyce, 1966) no, solo por la reparación por fotorreactivación.

La reparación en la oscuridad no alteró los dímeros sino, que fueron sustituidos por nuevo material. En este proceso se involucraron varias enzimas, primero una endonucleasa que hace un corte adyacente al dímero de la banda que contiene el defecto. Una exonucleasa digiere la parte externa de la banda defectuosa y nuevos nucleótidos son colocados por una polimerasa en el asa así formada en la cadena, como paso final la nueva pieza sintetizada es reunida a la banda de ADN por un ligasa, lo que es conocido como reparación por escisión.

En estudios de reparación del ADN después de radiación ionizante han sido observadas reparaciones de rompimientos de una o de dos bandas.

En células de bacterias y de animales, esta reparación es eficiente y es un proceso muy rápido. Es interesante hacer notar que una fracción del rompimiento permanece no reparado. Esta fracción no reparada es significativamente mayor después de que la irradiación se ha llevado a cabo con neutrones rápidos, si se comparan con el efecto de los rayos gamma (Ahnström y Edvardsson, 1974). Aparentemente lo anterior se debe a que después de la irradiación con neutrones rápidos se produce un incremento en la densidad de ionización más alta, originando un daño localizado más amplio y por lo mismo, más difícil de reparar.

Existe también una clara diferencia entre el tipo de reparación por escisión después de la irradiación con UV, a la que se realiza después de la radiación ionizante. Cuando un dímero de pirimidina es susti-

tuído por material nuevo, varios cientos de nucleótidos pueden ser insertados por cada dímero sacado. Después de la radiación con rayos gamma sólo son insertados algunos pocos nucleótidos por lesión. Esto indica que se involucran enzimas de reparación diferentes, dependiendo del tipo de daño que se ha realizado.

7. Materiales biológicos y Condiciones de Tratamiento usados en Mutagénesis.

Aunque todas las partes de las plantas pueden ser irradiadas: semillas, polen, plantas completas o cortes, tubérculos, bulbos, estolones, tejidos u órganos en cultivos artificiales, etc., las semillas son el material más favorecido para irradiar en programas de mutagénesis para fitomejoramiento. Nilan et al. (1961), han puntualizado las ventajas de usar semillas de cebada lo que puede aplicarse a otras especies. Las semillas además de ser fáciles de manipular, se pueden desecar, remojar, calentar, congelar, mantener por grandes períodos al vacío, en atmósfera de oxígeno, nitrógeno, etc. Cuando están secas son casi inertes biológicamente y las severas condiciones ambientales, no causan daño biológico significativo. Ello constituye una característica muy favorable, ya que en algunos programas de fitomejoramiento son necesarias condiciones muy rígidas para controlar los factores que modifican el daño inducido por radiaciones. (Konzak et al., 1972 y Gaul et al., 1972).

8. Razón de Dosis

La razón de dosis implica el tiempo en el cual se da una dosis de radiación y tiene un efecto cualitativa y cuantitativamente significativo en los resultados obtenidos.

La frecuencia de los cambios genéticos causados por un impacto sencillo de radiación se comporta en relación lineal. Muchas aberraciones cromosómicas requieren dos o más eventos si son causados por rayos X o gamma. Su frecuencia presenta una respuesta curvilínea en relación al incremento de la dosis. Muchos autores han probado el efecto de la razón

de dosis en diferentes materiales biológicos (Sparrow et al., 1961; Nishiyama et al., 1966).

La respuesta a la razón de dosis es usada como un criterio para distinguir eventos de impacto sencillo o múltiple (Smith y Rossi, 1966), a diferentes razones de dosis en un rango de 10.3 a 1738 rad/min, aplicado a semillas heterózigas de diversas especies. El análisis estadístico de los resultados no mostró relación entre la razón de dosis dentro de este rango y la producción de secciones amarillo-verdosas en plántulas de maíz. Esto apoya la interpretación que esas secciones coloridas son producidas por eventos de impactos sencillos.

9. Sensibilidad a la radiación y factores que la modifican

La respuesta de las células a los mutágenos físicos en las plantas superiores es influenciada, en grado variable, por numerosos factores biológicos, químicos, físicos y ambientales. Estos factores modifican la efectividad medida en mutaciones por unidad de dosis y la eficiencia considerada como la frecuencia de mutación o de daño u otros efectos como aberraciones cromosómicas producidas por el mutágeno.

Los mecanismos por los cuales estos factores influyen en la frecuencia de mutaciones y aberraciones cromosómicas no son conocidas aún, pero se puede afirmar que estos factores pueden ser controlados para obtener óptimos resultados en los tratamientos mutagénicos.

Algunos de los factores más importantes que se deben de controlar durante la irradiación de las semillas son el oxígeno y el contenido de agua.

Oxígeno.- Es uno de los factores que modifican en mayor medida el daño genético y fisiológico inducido por los rayos X y gamma en las se millas irradiadas.

Los mecanismos por los cuales el oxígeno aumenta el efecto fisiológico y genético, involucran la interacción de los radicales libres inducidos por la radiación y el oxígeno, para producir alta reactividad y

productos radioquímicos que provocan daños fisiológicos en las semillas irradiadas.

El aumento del daño provocado por la radiación gamma en presencia de oxígeno es mayor en semillas muy secas con un porcentaje de humedad $\leq 3\%$. Para semillas con este porcentaje de humedad la proporción de aumento producido por el oxígeno OER en la reducción del crecimiento de las plántulas, fue de 1.3 en cebolla y 16.7 en arroz (Conger et al., 1972).

En general una gran eficiencia mutagénica es decir menor daño a la plántula y mayor frecuencia de mutaciones puede ser obtenida, si el efecto del oxígeno se minimiza.

Datos experimentales en cebada, muestran que los mejores resultados de la irradiación, se dan cuando ésta va acompañada por atmósfera de anoxia de nitrógeno o de vacío parcial o ajustando el contenido de agua entre 12 y 14%.

Contenido de agua.- Es probablemente el factor secundario más importante. Bajo condiciones atmosféricas normales, las semillas con contenido de agua menor al 14% son más sensibles a la radiación X o gamma a medida que el contenido de agua disminuye. En semillas de cebada el OER para producir daño en la plántula aumenta de 1 a 9 conforme el contenido de agua en la semilla disminuye de 13 a 2%. En cebada se han obtenido valores máximos de OER de 10 para la inducción de mutaciones puntuales y de 15 para aberraciones cromosómicas (Conger et al., 1966; Nilan et al., 1965). Para efectos sobre la altura de la plántula en cebada, se han obtenido valores máximos de OER de 10 para contenidos de humedad de 2% (Nilan et al., 1964).

También se ha demostrado en semillas de cebada, que pequeños incrementos en contenido de agua de 10.7 a 11.0%, reducen la respuesta al tratamiento de oxígeno posterior a la irradiación cerca de 3 veces (Conger et al., 1968).

Se ha mostrado en semillas de cebada y de otro tipo de semillas como Trifolium, Brassica, Festuca, Medicago, etc., que puede equilibrarse

no sólo el contenido de agua en diferentes rangos sino también la radiosensibilidad, cuando se ha equilibrado la humedad relativa (Osborne et al., 1963, Osborne y Lunden, 1965).

El contenido de agua en embriones de cebada es ligeramente menor que el de las semillas completas, cuando han sido equilibradas para un contenido de agua determinado por desecación o almacenaje a diferentes humedades relativas (Conger y Carabia, 1972).

No se ha encontrado aumento del daño por oxígeno cuando las semillas de cebada se irradian con neutrones monoenergéticos de 14 MeV (Harle, 1965, Conger y Constantin, 1974), es decir, al tratar semillas de cebada con neutrones rápidos, el control del oxígeno y del contenido de agua no son trascendentales.

10. Efectos Mutagénicos

En la Generación M1.- Los mutágenos físicos o químicos tienen tres tipos de efecto importantes :

- 1) Daño fisiológico (daño primario).
- 2) Factor de mutaciones (mutación puntual o génica).
- 3) Mutación cromosómica (aberraciones cromosómicas).

En los programas de mutagénesis el término M1 implica la generación tratada, es decir las plantas obtenidas de las semillas que se irradiaron.

El factor de mutación puede transferirse de la generación M1 a las siguientes y no puede ser registrado en la generación tratada, excepto en casos especiales cuando han sido mutados los gametos haploides. Las mutaciones cromosómicas también son medidas en la generación M1.

Los daños fisiológicos son de naturaleza muy variable y representan daños que pueden ser determinados citológicamente y medidos en un órgano, o pueden consistir de una reacción del organismo completo, como el retardo en la expresión de ciertos caracteres o la muerte en casos crí

ticos.

El daño fisiológico probablemente tiene origen cromosómico y extracromosómico. Sin embargo, cuando un determinado tratamiento a los cromosomas provoca una alta mortalidad y una baja frecuencia de mutaciones, mientras que otro da como resultado una baja letalidad y un alto rango de mutaciones, puede, eventualmente, deducirse que el segundo tratamiento causa relativamente menos daño extracromosómico que el primero. La razón puede deberse a diferentes tipos de mutaciones cromosómicas que son inducidas por alguno de los dos mutágenos (Gaul, 1963 y 1977).

Pero para propósitos de fitomejoramiento, son deseables los tratamientos que provocan bajos efectos fisiológicos y fuertes efectos genéticos. La evaluación de los daños fisiológicos se concreta a la generación M1 y éstos no alteran al genoma y no se expresan, por lo tanto, en generaciones subsecuentes.

Para un tratamiento mutagénico dado, hay una correlación, en los cereales, entre la altura de la plántula y la supervivencia en la M1 por un lado y con la frecuencia de mutaciones por el otro (Gaul, 1959), así que una determinación cuantitativa de los efectos en la generación M1 deberá ser un procedimiento de rutina en los experimentos de mutagénesis.

El daño en la generación M1, puede medirse cuantitativamente por varios parámetros (Gaul, 1977, Padova y Ashri, 1977 y Palomino et al., 1979). En el laboratorio tomando en cuenta la altura al término de la plántula, del coleóptilo, de la raíz, la supervivencia como número de semillas germinadas, el número, largo y ancho de las células del coleóptilo, etc. En el campo, a través de variables agronómicas como son número de espigas o de semillas por planta, longitud y peso de la espiga principal, etc.

En la Figura 1, se muestra para la cebada el comportamiento patrón de la altura media de la plántula, longitud de la raíz y la supervivencia en relación al incremento de la dosis de radiación. Se observa un comportamiento sigmoidal característico para cualquier tipo de planta y según el tipo de radiación (Gaul, 1977).

ALTURA DE LA PLANTULA
ALTURA DE LA RAIZ
SUPERVIVENCIA

E F E C T O F I S I O L O G I C O

D O S I S D E R A D I A C I O N

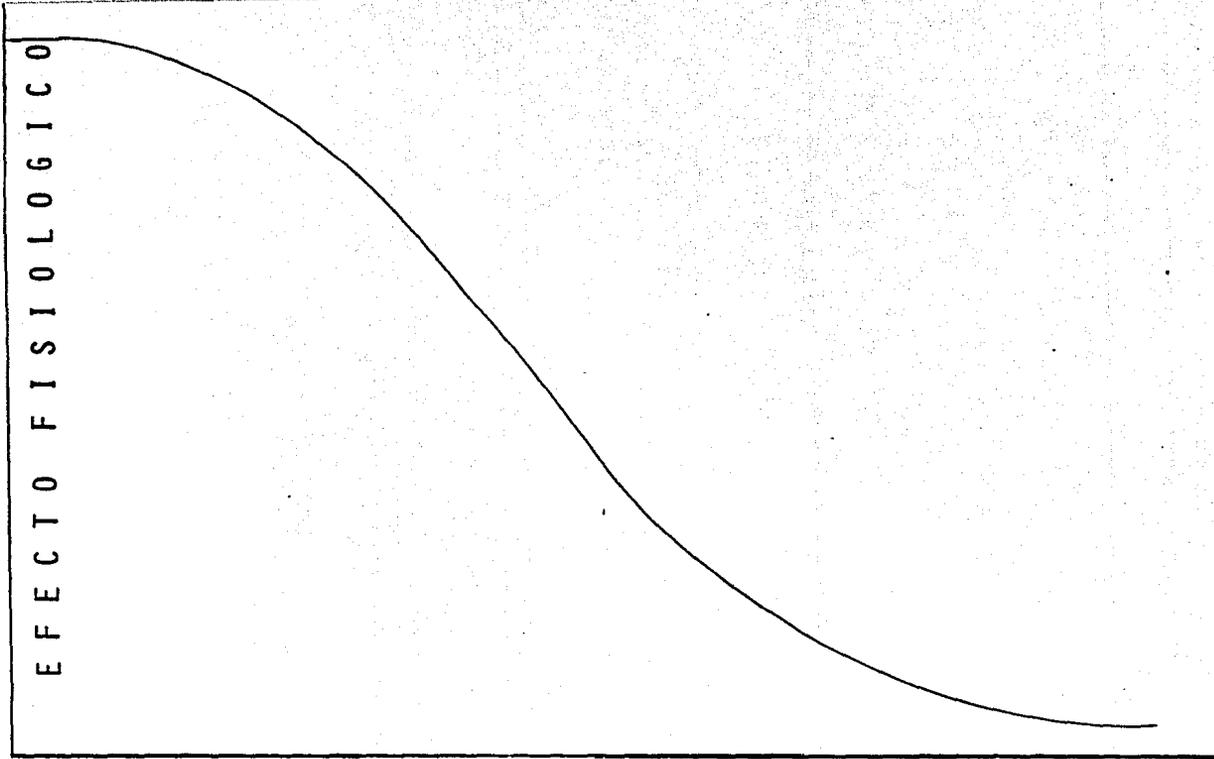


FIGURA 1

TOMADA DE GAUL, 1977.

CURVA PATRON QUE ILUSTRA EL DAÑO FISIOLÓGICO DE LA
ALTURA DE LA PLANTULA DE LA RAIZ Y EN LA SUPERVI-
VENCIA EN SEMILLAS DE CEBADA IRRADIADA

El análisis de la longitud del coleóptilo y la plántula ha permitido conocer variables de mucha utilidad en el estudio de la mutagénesis, en virtud de que en estas estructuras puede analizarse rápidamente la respuesta a la toxicidad del mutágeno. Estudios de esta naturaleza se han llevado a cabo en la cebada por Konzak y Favret, (1972) y en el arroz por Rahman y Soriano, (1972), etc.

La germinación como medida de supervivencia, es un parámetro muy utilizado para medir la acción de los mutágenos en plantas superiores (Veleminsky et al., 1973; Prasad y Godward, 1975).

Los efectos letales del mutágeno sobre las semillas conducen a su muerte, es decir a la no germinación. Se analizan mediante el cálculo de las curvas de dosis respuesta y su comportamiento sigmoideal puede ajustarse usando transformaciones matemáticas, calculándose de ese modo las DL_{50} , DL_{75} o DL_{95} , dosis letales que corresponden a dosis que matan el 50, 75 ó 95% de la población de semillas original (Finney, 1964).

Otros parámetros, de suma utilidad en la cuantificación del daño fisiológico provocado por las radiaciones, son: el número, largo y ancho de las células de los coleóptilos (Cercek et al., 1967).

El coleóptilo es un órgano que envuelve y protege a la primera hoja de las gramíneas durante su estado inicial de desarrollo. Esta estructura en condiciones controladas de laboratorio, (en obscuridad y a una temperatura de 21°C), consigue su mayor crecimiento a las 192 hrs, alcanzando una altura de 60 a 65 mm.

En 1972, Liptay y Davidson, encontraron que existe una relación entre la longitud del coleóptilo y el número de sus células.

Esto ha sido apoyado por los valores altos de correlación encontrados por Palomino et al., (1979), al relacionar la longitud del coleóptilo con el número de células ($r=0.98$) y con la longitud celular ($r=0.97$), así como al obtener un valor de $r=0.92$ al correlacionar el número y la longitud de las células de los coleóptilos. Esto significa que los coleóptilos largos tienen más células y células más grandes que los cortos. El crecimiento de esta estructura se lleva a cabo mediante fases de divi-

sión y elongación celulares, teniendo esta última gran influencia en el aumento de su longitud (Muir, 1974), sin embargo, ambos procesos ocurren bajo la acción de hormonas de una manera secuencial (Wright, 1961). Este mismo crecimiento se lleva a cabo sin la intervención del proceso de división celular, en los coleóptilos de semillas de cebada y trigo irradiadas a altas dosis de radiación gamma (Rose y Adamson, 1969, Liptay y Davidson, 1972), lo cual muestra el efecto estimulante que sobre la elongación celular tienen el ácido indolacético (Haber, 1962) y el ácido giberélico (Haber y Luippold, 1960, Rose y Adamson, 1969).

El coleóptilo que emerge, presenta inicialmente una disminución del crecimiento conforme aumenta la dosis, pero para un determinado valor de dosis ocurre una reversión en dicha disminución del crecimiento, fenómeno relacionado con la elongación celular en virtud de que se presenta un abatimiento en la cantidad de divisiones celulares (Schwartz y Bay, 1956, Bacq y Moutschen, 1956, Moutschen, 1959). La ausencia de divisiones en el desarrollo de los coleóptilos de semillas irradiadas con altas dosis, ha sido comprobado posteriormente (Haber, 1962, Rose y Adamson, 1969, Liptay y Davidson, 1972 y Palomino et al., 1979).

Cercek et al., (1967), al analizar el efecto de los neutrones de 14 MeV y de los rayos gamma, encuentran que es menor el crecimiento de la primera hoja que sobre el del coleóptilo. Las diferencias observadas en las curvas de dosis respuesta, parecen ser debidas al alargamiento celular y a que el blanco sensible a las radiaciones es un sistema precursor que se encuentra en la semilla, el cual es responsable de los mecanismos de división celular.

Bacq y Moutschen (1956), Moutschen (1959) y Palomino et al., (1979), encuentran una recuperación en el crecimiento de los coleóptilos de cebada, de semillas irradiadas con dosis altas de bajo LET.

La estimulación del efecto de las radiaciones en la elongación celular, ocurre sin división celular ni síntesis de ADN, sin embargo, continúa la síntesis de ARN y de proteínas (Haber et al., 1961; Wright, 1961 y Haber, 1962) y de este modo se produce la recuperación del crecimiento.

De acuerdo a Moutschen (1959), el aumento en la longitud del coleóptilo y la elongación celular a altas dosis podría realizarse utilizando la energía ahorrada, al no llevarse a cabo la división celular.

En los coleóptilos la elongación celular fue menos sensible a radiaciones de bajo LET que los procesos de división celular (Haber et al., 1961, Cercek et al., 1971, Liptay y Davidson, 1971, 1972). La resistencia a la radiación podría deberse a que al aplicarse altas dosis se favorece la producción de auxinas relacionadas con la elongación celular. Sin embargo, Skoog (1935), encontró una reducción en la producción de enzimas al aplicar radiación del rango comprendido entre 50 y 5000 roentgens. Estos hallazgos están de acuerdo a lo encontrado por Gordon (1955), usando dosis entre 25 y 40 kr.

Contrariamente a lo anterior, Rajagopal (1968) y Muir et al., (1974), observaron un aumento de la síntesis de la auxina utilizando altas dosis de radiaciones de bajo LET. Cercek et al., (1971) consideran a los neutrones más efectivos que la radiación gamma para afectar al sistema precursor de la síntesis de auxinas. Ledoux y Huart (1962), encontraron que el proceso de síntesis es menos sensible a la radiación que el mecanismo de transporte o translocación y Muir et al., (1974) observaron que la radiación alteraba la respuesta de las secciones de los coleóptilos a la acción del ácido indolacético.

Las dosis mayores de 680 kr provocan la reducción en la longitud de los coleóptilos de avena, lo que podría deberse a la inactivación de algunas auxinas precursoras, (Muir et al., 1974), o bien a la alteración de posibles sitios de síntesis de la auxina, como son los dictiosomas (Gawlik y Shen-Miller, 1974).

11. Sustancias Químicas usadas como Radioprotectores

Una de las principales limitantes en el uso amplio de la mutagenesis experimental, es la toxicidad que generalmente se presenta después de los tratamientos con cualquier tipo de agente mutagénico. Esta repercute en forma negativa sobre el rendimiento obtenido por el mutágeno. La

toxicidad se cuantifica a través de los daños fisiológicos producidos en el material tratado : disminución en la longitud del coleóptilo y la plántula, el número y tamaño de las células de los coleóptilos, en la fertilidad de las semillas o en la proporción de mutaciones obtenidas en generaciones posteriores a la M1 (Biswas y Matsuo 1966, Ashri y Levy 1974).

Otros aspectos interesantes son los mecanismos de interacción entre los protectores y los radicales libres producidos por la radiación ya sea en su acción directa con moléculas que han sido blanco de las radiaciones como lípidos (Tappel 1972), las bases púricas y pirimidicas (Schmidt y Borg 1976) o con enzimas (Gorelik et al., 1977), o mediante su efecto indirecto que produce radicales libres peróxidos, como resultado de interaccionar con las moléculas de agua intracelular, que atacan a otras biomoléculas, provocando daños irreversibles (Lehninger 1975).

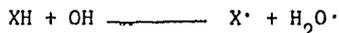
Los radicales libres son fuertemente oxidantes. Existen una serie de compuestos químicos que tienen una función antioxidante como son los que contienen en sus moléculas un grupo sulfhidrilo, de demostrada acción reductora (Bacq y Alexander 1961).

Los procesos moleculares de la radioprotección se han podido explicar por medio de la radiólisis de pulso y así se ha comprobado la reparación del daño por radicales libres por transferencia de hidrógeno a partir de compuestos con radicales SH.

El radical RS· producido por las soluciones de compuestos SH irradiadas, da lugar al radical absorbente RSSR⁻



En sistemas que contienen RSH y un sustrato XH irradiado, el radical X· se forma debido a las reacciones de radicales OH



La reparación subsecuente de X· se produce por la transferencia de H a partir de RSH



Se han cuantificado procesos de reparación de este tipo en radicales orgánicos simples (Mitchell, 1968), de tal suerte que los protectores cuyas moléculas poseen un grupo sulfhidrilo (SH) pueden prevenir el daño provocado por las radiaciones, a través de mecanismos radioquímicos :

- 1) Actuando como acarreadores de radicales.
- 2) Por reparación instantánea, implicando la transferencia de un átomo de hidrógeno a una molécula dañada por radiación.
- 3) Por intercambio de grupos disulfuro.

Algo que debe tomarse en cuenta es el significado de la acción directa o indirecta de las radiaciones en las células.

En la acción directa, además de la interacción de la radiación con las moléculas de agua—con la subsecuente producción de radicales $\text{OH}\cdot$ y $\text{H}_2\text{O}\cdot$ y la donación de H por la molécula protectora— se ha planteado como un mecanismo de protección química muy eficiente la formación de disulfuros con las moléculas blanco como las histonas, las proteínas, las enzimas de reparación, etc. (Eldjarn y Phil 1958). La partícula golpeada saca un electrón a lo largo de la cadena, dejando el enlace disulfuro solo con un electrón; este enlace se rompe después de la reconstitución del blanco SH. Figura 2.

También se produce la protección al presentarse la formación de disulfuros S-S contra la acción indirecta de la radiación iónica. La radiación induce radicales que pueden atacar uno u otro de los 2 átomos de azufre, en el caso mostrado en la Figura 3; la interacción es producida por la reconstitución del grupo SH blanco. Esto sucede en bacterias expuestas a altas concentraciones de capturadores de radicales, parece que la acción indirecta en este caso puede llegar a ser del 50% aproximadamente (Sanner y Phil 1969).

También existen los mecanismos bioquímicos y fisiológicos por medio de los cuales las sustancias protectoras actúan a nivel de las mitocondrias o del retículo endoplásmico cambiando sus propiedades de membrana. También actúan en el metabolismo de la glucosa y en la síntesis de ácidos nucleicos o de proteínas, e inhiben o retardan la división celular. Se cree que los efectos bioquímicos pueden explicarse en gran parte

FIGURA 2.- MECANISMO DE PROTECCION QUIMICA — LLEVADO A CABO POR LAS SUSTANCIAS PROTECTORAS CON GRUPO SH — A TRAVES DE LA FORMACION DE UN DISULFURO S-S.

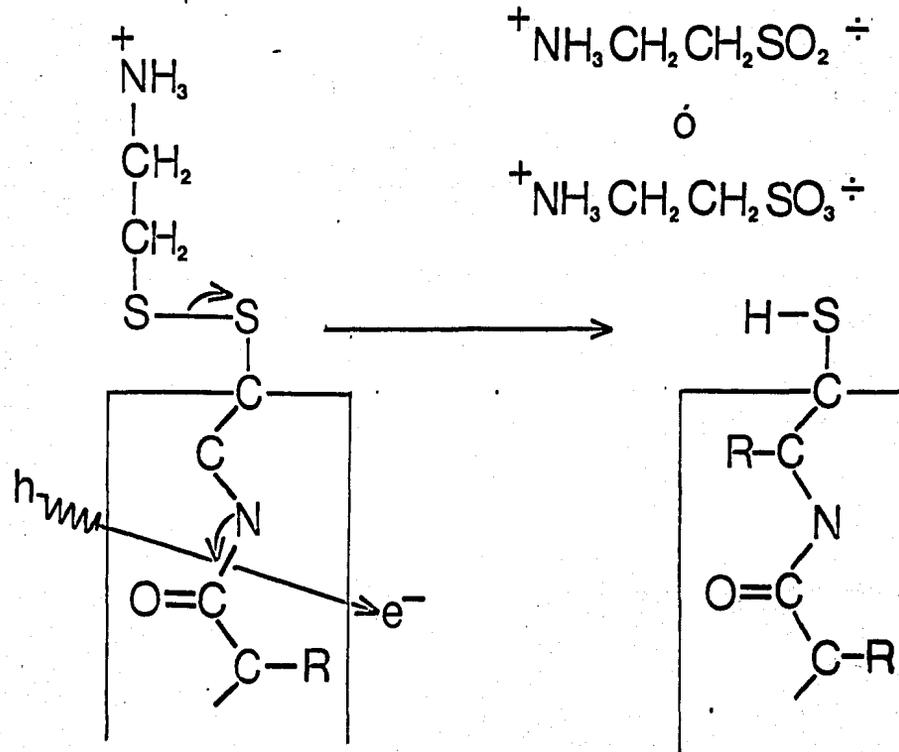
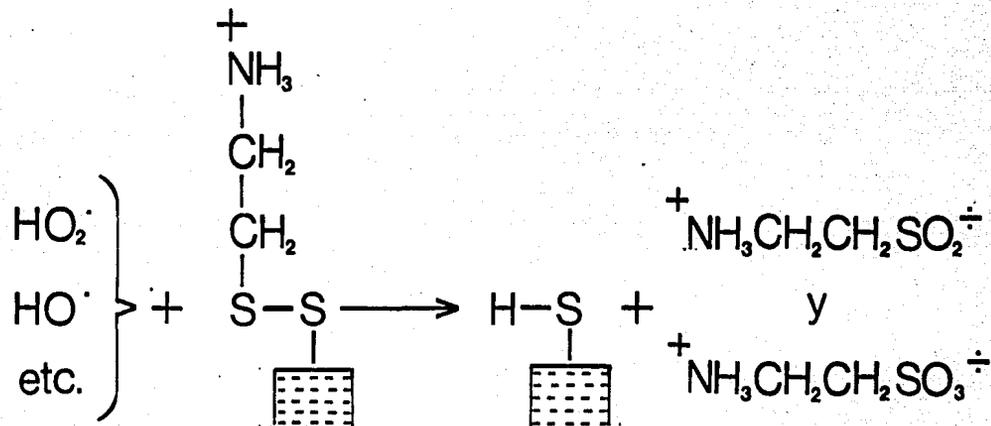


FIGURA 3.- ACCION PROTECTORA DE LOS AMINOTIOLES, AL FORMAR DISULFUROS — S-S — , QUE ABSORBERAN EL EXCESO DE ENERGIA DE LOS RADICALES LIBRES PRODUCIDOS POR LA RADIACION AL INCIDIR EN EL AGUA.



por interacción de los agentes protectores con los grupos SH de las enzimas o membranas intracelulares.

Aminotioles. Es un grupo de sustancias químicas que han probado ser eficientes protectores en diversos sistemas biológicos. Tienen en su estructura química un grupo SH libre unido covalentemente a través del cual el agente lleva a cabo los mecanismos radioquímicos (Bacq y Alexander 1961) y un grupo amina fuertemente básico, separados por no más de 3 átomos de carbono.

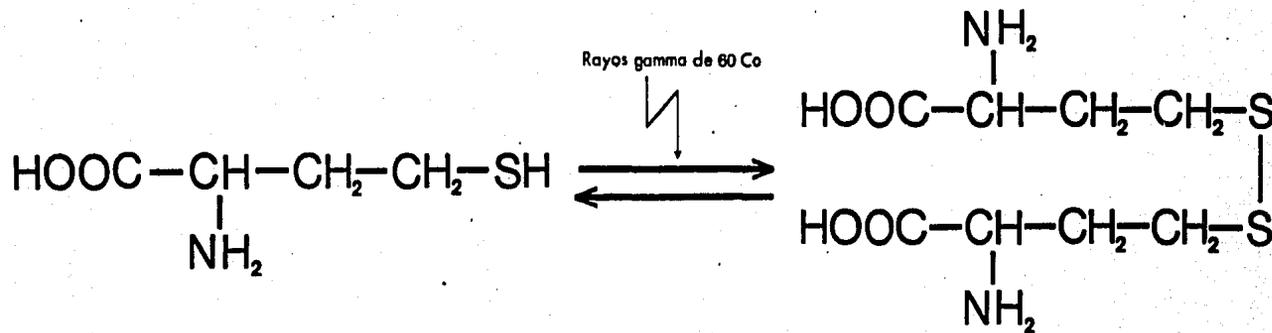
En este grupo de sustancias se encuentran la L-cisteína y la AET (aminoetil isotiourea).

L-cisteína. La fórmula desarrollada de la L-cisteína se encuentra en la Figura 4. Bajo la influencia de la radiación ionizante la cisteína se oxida y da lugar a la cistina en forma reversible; estableciéndose un equilibrio entre las dos que depende de la concentración de oxígeno en el momento de la irradiación. La cistina es el disulfuro de la cisteína (Figura 4).

Una investigación de Dewey y Beecher (1965) mostró que durante irradiación anaeróbica la conversión de cisteína a cistina no se llevó a cabo y se alcanzó el equilibrio al 50% de la oxidación, esto se confirmó al irradiar la forma oxidada y demostrar su reducción. En un sistema saturado de oxígeno el equilibrio estuvo muy cerca de alcanzar la producción de 100% de cistina (Adams et al., 1969). Esto es interesante pues al oxidarse la solución de cisteína y formarse el puente disulfuro, impide la acción protectora de la molécula a través del grupo SH.

La acción de protección metabólica o bioquímica de la cistina ha sido probada desde hace mucho tiempo y en diversos sistemas, como ratas y ratones por Patt et al., (1949), Bacq (1975), Langedorff et al., (1954), evaluándola a nivel de supervivencia.

Hernádi et al., (1969) probaron que la síntesis de ARN y proteínas en cepas de Escherichia coli irradiadas cesó, mientras que la del ADN continuó su tasa de síntesis original. De este modo aumentó el contenido de ADN en las células, el cual está asociado con una mayor radioresisten-



L-Cisteína

Cistina

Fig. 4 Oxidación de la L-cisteína a cistina

cia (Billen 1963).

El cese de la síntesis de proteínas se debe al bloqueo reversible de la biosíntesis de algunos aminoácidos como leucina, valina y treonina (Kovács et al., 1968). Al quitar la cisteína se reanuda la síntesis de ARN y de proteínas, mientras que la de ADN comienza después de un lapso de 25 minutos y ésto favorece la posibilidad de reparación del daño al ADN antes de la replicación.

En la Tabla 3 se presenta el efecto protector de la L-cisteína contra el daño fisiológico producido por las radiaciones ionizantes en diversos sistemas biológicos, con diferentes concentraciones y condiciones de aplicación, puntualizándose el nivel biológico donde brindó la protección.

AET o aminoetil isotiourea. La fórmula desarrollada de la AET se presenta en la Figura 5. Estando en solución, esta molécula se hidroliza al romperse el enlace C-S, dando lugar al grupo SH libre y a una molécula de urea como lo muestra la Figura 6.

Otro mecanismo que puede llevarse a cabo es la rápida transguanilación del compuesto a pH cercanos a 7.0. Esta reacción requiere el paso a un compuesto cíclico como se presenta en la Figura 5, dejando activo al grupo SH. (Bacq 1975).

Bajo la acción de la radiación ionizante la AET puede oxidarse y formar el disulfuro de guanidin etilo (GED) como se presenta en la Figura 5.

El pretratamiento del material con la AET antes de ser irradiado, ha probado ampliamente su efecto protector y se ha considerado hasta 8 veces más eficiente que la L-cisteína en ratones (Straube y Patt 1953). También Maisin et al., (1978) ha demostrado la superioridad de la protección brindada por la AET en relación a otros protectores a nivel de la DL 50/30 en ratones.

La protección de la AET ha sido explicada no solo por la acción

TABLA 3 Efecto protector de la L-Cisteína contra el daño fisiológico producido por las radiaciones ionizantes en diversos sistemas biológicos.

Concentración y Condiciones de aplicación.	Sistema Biológico	Dosis (rads)	Nivel de Protección	Fuente de Informac.
1×10^{-1} M aplicación antes irradiación.	Semillas de cebada Hordeum vulgare var.himalaya	5 Kr rayos X	Altura plántula	Biswas y Matsuo. 1966
10 m M 30 min. antes irradiación.	-Cels de Escherichia Coli B -Fracción Superviven- cia.	1600 Kr De rayos X	-Aumento -Fracción superviven- cia. -FRD = 2.1	Kovács et. al; 1968
0.8 mg/g	Ratones C3H/He -Supervivencia LD 50/8 -Dosis de depilación DD 50/35	1510 - 1970 r de rayos X	-Aumento superviven- cia. FRD = 1.30 -FRD de DD FRD aumento en fun- ción a la conc. de Cisteína.	Tsukiyama 1976
2 m M 16 hrs. antes irradiación.	Semillas cebada -Altura plántula al 10º día - 8% en relación al control.	30 Kr Rayos X	-63% en relación al control.	Kak 1977
20 m M 10 min. antes irradiación	En células en culti- vo de mamífero (L-5_	200 r rayos X	Disminución retardo mitótico (Fase G ₂)	Kawasaki 1977
1.5 m M	Met mioglobina de -- músculo esquelético- de equino.	54 Kr 60Co.	-Producción de sulfomioglobina	Motohashi et. al; 1977

TABLA 3

Concentración y Condiciones de aplicación.	Sistema Biológico	Dosis (rads)	Nivel de Protección	Fuente de Informac.
80 mg/ paciente administrada antes irradiación	-Cáncer de seno -Uterocervical	NR	-Disminución en conteo de células blancas (3a semana) -Conteos de hematocrito y plaquetas. -Rango de Sedimentación sanguínea más estable. -Menos anorexia.	Ohshima et. al; 1977
cisteína .005 y .01 M 4 h después de la irradiación.	Semillas de Sorgo - (Sorghum bicolor(L)) -Longitud raíz primaria. -Altura coleóptilo. -Altura plántula (a los 7 días de germinadas).	20 - 50 Kr 60Co	-Incremento -Long raíz primaria -Altura coleóptilo -Altura plántula proporcional a incremento de dosis de cisteína.	Reddy y Smith 1978.
cisteína - 8 m M +Ro-01-0582 Mesonidazol (sensibilizador)	Hamster -cels de ovario in vitro	600-1200 r de rayos X	-favoreció daño a -cels tumorales -protección tisular -Sensibilización --cels tumorales. -protección de cels bien oxigenadas.	Yuhás y Li 1978
	-cepas de levaduras silvestres y resistentes. -Supervivencia.	NR	-Incremento superv. -Mutantes radiose sensitivas (con defecto sistema reparación) Actúan en el sistema de reparación.	Petín y Matrenina 1979
5 m M cisteína antes y durante irradiación.	-Sol acuosa de 3.3 mg/ml de ADN del virus Ø x 174 -pH 5 - 10	Rayos GAMMA 60Co	-inducción sitios alcalilables contribuyen a reducir los rompimientos de una banda de ADN del virus Ø x 174.	Lafleur et al; 1980

NR= No reportado.

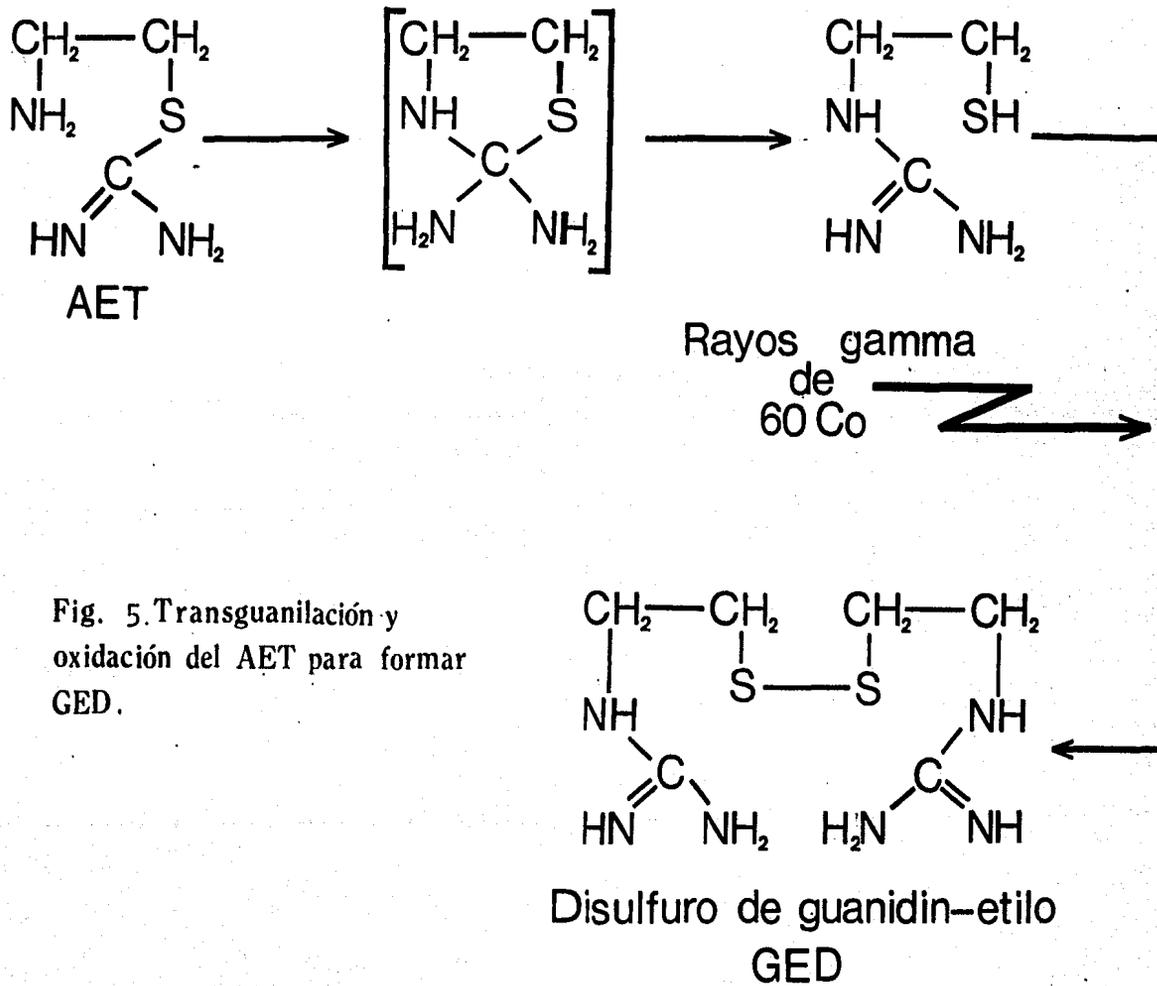
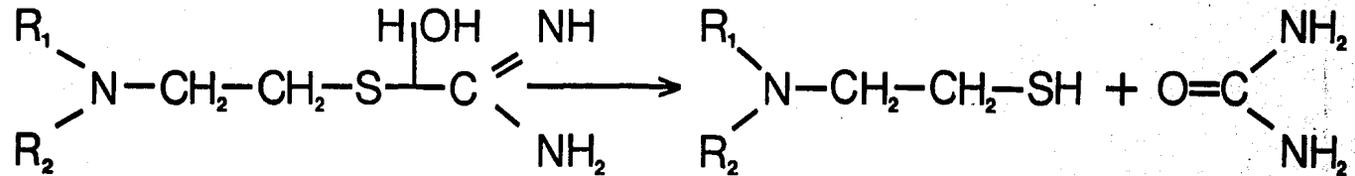


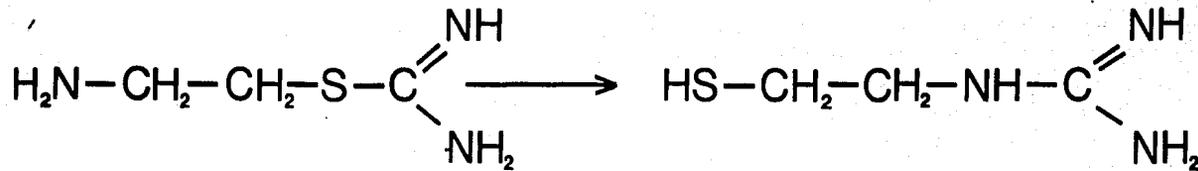
Fig. 5. Transguanilación y oxidación del AET para formar GED.

AET

1.- HIDROLISIS DE LA MOLECULA DE LA AET.



2.- TRANSGUANILACION DE LA AET:



Cisteína

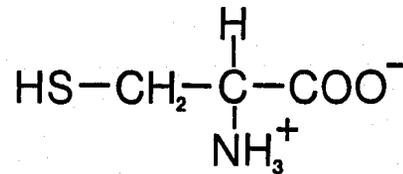


FIGURA 6.

radioquímica a nivel de la captura de radicales libres, sino por una acción bioquímica donde están implicados los siguientes mecanismos básicos:

a) Formación de disulfuros, mezclados con los grupos SH de enzimas, proteínas, ácidos alifáticos insaturados, etc., alterando la sensibilidad a la radiación de estas sustancias. (Romantsev et al., 1969). El mecanismo hipotético de protección de una molécula de proteína, contra un golpe directo, por formación de mezcla de disulfuros parece ser como sigue: La partícula golpeada a partir de la molécula blanco saca un electrón. El átomo vacante es reparado por movimientos de electrones a lo largo de la cadena, dejando el enlace disulfuro solo con un electrón. Este enlace se rompe después de la reconstitución del enlace SH (Figura 2).

b) Inhibición de la biosíntesis de ARN y ADN así como retardo en la actividad mitótica. Una posibilidad es que el protector tome el papel de la histona y proteja las partes de ADN no cubiertas por la histona; otra que altere la configuración de algunas proteínas y su sensibilidad a la radiación. (Antoku 1975, Kawasaki 1977).

c) Inhibición de algunas enzimas, probablemente con acción reparadora (enzimas del ciclo de Krebs, como la deshidrogenasa succínica, la citocromo oxidasa, o la RNA polimerasa, etc.)

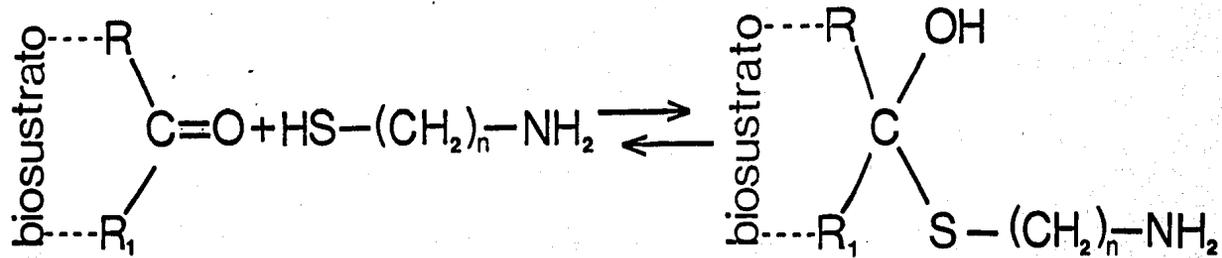
d) Entrando en acción reversible con grupos $C = O$ que forman parte de muchos compuestos celulares importantes, dando oportunidad a que la célula se repare. La reacción de la AET con los grupos $C = O$ puede ser de 2 maneras :

- 1.- Mediante la formación de semitioacetales. (Figura 7).
- 2.- Formando grupos heterocíclicos como la tiazolidina. (Figura 7).

Una vez formados estos complejos, a través del grupo disulfuro, absorben la energía depositada por la radiación, rompiéndose el grupo S-S y restituyéndose después el grupo SH del biosustrato, brindando de este modo protección a la molécula.

En la Tabla 4, se presenta el efecto protector de la AET, con-

Formación de semitioacetales



Formación de grupos heterocíclicos (tiazolidina)

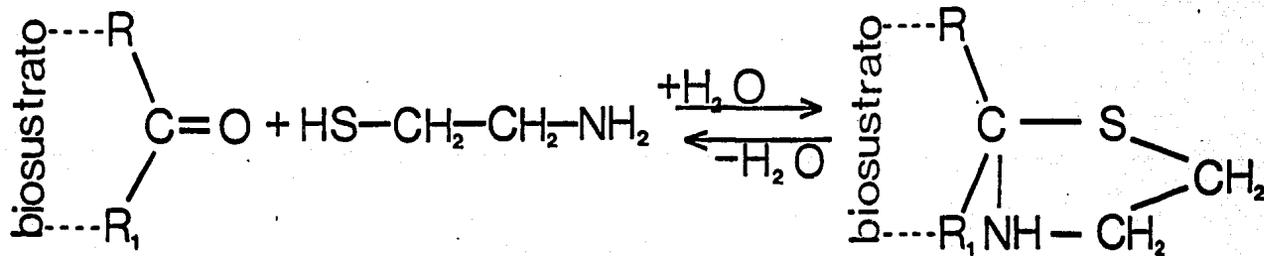


FIGURA 7

TABLA 4. Efecto Protector del AET (2 amino-etil isotiouronio) contra el daño Fisiológico producido por las radiaciones ionizantes en diversos sistemas biológicos.

Concentración y condiciones de aplicación	Sistema Biológico	Dosis (rads)	Nivel de Protección	Fuente de Información
NR	ratón - glomérulo esclerosis y nefroesclerosis	NR	Inhibición del linfoma tfmico - disminución de glomérulo esclerosis y nefroesclerosis	Cosgrove et al., 1965
8 mg AET Inyección intraperitoneal 10-15min antes de la irradiación	ratón FAFIJ -Hepatomas -Tumores no linfáticos	500 800 r rayos X	- 500 r disminución de hepatomas. - disminución de tumores no linfáticos.	Davis et al., 1970.
AET 50 mg/Kg 20 min antes irradiación	<u>Conejos</u> -Estructuras cerebrales. -Equilibrio ácido-básico de sangre -Hiperexcitabilidad	650 r	Sist. nervioso central -Hiperexcitabilidad reducida.	Fatome et al., 1976
150 mg/Kg (10 min antes irradiación)	Hamster chino células de médula ósea - Supervivencia DL 50/30	966 r rayos de 60Co.	-Supervivientes (DL 50/30) 15.4% más que los no protegidos	Sadilková y Fremuth 1976

NR= No reportado.

TABLA 4

<p>AET 5m M 10 min. antes de la irradiación</p>	<p>CULTIVO DE CELULAS L-5 MAMIFERO - Ciclo celular</p>	<p>200 r rayos X</p>	<p>Fase G₂ del ciclo celular</p>	<p>Kawasaki 1977</p>
<p>AET Mezclado a gas hipoxico</p>	<p>COMPLEJO ADN MEMBRANA DE TIMOCITOS HEPATOCITOS Y CELULAS DE CARCINOMA DE ASCITES</p>	<p>Subletales</p>	<p>2-3 veces <u>MENOS</u> liberación de subunidades de ADN, ligadas con lípidos</p>	<p>Strazhevskaya et al., 1977.</p>
<p>AET 280 - 310 mg/ Kg Intraperitonealmente 15-20 min antes irradiación</p>	<p>Ratones C₅₇/B1 6-J -Supervivencia criptas intestinales -letalidad</p>	<p>250 r/min.</p>	<p>-Incremento en la Supervivencia. -disminución de criptas. no tratados LD_{50/30} 488 rds. Tatados con AET LD_{50/30} 512 rds -Letalidad FRD=1.42</p>	<p>Sigdestad et al., 1976.</p>
<p>AET 150 mg/Kg</p>	<p>Cerdos de guinea y ratas -deshidrogenasas (ciclos de la pentosa-fostato en eritrocitos</p>	<p>800 r</p>	<p>evitar inhibición de la deshidrogenasa en 18.6% (4º día despues irradiación</p>	<p>Gorelik et al., 1977</p>
	<p>RATONES BALB/c ó C₅₇ B₁ -muerte espontánea -enfermedades letales -incidencia linfoma de timo</p>	<p>650-1000 r de rayos X</p>	<p>-Disminución de incidencia de linfoma de timo</p>	<p>Maisin et al., 1978</p>

TABLA 4

<p>AET 4-8 mg 10 min antes Irradiación</p>	<p>Ratón BalB/⁺_c -acortamiento de la vida LD 50/30-60 699 r</p>	<p>X ray Fraccio- nada (30 dfas) 2000 r</p>	<p>LD 50/30-60 1160 r</p>	<p>Malsin et al., 1978</p>
	<p>Ratón - Células L - Supervivencia celu- lar - Formación rupturas de sencilla y doble banda en ADN</p>	<p>Rayos X</p>	<p>- Aumento superviven- cia celular -Disminución en ruptur- as sencillas y dobles en las bandas de ADN</p>	<p>Mori 1978</p>
	<p>ratones - Supervivencia</p>	<p>11000- 13000 r rayos X</p>	<p>-Incremento Superviven- cia</p>	<p>Shinoda et al., 1978</p>
<p>AET 280 mg/Kg</p>	<p>ratones -concentración de do- pamina en glándulas adrenales -contenido noradrena- lina en corazón</p>	<p>800 r 60Co</p>	<p>-aumento dopamina en grandulas adenales -disminución en con- centración de noradre- nalina en corazón</p>	<p>Szerafinne et al., 1980</p>

tra el daño fisiológico producido por las radiaciones ionizantes en diferentes sistemas biológicos, así como las diferentes concentraciones y condiciones de aplicación usadas, determinándose el nivel biológico donde brindó la protección.

12. Material biológico utilizado

La cebada fue la primera especie que se utilizó para los experimentos de mutagénesis en plantas, (Stadler, 1928) y su uso ha continuado siendo el más frecuente para este tipo de investigaciones (Konzak y Favret, 1972; Nilan y Vig, 1976; Gaul, 1977, Walt y Seibold, 1979).

Además, se ha utilizado en estudios radiobiológicos relacionados con la mutagénesis a niveles de la cuantificación de la división, los números, longitudes y anchuras de las células de los coleóptilos, (Liptay y Davidson, 1971, 1972; Muir, 1974; Palomino et al., 1979, etc.). Lo anterior se debe básicamente, a la fácil manipulación de esta especie en el laboratorio, tomando en cuenta algunas variables fisiológicas como son germinación, altura de la plántula y del coleóptilo : número, largo y ancho de sus células, etc.

Además, han aparecido mutaciones clorofílicas en plántulas de semillas de la generación M2 —provenientes de la generación tratada ó M1, (Gaul, 1977)— características que pueden relacionarse con el comportamiento de las variables fisiológicas evaluadas en las semillas tratadas en el laboratorio.

13. Objetivos

El propósito de este trabajo fue estudiar el efecto del tratamiento de semillas de cebada Hordeum vulgare variedad himalaya con AET (aminoetil isotiourea) o L-cisteína administrados antes de irradiarlas con rayos gamma de ^{60}Co , ya sea a dosis bajas o dosis altas.

El efecto del tratamiento se estudió en las plántulas de la generación M1, mediante la evaluación, al término del crecimiento y en condiciones de luz, temperatura y humedad controladas, de los siguientes parámetros : la supervivencia, la altura del coleóptilo y la plántula. Así mismo se analizó el efecto de los tratamientos y las dosis de radiación en el número, ancho y largo de las células de los coleóptilos para profundizar en el conocimiento de los mecanismos que intervienen en la división y elongación celular como funciones que permiten determinar el daño fisiológico producido por las radiaciones en el material biológico y cuantificar el efecto protector brindado por las sustancias químicas.

MATERIALES Y METODOS

1. Material biológico utilizado.

Se emplearon semillas de cebada Hordeum vulgare var. himalaya. Cosecha de 1979.

2. Reactivos empleados.

El agua utilizada para preparar las soluciones de la AET y la L-cisteína, fue destilada y hervida por 15 minutos tiempo necesario para desoxigenarla y obtener concentraciones de 0.05 de O_2 /litro, cuantificado por el método de Winckler (APHA 1975).

Como protectores se utilizaron el AET o 2 bromuro hidrobromuro de aminoetil-isotiouronio con un PM de 281.00 (Sigma Chemical Co.) y el hidrocloreuro monohidratado de L-cisteína con un PM de 175.63 (J. T. Baker Chemical Co.).

Para la preparación de las soluciones amortiguadoras de fosfatos se utilizó el KH_2PO_4 que se ajustó a los pH de 7.0 y 8.0 con NaOH.

Para separar las células de los coleóptilos se usaron soluciones de ácido acético al 5% de HCl 2N.

Todos los reactivos fueron de grado analítico.

3. Contenido de humedad de las semillas.

El contenido de humedad de las semillas de cebada se determinó mediante el método de secado en estufa, propuesto por la International Seed Testing Association (1966).

El secado de las muestras se realizó en cajas de aluminio que contenían entre 5 y 10 gramos de semilla las cuales se colocaron en una estufa de circulación forzada a 130°C durante 72 horas. El contenido de humedad se obtuvo por diferencia de peso y se expresó en base a peso húmedo mediante la siguiente fórmula

$$\% \text{ HUMEDAD} = \frac{A}{B} \times 100$$

Donde A = pérdida de peso en gramos

B = peso húmedo original de la muestra

El contenido de humedad se obtuvo del promedio de 10 repeticiones para el lote tratado 1 hora con agua, o con AET 0.03M o con L-cisteína 0.05M.

El secado de las muestras se inició inmediatamente después de los tratamientos arriba mencionados.

4. Tratamiento con los protectores y con la irradiación gamma de 60 Co

Fueron tratados lotes de 100 semillas de cebada durante 1 hora en 50 ml de agua, AET al 0.03 M o de L-cisteína al 0.05 M, y a temperaturas de $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Estas molaridades resultaron las máximas en las cuales el número de semillas germinadas, la altura del coleóptilo y plántula al término de su crecimiento no resultaron significativamente diferentes comparadas con las muestras tratadas con agua.

En seguida se lavaron durante 5 minutos en agua destilada. Después se irradiaron a dosis de 10, 30, 50, 75, 100, 125, 150 y 200 kr y con una razón de dosis de 1.065 ± 0.02 kr/min en la fuente de irradiación Gammacell 200 o a dosis de 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400 y 1600 kr y a una razón de dosis promedio de 9.91 ± 0.025 kr/min en el Gammabeam 650, ambas fuentes de rayos gamma de 60 Co.

Después se lavaron con hipoclorito de sodio al 3% durante dos minutos, se enjuagaron nuevamente en agua destilada y se sembraron en palangana de plástico de 33 x 27 x 14 cm con una capa de algodón de 33 g, cubierto con papel filtro y humedecido con 450 ml de agua destilada. Todo ésto previamente esterilizado (Gaul, 1963).

En seguida se sembraron las semillas con pinzas estériles sobre el papel filtro; para evitar la evaporación, las palanganas fueron cubier-

tas con un armazón de bronce recubierto con polietileno transparente con 8 perforaciones de 1 cm de diámetro cada uno.

Los lotes se colocaron en una cámara de germinación en total oscuridad a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ de acuerdo a un diseño factorial (de 2 factores) completamente al azar con 3 repeticiones de 100 observaciones cada una (Gaul, 1977); como lo muestran la Tabla 5 para bajas dosis y la Tabla 6 para altas dosis. Las Tablas 7 y 8 expresan la metodología general usada en estos experimentos.

Las semillas se consideraron germinadas cuando presentaban raíces, coleóptilo y plántula completas, se midieron al cabo de 15 días después de sembradas, al término de su crecimiento en condiciones de la laboratorio (Konzak y Favret, 1972).

El daño inducido por las diferentes dosis de radiación, representado como porcentaje del lote control (% DRC), de las longitudes de los coleóptilos, plántulas y número de semillas germinadas, se calcularon de acuerdo al método de Conger et al., (1968), que proponen :

$$\% \text{ DRC} = \frac{L_c - L_t}{L_c} \times 100$$

Donde L_c = Longitud promedio del lote control

L_t = Longitud promedio del lote tratado

5. Determinación de los números longitudes y anchos celulares

Cuando la altura de los coleóptilos, de las semillas tratadas e irradiadas, como de los testigos llegó al término de su crecimiento después de 15 días de sembrados, se procesaron para determinar la cantidad de células presentes.

La técnica se basó en las descritas por Wright (1961) y Rose y Adamson (1969), modificadas.

Para cada una de las (21 X 3) observaciones en relación al número de células, ancho y largo celulares, generadas con los 21 tratamientos

TABLA 5. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EVALUAR LOS EFECTOS EN LA GERMINACION, LONGITUD DEL COLEOPTILO Y PLANTULA DE LAS SEMILLAS DE CEBADA VAR. HIMALAYA TRATADAS UNA HORA CON AGUA, AET Y L-CISTEINA ANTES DE LA IRRADIA CION CON DIFERENTES DOSIS DE RAYOS GAMMA DE 60Co.

Dosis (Kr)	A G U A	A E T	L - CISTEINA
0	100 100 100		
10			
30			
50			
75			
100			
125			
150			
200			

TABLA 6. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EVALUAR LOS EFECTOS EN LA GERMINACION, LA LONGITUD DEL COLEOPTILO Y PLANTULA DE LAS SEMILLAS DE CEBADA VAR. HIMALAYA TRATADAS UNA HORA CON AGUA, AET y L-CISTEINA ANTES DE LA IRRADIACION CON DIFERENTES DOSIS DE RAYOS GAMMA DE 60Co.

Dosis (Kr)	A G U A	A E T	L - CISTEINA
0	100 100 100		
100			
200			
400			
600			
800			
1000			
1200			
1400			
1600			

TABLA 7

RADIOPROTECTORES EN PLANTAS SUPERIORES

FACTORES BIOLÓGICOS

- a) Composición genética
- b) Estados fisiológicos del organismo

FACTORES QUÍMICOS

- a) Oxígeno
- b) pH
- c) Protectores (diversas sustancias químicas)

RADIACIONES (Dosis Razón de Dosis Dosimetría) + SISTEMA BIOLÓGICO

FACTORES FÍSICOS

- a) Contenido de humedad
- b) Almacenamiento

PARAMETRO DE EVALUACION EN
 LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

LABORATORIO

M1 {
 GERMINACION
 VELOCIDAD DE GERMINACION
 ALTURA DEL COLEOPTILO
 ALTURA DE LA PLANTULA
 NUMERO Y LONGITUD DE LAS
 CELULAS DEL COLEOPTILO
 NUMERO Y LONGITUD DE LAS
 CELULAS DE LA 1a. HOJA
 DE LA PLANTULA

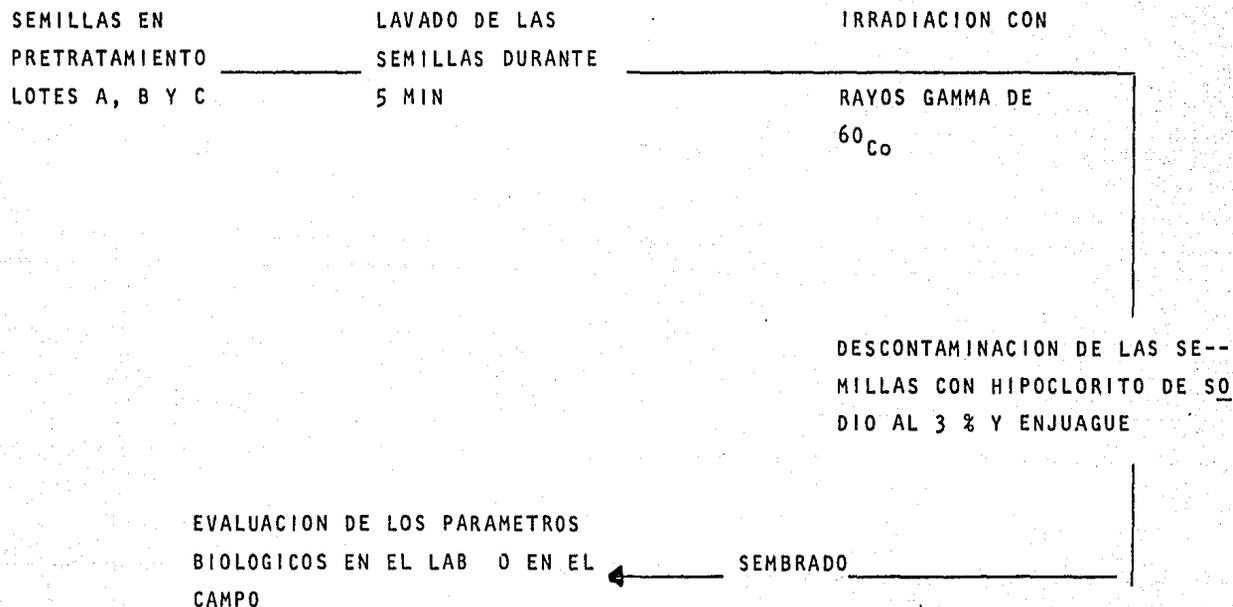
CAMPO

SUPERVIVENCIA
 ALTURA DE LA PLANTA
 NUMERO DE HIJUELOS
 LONGITUD DE LA ESPIGA
 PRINCIPAL
 NUMERO DE ESPIGUILLAS
 PESO DE LA ESPIGA PRINCIPAL

M2 ————— EFECTIVIDAD DEL MUTAGENO

M3 ————— SELECCION DE MUTANTES

TABLA 8 METODO USADO PARA EVALUAR LOS EFECTOS ENTRE LAS RADIACIONES GAMMA DEL ^{60}Co EN SEMILLAS DE HORDEUM VULGARE VAR HIMALAYA PRETRATADAS CON AET (AMINOETIL ISOTIOUREA) O CON L-CISTEINA,



LOTE	A=	PRETRATAMIENTO	1h	con H_2O
LOTE	B=	PRETRATAMIENTO	1h	con AET
LOTE	C=	PRETRATAMIENTO	1h	con L-CISTEINA

originados de las combinaciones de agua, AET y L-cisteína con la 7 dosis escogidas, se seleccionaron al azar 20 coleóptilos, se colocaron bajo el microscopio de disección y se les separó de la semilla haciendo un corte a nivel del epiblasto. Los coleóptilos separados y sin la plántula fueron colocados en volúmenes de 15 ml de ácido acético al 5% en HCl 2N, en matraces aforados de 50 ml. Estos se pesaron y se sometieron a ebullición por 3 minutos, el volumen perdido por evaporación se recuperó, agregando la misma solución hasta alcanzar el peso original. Por último los matraces se colocaron en un baño María con agitación, a una temperatura de 40°C y por 72 horas.

El conteo de las células en suspensión se llevó a cabo con el método de conteo de fitoplacton en un microscopio invertido. Para tomar la suspensión del matraz se emplearon pipetas de 1 ml graduadas hasta 1/100 de ml y se colocó 0.1 de ml en una cámara de 10 ml graduada, la cual se llenó con solución de ácido acético 5% en HCl 2N. De esta suspensión se contaron las células contenidas en 1 mm³ de la cámara graduada y se determinó la cantidad de células por coleóptilo relacionando el número de células encontradas en el volumen total de la suspensión y el número de coleóptilos procesados. De cada campo se media el largo y el ancho de 20 células escogidas al azar con un micrométrico ocular.

Tanto los conteos del número de células como las mediciones se repitieron por tres veces.

6. Fuentes de Irradiación gamma de 60Co.

Las irradiaciones de las semillas de cebada se llevaron a cabo en 2 fuentes de irradiación de rayos gamma de 60Co, localizadas en el Centro de Estudios Nucleares de la UNAM, el Gammacell 200 y el Gammabeam 650.

Gammacell 200.

Es un irradiador de rayos gamma de 60Co. Básicamente consiste de una

fuente de forma anular, un blindaje de plomo alrededor de la fuente y una cavidad cilíndrica o émbolo que se mueve verticalmente a través del centro de la fuente con una cámara de irradiación de 13.9 cm de largo por 8.9 cm de diámetro donde se coloca desde afuera la muestra a irradiar. Todo lo anterior está contenido en una consola con blindaje de plomo (Figuras 8 y 9).

En el mes de abril de 1981, su intensidad era de 593.9 Ci de ^{60}Co . La intensidad de dosis central es de 0.1 Mr/hora. (Azamar, 1982). El material biológico se irradió a razón de dosis de 1.065 ± 0.023 Kr/min.

Las semillas de cebada se irradiaron en esta fuente a dosis de 10, 30, 50, 75, 100, 125 y 200 Kr.

Gammabeam 650.

Es un irradiador de rayos gamma de ^{60}Co . Para el mes de abril de 1982 su intensidad era de 13 657 Ci de ^{60}Co , con una intensidad de dosis máxima de 2.48 Mr/h con una abertura de 11 cm de diámetro.

Las fuentes que lo componen están contenidas en 12 tubos verticales, los cuales están colocados en forma cilíndrica y pueden abrirse a diferentes diámetros, desde 11 a 82.5 cm, según la razón de dosis requerida.

Las irradiaciones pueden realizarse en la cavidad central, entre las 12 fuentes o en el área panorámica (Figura 10).

El material biológico empleado fue irradiado en la cavidad central, a una razón de dosis promedio de 9.91 ± 0.25 Kr/min y con dosis totales de 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400 y 1600 Kr.

7. Dosimetría

La dosimetría es la medida de un cambio físico o químico producido en un dosímetro, al pasar la radiación a través de él. Dicha medida depende de la cantidad de energía absorbida.

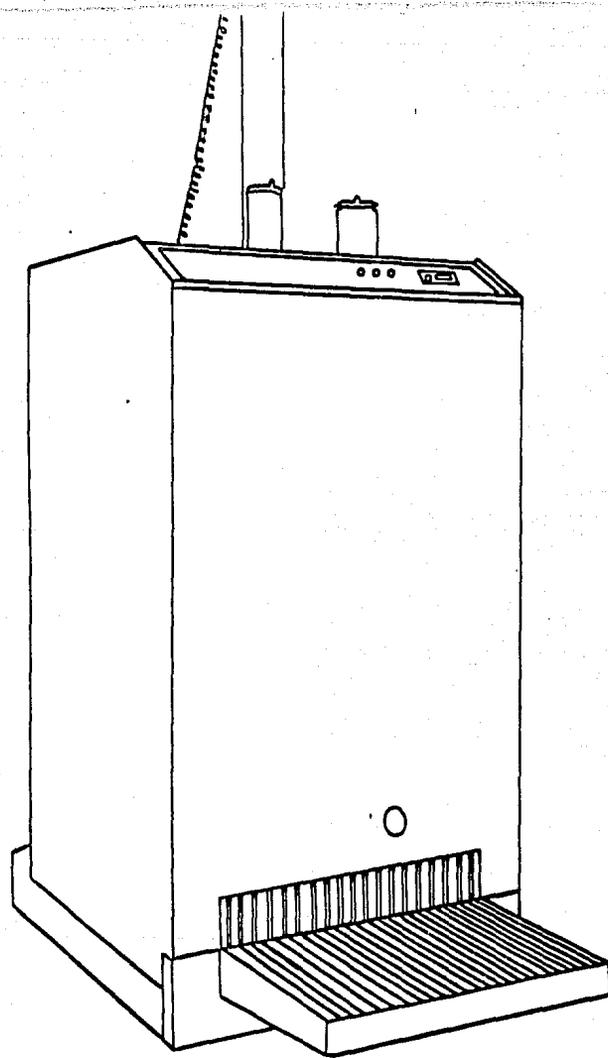


FIG. 8 GAMMACELL 200 CONSOLA QUE CONTIENE LAS FUENTES DE ^{60}Co .

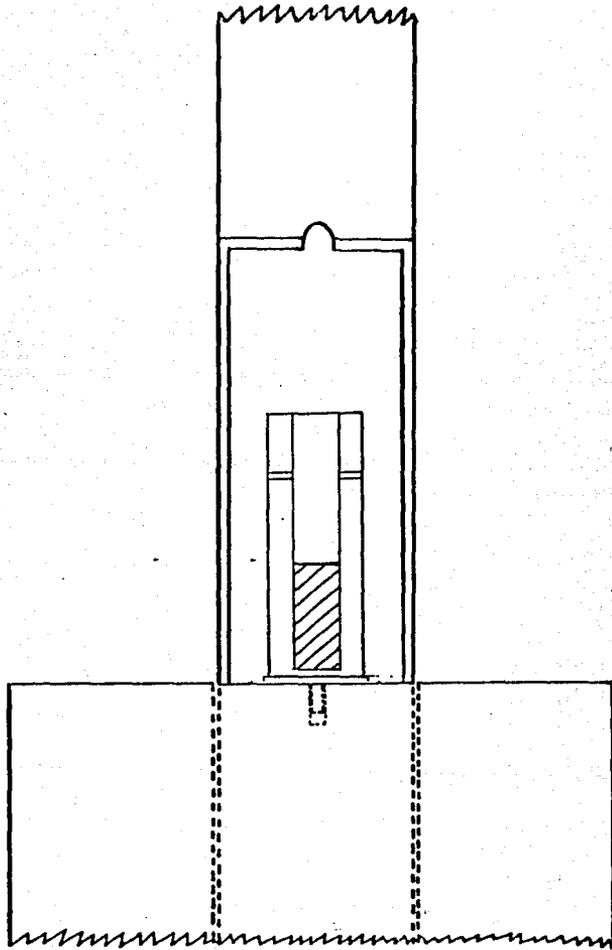


FIG. 9 CAMARA DE IRRADIACION DEL GAMMACELL 200 DENTRO DE LA CUAL SE COLOCO LA MUESTRA.

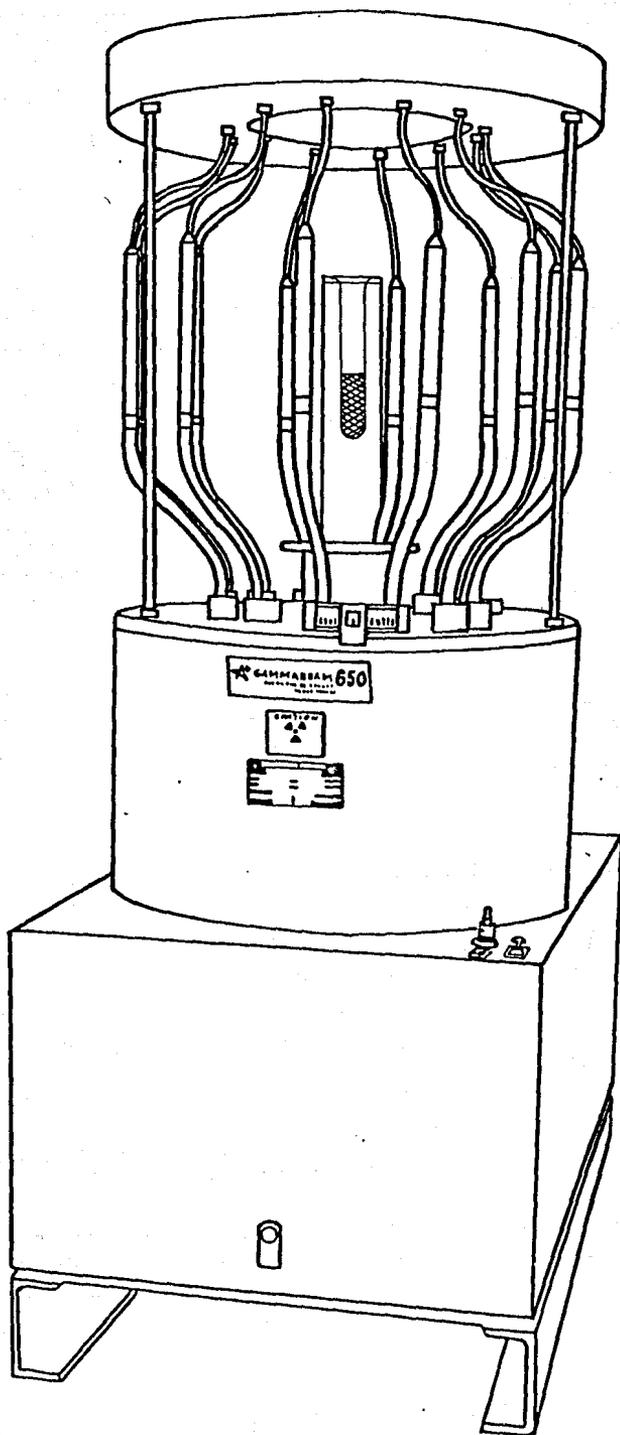


FIG. 10 GAMMABEAM 650. AREA CENTRAL DE IRRADIACION CON EL CONTENEDOR Y LA MUESTRA. TOMADO DE AZAMAR B.A.J. 1982.

La dosimetría usada en este experimento se realizó con el dosímetro de Ficke.

Dosimetría Química.

En la dosimetría química la dosis de radiación se determina por el cambio químico producido en un sustrato estable. El cálculo de la dosis requiere del conocimiento del valor G es decir, el número de moléculas transformadas por cada 100 electrón volt (eV) de energía absorbida, del producto estimado en la reacción, el cual es calculado comparando el sistema químico con alguno de los dosímetros absolutos. Los dosímetros químicos por esto son dosímetros secundarios y son usados por su gran conveniencia. La cantidad que miden es la dosis exacta absorbida la cual puede convertirse a dosis absorbidas en otros medios materiales (Azamar 1982).

El dosímetro de Fricke fue el usado en estos experimentos para medir la dosis absorbida por el material y consiste de una solución de

Sulfato ferroso amónico	$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.001 M
Cloruro de Sodio	NaCl	0.001 M
Acido sulfúrico	H_2SO_4	0.4 M

Los reactivos empleados en la preparación del dosímetro fueron de grado analítico y como solvente agua tridestilada.

La reacción fundamental de este dosímetro consiste en la oxidación de una solución ácida de sulfato ferroso a la sal férrica en presencia del oxígeno y bajo la influencia de la radiación.

La concentración del ion férrico se determinó midiendo la densidad óptica de la solución con un espectrofotómetro marca UNICAM sp 500, a una longitud de onda de 304 mμ y 25°C controlados con un baño termocirculador.

La dosis absorbida en rads (D) fue calculada por la siguiente fórmula

general

$$(1) \quad D = \frac{N \Delta (D.O.) 100}{\epsilon 10^3 G (Fe^{+3}) f \rho l}$$

Donde : N = al número de Avogadro, 6.022×10^{23} moléculas por mol

Δ (D.O.) es la diferencia entre la densidad óptica del dosímetro irradiado y sin irradiar.

ϵ es el coeficiente de extinción molar, $2.197 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 25°C .

f es el factor de conversión para transición de electrón-volts por milímetro en rad, 6.245×10^{13} .

ρ es la densidad de la solución dosimétrica, 1.024 para 0.4 M de H_2SO_4 .

l Longitud del paso óptico en cm.

G (Fe^{+3}) es la reacción química producida por la radiación, bajo condiciones dadas.

Para 0.4 M H_2SO_4 , la celda de absorción de 1 cm y $G(\text{Fe}^{+3}) = 15.6$

La ecuación general (1) se reduce a

$$D = 2.75 \times 10^4 \times \Delta (D.O.) \text{ rad}$$

Tomado de Azamar (1982).

El dosímetro estándar de Fricke puede usarse dentro de un rango de dosis de 4,000 a 40,000 rads para la irradiación gamma.

Para la determinación de la razón de dosis se irradiaron en el Gamma-cel 200, muestras de 50 ml de solución de Fricke, con un volumen

igual al ocupado por 100 semillas de cebada, dentro de un tubo de ensaye cilíndrico de base plana de 2.3 cm y 9.0 cm de altura, colocado en un contenedor también cilíndrico de plomo con una base de 4.0, una altura de 9.0 y un grosor de 0.45 cm. Este fue depositado en el centro de la cámara de irradiación del aparato (Figura 9). Así, se irradiaron 4 muestras durante 1, 2, 5 y 10 min. Este procedimiento se repitió 3 veces.

Después se hicieron las lecturas de densidad óptica en el espectrofotómetro y se convirtieron a Kr, empleando la ecuación correspondiente (1).

De este modo se obtuvo una razón de dosis promedio de

$$RD = 1.065 \pm 0.023 \text{ Kr/min}$$

La dosimetría se repetía cada vez que se irradiaba el material biológico, para obtener la misma razón de dosis en cada experimento.

Para determinar la razón de dosis en el Gammabeam 650, también se empleó el dosímetro de Fricke como ya se describió.

Se colocaron 50 ml de solución de Fricke en un tubo de ensaye igual al ocupado por 100 semillas de cebada. El tubo se colocó en un dispositivo de aluminio, que se situó en el área central de las 12 fuentes de ^{60}Co del Gammabeam 650, las cuales permanecieron abiertas a un diámetro de 26.5 cm quedando el tubo de ensaye a 30 cm de distancia de la base del aparato (Figura 10).

Así, se irradiaron 4 muestras durante 1, 2, 5 y 10 min por triplicado. Después, se hicieron las lecturas de densidad óptica en el espectrofotómetro y se convirtieron a Krads empleando la ecuación mencionada (1).

De esta manera, se obtuvo una razón de dosis promedio de

$$RD = 9.91 \pm 0.25 \text{ Kr/min.}$$

La dosimetría se repitió cada vez que se irradiaban las semillas, para obtener la misma razón de dosis en cada experimento.

8. Determinación de la estabilidad de la AET y la L-cisteína.

La determinación se efectuó por colorimetría empleando como reactivo generador de la coloración el DTNB.

1) Equipo.- Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro PYE UNICAM SP 1800 a $412 \text{ m}\mu$.

Sustancias.- La L-cisteína, como clorohidrato monohidratado se obtuvo de J. T. Baker Chemical Co. El AET como bromhidrato de 2-bromuro de aminoetil isotiouronio y el DTNB ó ácido 5-5' dithiobis-2 nitrobenzoico, de Sigma Chemical Co.

Reactivos.- Se disuelven 39.6 mg de DTNB en 10 ml de buffer de fosfatos (pH $7.0 \mu = 0.1$).

Cálculos.- El error estándar o incertidumbre al cuantificar las 3 medidas de D.O. se calculó de la siguiente manera :

$$S_m = \frac{S}{(N-1)}$$

donde S = desviación típica

N = 3 repeticiones

En las curvas estándar se calculó la concentración promedio que fue observada cada 10 minutos y el error estándar de la concentración se calculó con la siguiente fórmula :

$$X = x \frac{\Delta Y}{Y}$$

donde X = concentración

ΔY = error estándar de la D.O.

Y = D.O. promedio

2) Determinación de los grupos SH.- La determinación de la estabilidad en la concentración de los grupos SH de las soluciones con AET o con la L-cisteína, durante la hora de tratamiento al que fueron sometidas las semillas de cebada, se llevó a cabo con el método propuesto por Ellman (1959), modificado.

Curva estándar.- Se prepararon soluciones frescas de L-cisteína 0.001 M en agua destilada y hervida libre de oxígeno, siendo utilizadas para la obtención de la curva estándar. En tubos de ensaye que contenían 2 ml de buffer de fosfatos (pH=8.0, $\mu = 0.1$), se adicionaron 0.1, 0.2, hasta 1.0 ml de solución de L-cisteína y se aforaron con agua destilada y hervida, hasta alcanzar un volumen final de 5 ml; 0.02 ml de DTNB fue adicionado a 3.0 ml de esta mezcla en una celda fotométrica. El color amarillo se desarrolló instantáneamente y se determinó el grado de absorción para cada tubo espectrofotométricamente.

Solución Problema.- La concentración de las soluciones de la AET o de la L-cisteína usadas para tratar durante una hora a las semillas de cebada, fue de 0.03 y 0.05 M, respectivamente. De estas soluciones se hicieron diluciones hasta tener una concentración final de 0.9×10^{-4} M para la AET y 1.0×10^{-4} M para la L-cisteína. Estas diluciones se encontraron dentro del rango de la sensibilidad del espectrofotómetro. Las mezclas se hicieron cada 10 minutos, correspondiendo a 3 ml para la AET y 1 ml para la L-cisteína, las cuales se aforaron hasta alcanzar 100 ml. En seguida se tomaron 0.5 y 1.0 ml de esas soluciones, respectivamente, añadiéndose en cada caso una mezcla de 2.0 ml de buffer de fosfatos pH 8.0 y aforándose con agua en ambos casos hasta el nivel de 5.0 ml. Finalmente, se adicionaron 0.02 ml de DTNB a 3.0 ml de dicha mezcla en la celda fotométrica y se procedió a la lectura en el aparato. El procedimiento anterior, se repitió tres veces para cada una de las sustancias. Con los promedios de las D.O. consideradas en la curva estándar, se calculó la concentración total promedio para cada lectura, calculando sus errores estándar.

9. Tratamiento Estadístico

1.- Longitudes de los coleóptilos y plántulas y número de semillas de cebada germinadas.- Para cuantificar el efecto protector de los tratamientos de una hora con agua, AET y L-CISTEINA. En las longitudes de los coleóptilos y plántulas y número de semillas de cebada germinadas e irradiadas a diferentes dosis de rayos gamma (transformada para su normalización a la raíz cuadrada del arco-seno de la proporción de semillas germinadas), de cebada, irradiadas a diferentes dosis de rayos gamma, se aplicó un factorial con dos factores. El primero (protector) correspondió a tres sustancias: agua, AET y L-cisteína. El segundo correspondió a diversas dosis de irradiación: 0, 10, 30, 50, 75, 100, 125, 150 y 200 Kr con lo que se generaron veintisiete tratamientos diferentes.

Tabla 20. Para cada uno de ellos se llevaron a cabo tres repeticiones de cien semillas en cada una y siguiendo un diseño factorial completamente al azar.

El modelo matemático que corresponde a esta análisis factorial fue :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

donde:

Y_{ijk} = observaciones de la variable de respuesta (Longitud de los coleóptilos, etc.)

μ = media general de la variable de respuesta.

α_i = efecto del nivel i del protector ($i = 1, 2, 3$).

1 = Agua 2- AET 3-L-cisteína

β_j = Efecto del nivel j de la dosis de radiación ($j = 1, 2, \dots, 9$).

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto de la interacción entre α_i (protector) y β_j (dosis)

Para cuantificar el efecto de los protectores en las variables de respuesta antes mencionados -con altas dosis de irradiación que correspondieron a 0, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 y 1600 Kr- se utilizó un análisis factorial desbalanceado, de dos factores, con 27 tratamientos diferentes, pues en el tratamiento con agua se obtuvieron lecturas de cero para la dosis de 1200, 1400 y 1600 Kr.

2.- Para el número, el largo y el ancho de las células de los coleóptilos.- Para evaluar el efecto de los protectores Agua, AET y L-cisteína en el número, largo y ancho de las células de los coleóptilos de semillas de cebada irradiadas con diferentes dosis de rayos gamma, se realizó también un análisis factorial con dos factores, el primero correspondió a tres protectores, agua, AET y L-cisteína, el segundo a siete dosis de radiación 0, 10, 50, 75, 125, 150 y 200 Kr. Esto dio lugar a veintidós tratamientos diferentes, cada uno se repitió tres veces, realizándose veinte observaciones en cada caso, siguiendo también un diseño factorial completamente al azar. Todos los datos se computaron en el IIMAS y los resultados se obtuvieron a través de una reparametrización, utilizando el paquete SPSS (1975) y a que las sub-rutinas del SPSS para el análisis de la varianza no contemplan la situación de un diseño desbalanceado.

Comparación múltiple de medias.- Para la comparación múltiple de medias de las longitudes de coleóptilos, plántulas, número de semillas germinadas y número, largo y ancho de las células de los coleóptilos, se empleó el método de Tukey que consiste en postular que dos medias son significativamente distintas si la diferencia entre

$$\left| \bar{X}_1 - \bar{X}_2 \right| \text{ es mayor que } q_{r,v}^{\alpha} \sqrt{\frac{S^2}{r}}$$

donde:

α = nivel de significatividad

r = número de medias que se comparan simultáneamente

v = grados de libertad del cuadro medio del error

S^2 = cuadrado medio del error

$q_{r,v}^{\alpha}$ = valor de tablas del rango estudentizado para comparar r medias con v grados de libertad y nivel de significación α .

Si sucede lo anterior debe considerarse que la hipótesis de igualdad entre las medias debe rechazarse. Méndez I (1976).

3.- Porcentaje de germinación. Para obtener las curvas del porcentaje de semillas germinadas en relación a la dosis aplicada, junto con las dosis máximas para las que germinan el 50, 75 y 95% de las semillas, con sus respectivos intervalos de confianza se realizó un análisis Probit.

El mejor ajuste resultó, considerando los valores extremos de proporciones 0 y 1 como 0.05 y 0.995 respectivamente y tomando la dosis al cuadro.

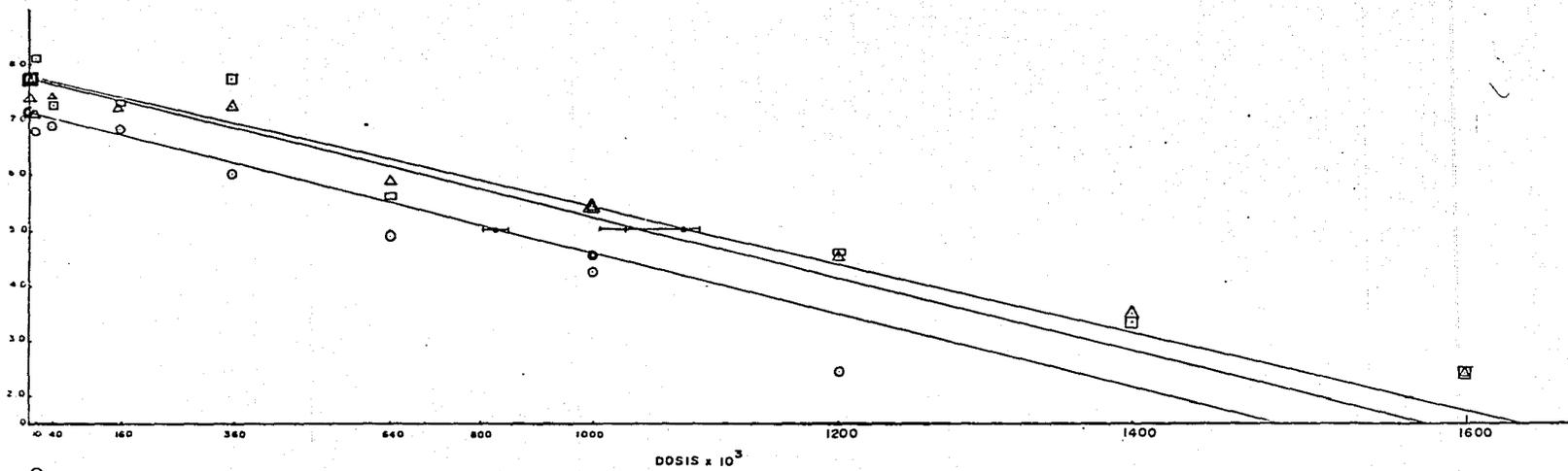
Los datos se analizaron utilizando el paquete estadístico GLIM del cual se obtienen los estimadores de los parámetros α y β de la regresión lineal simple entre el cuadro de la dosis y la proporción de semillas germinadas normalizadas por la transformación Probit. (Figura 11).

Posteriormente, aplicando el teorema de Feller (Ruiz Velasco Acosta, 1982), se obtuvieron los intervalos del 95% de confianza para las dosis máximas a las cuales germina el 50, 75 y 95% de las semillas.

(Tabla 9).

TABLA 9. Promedio de las Dosis e intervalos de confianza al 95% (I C 95%) a la que germinan el 50, 75 y 95% de las semillas tratadas con AGUA, AET y L-CISTEINA durante una hora antes de ser irradiadas con rayo gamma de 60Co

AGUA			A E T			L - CISTEINA		
% Semillas germinadas	Dosis (Kr)	I C 95% (Kr)	% Semillas germinadas	Dosis (Kr)	I C 95% (Kr)	% Semillas germinadas	Dosis (Kr)	I C 95% (Kr)
50	852.79	835.01 - 870.19	50	1125.46	1053.63-1189.43	50	1089.55	1021.35-1153.73
75	695.35	674.88 - 715.24	75	950.79	882.07-1019.02	75	919.28	805.98-1091.66
95	370.99	312.77 - 421.24	95	623.97	535.58- 701.30	95	599.72	358.24- 768.75



○ AGUA $Y = 7.028 - 0.000002790 X$
 △ AET $Y = 7.35 - 0.000001875 X$
 □ L-CISTEINA $Y = 7.38 - 0.00000188 X$

FIGURA 11

RESULTADOS Y DISCUSION

Los contenidos de humedad relativa fueron para el lote tratado con agua, de $8.60 \pm 0.18\%$, para el tratado con AET 0.03 M de $8.76 \pm 0.20\%$; para el tratado con L-cisteína 0.05 M de $8.68 \pm 0.15\%$.

En las Figuras 12 y 13 se presentan las curvas estándares para la AET y la L-cisteína, la ecuación para la primera fue $Y = 1.122 X$ y para la segunda $Y = X$. Mediante el análisis de los resultados mostrados por dichas curvas, se calcularon las concentraciones de los grupos SH cada 10 minutos, durante una hora para cada sustancia.

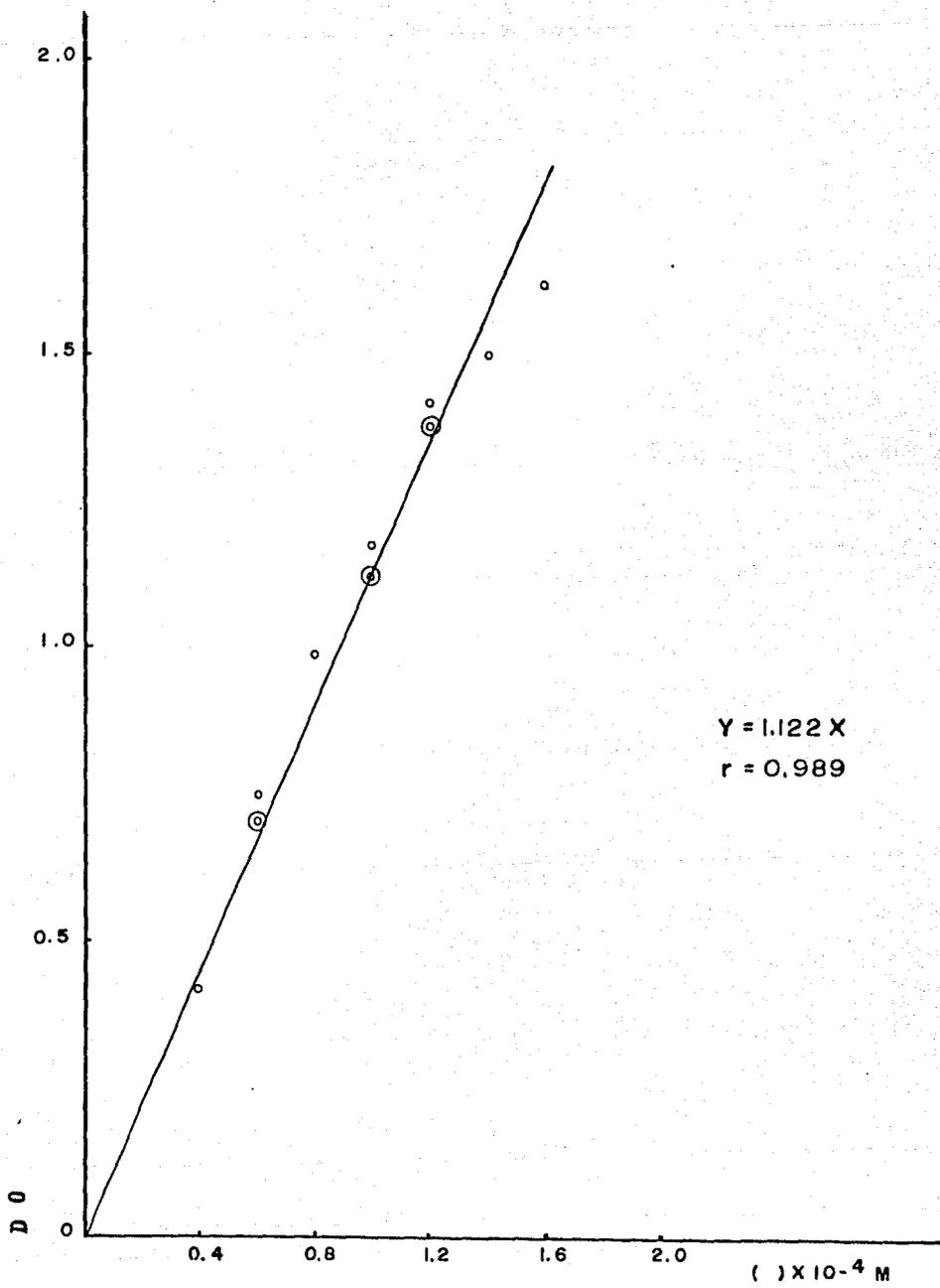
Las medias de los resultados de las 3 repeticiones, se encuentran en la Tabla 10.

La ecuación de la recta promedio para el cambio de concentración cada 10 min, evaluado durante 1 hora para la AET fue $Y = -8.90 \times 10^{-4} x + 1.07$ (Figura 14) y para la L-cisteína de $Y = -2.64 \times 10^{-5} x + 1.11$ (Figura 15).

A pesar de que se observa un comportamiento más homogéneo de la L-cisteína en relación a la AET, la mínima degradación en la concentración de grupos SH, en ambos casos, no fue significativa para el tratamiento aplicado durante una hora, como lo demuestran las pendientes que tienden a cero en ambas rectas. Lo que demuestra que durante la hora de tratamiento aplicado a las semillas con AET o L-cisteína, con las molaridades usadas no cambió la concentración de los grupos SH, a cuya reactividad deben su acción protectora dichas sustancias.

1. Determinación del efecto protector de la AET y la L-cisteína en el crecimiento al término de la plántula.

Se cuantificó el crecimiento, el porcentaje del mismo en relación al control (% RC), así como el porcentaje del daño en relación al control (% DRC) en las plántulas de semillas de cebada variedad himalaya



CURVA ESTANDARD DE LA SOLUCION DE L-CISTEINA 0.001 M

FIGURA N°12

CURVA ESTANDARD DE SOLUCION DE CISTEINA 0.001 M

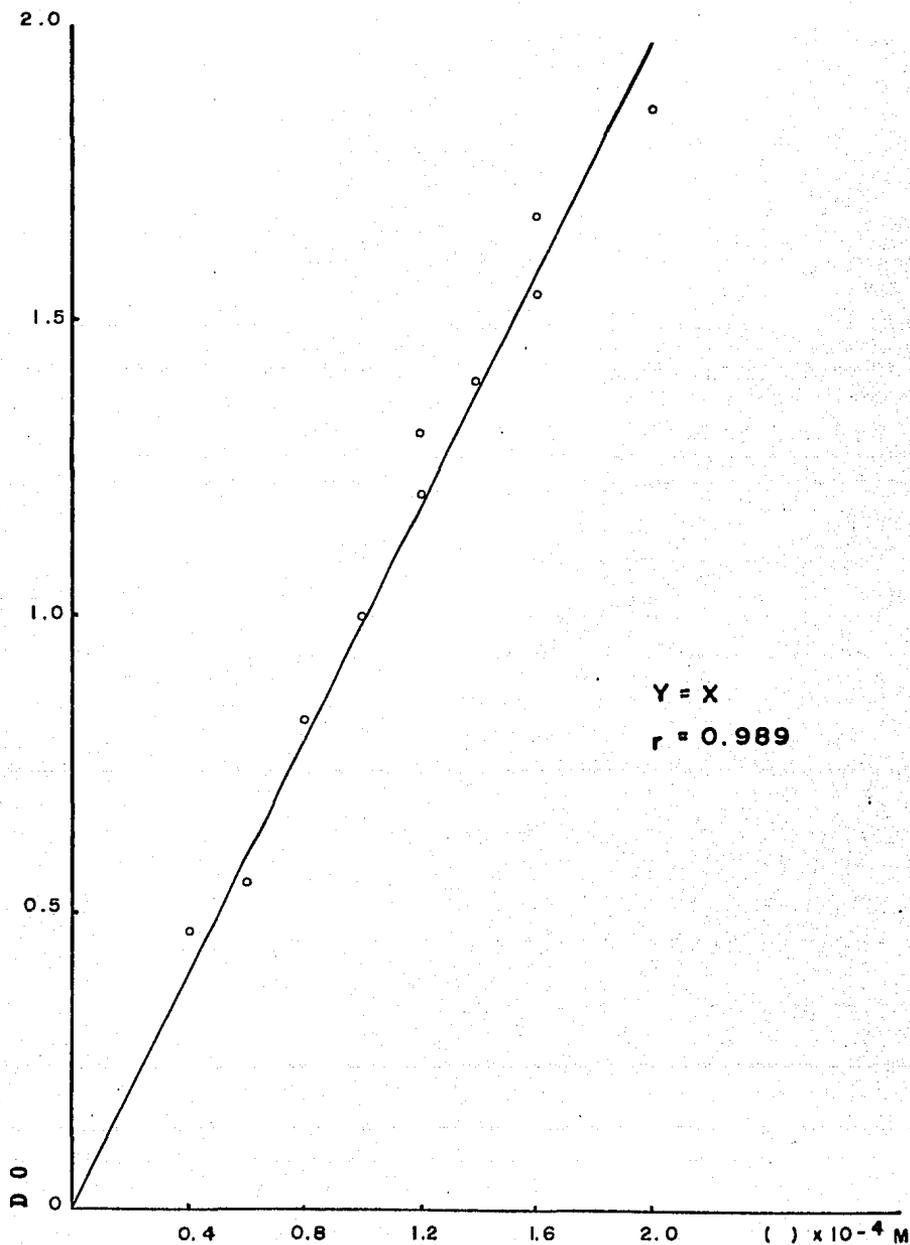


FIGURA N°13

TABLA 10 Valores promedio de 3 lecturas de densidad óptica (D.O.) y de concentración de grupos SH ($\times 10^{-4}$ M) de soluciones de AET y L-CISTEINA obtenidas cada 10 minutos en el espectrofotómetro.

A E T			L - CISTEINA		
D.O.	Tiempo (min)	Conc. Grupos SH $\times 10^{-4}$ M	D.O.	Tiempo (min)	Conc. Grupos SH $\times 10^{-4}$ M
1.10	0	1.10	1.245	0	1.110
1.05	10	1.05	1.260	10	1.123
1.046	20	1.05	1.245	20	1.110
1.05	30	1.05	1.225	30	1.092
0.976	40	0.98	1.250	40	1.114
1.02	50	1.02	1.255	50	1.118
1.06	60	1.06	1.245	60	1.110

CURVA PROMEDIO DE AET

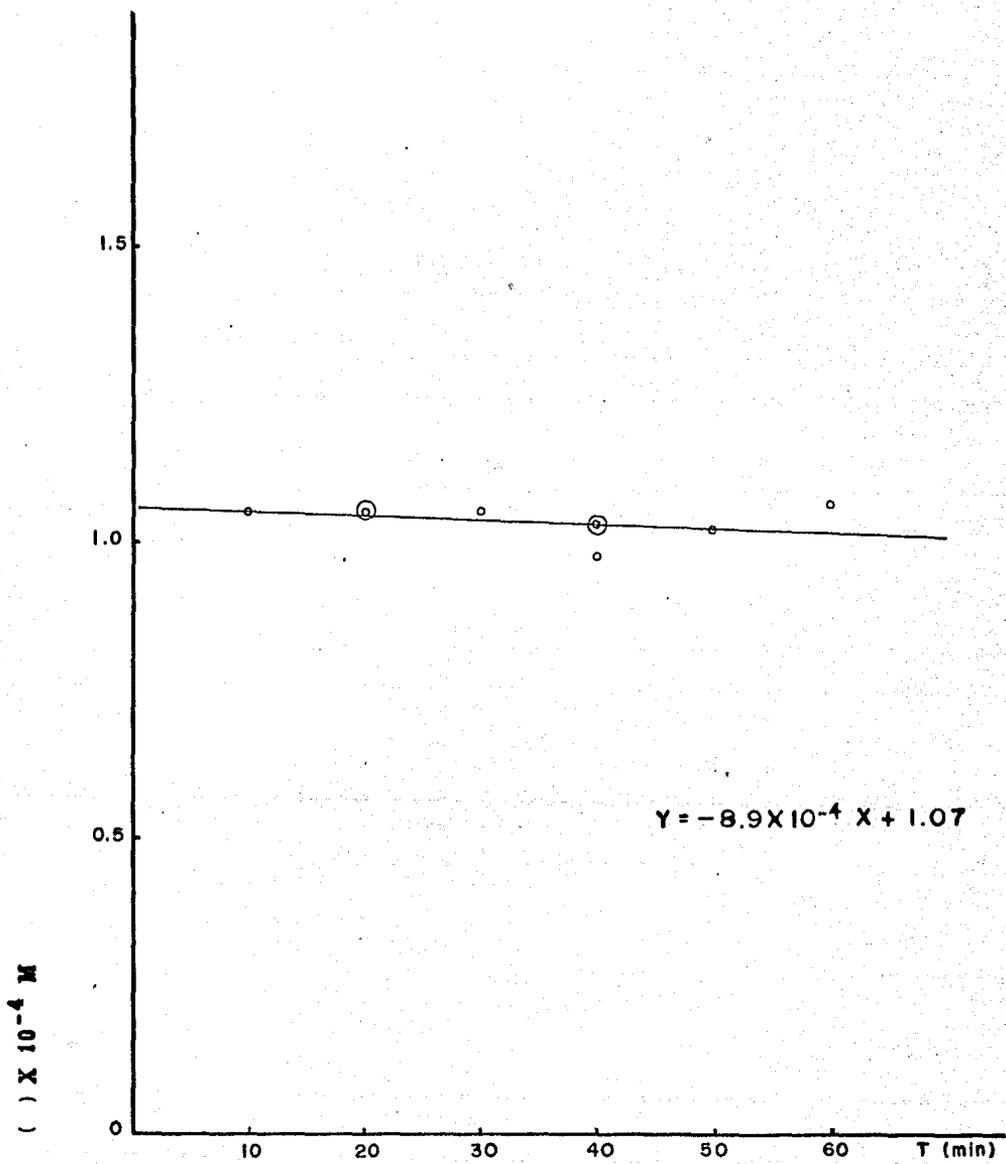


FIGURA N°14

CURVA PROMEDIO DE LA CISTEINA

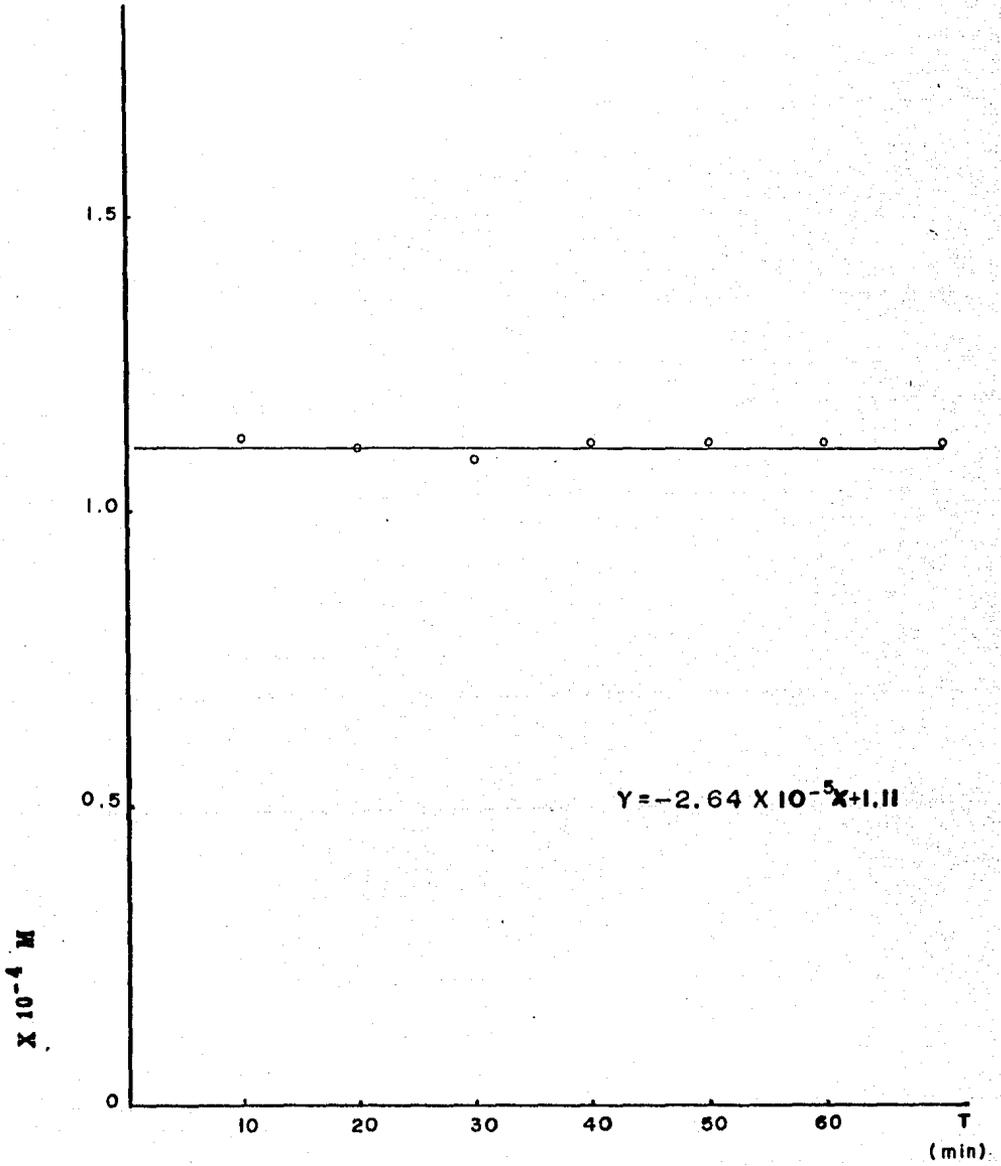


FIGURA N° 15

tratadas durante una hora con agua, AET o L-cisteína, antes de ser irradiadas con bajas dosis (10, 30, 50, 75, 100, 125, 150 y 200 Kr) o altas dosis (100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400 y 1600 Kr). Lo anterior se concluyó tomando como base los datos obtenidos durante las 3 repeticiones y la media de las 100 observaciones realizadas en cada una de ellas. (Tablas 11 y 12).

En la Tabla 13 se presenta el promedio de los tres experimentos como porcentaje en relación a los lotes procesados con agua de las plántulas tratadas con AET y L-cisteína antes de ser irradiadas a diferentes dosis bajas de rayos gamma. De estos resultados y para determinar la acción de los tratamientos con agua, AET o L-cisteína a las diferentes dosis de rayos gamma, a partir de las medias de la Tabla 11, se generó un análisis de la varianza para un diseño factorial de 3×9 con 3 repeticiones (Tabla 14). Los valores muestran una diferencia significativa al 5% para el tratamiento con los protectores, al tiempo que se nota una alta diferencia en relación a las dosis de radiación usadas. Por otra parte, la interacción entre protectores y dosis no fue significativa.

El crecimiento de la plántula se lleva a cabo mediante 2 procesos : la división y elongación celular, teniendo el primero una gran influencia en el aumento de su longitud (Cerçek et al., 1971). También se considera que las auxinas precursoras de la división celular son más radiosensibles en relación a las que preceden la elongación de las células. Al detectarse los efectos de los tratamientos con los protectores y las dosis usadas, se realizó la prueba de Tukey para obtener el contraste múltiple entre las medias a fin de determinar las diferencias y semejanzas entre las distintas dosis y los diferentes tratamientos. En relación a las medias obtenidas para las diferentes dosis, se obtuvo que los valores del testigo, 10, 30 y 50 Kr disminuyeron significativamente al incrementarse la radiación, mientras que fueron semejantes las medias obtenidas al aplicar las dosis de 75, 100, 125, 150 y 200 Kr; aunque resultaron menores que las medias anteriores. (Tabla 15). Esta respuesta fue debida a la interacción del daño cromosómico y a la disminución de

TABLA No. 11 Media de tres repeticiones* de la longitud de la plántula de semillas de cebada Var.Himalaya que muestran el efecto del tratamiento de una hora de AGUA, AET y L-CISTEINA antes de la irradiación GAMMA con 60Co.

DOSIS (kr)	A G U A	A E T	L - CISTEINA
0	133.81	120.84	128.33
	125.50	131.52	131.65
	126.90	135.51	126.21
10	98.71	98.31	105.71
	97.02	104.52	122.52
	100.10	102.84	102.62
30	59.81	61.36	61.44
	61.02	59.52	63.75
	60.82	63.64	62.82
50	28.32	28.17	28.12
	25.92	30.92	32.01
	19.54	29.20	28.82
75	14.82	12.42	15.71
	12.72	20.72	15.04
	11.30	12.45	13.16
100	10.90	13.91	13.62
	12.62	11.34	9.54
	11.61	11.82	10.48
125	12.21	12.31	10.42
	10.84	11.24	9.36
	9.45	14.43	11.21
150	10.72	10.01	10.01
	9.74	9.27	11.82
	9.70	11.04	9.27
200	12.71	11.01	12.21
	8.44	9.72	9.73
	9.50	13.54	11.52

* EN CADA REPETICION SE MIDIERON 100 OBSERVACIONES.

TABLA No 12 MEDIA DE TRES REPETICIONES* DE LA LONGITUD DE LA PLANTULA, COLEOPTILO (mm) Y PORCENTAJE DE GERMINADAS DE SEMILLAS DE CEBADA VAR. HIMALAYA QUE MUESTRAN EL EFECTO DEL TRATAMIENTO DE UNA HORA DE AGUA, AET Y -L-CISTEINA ANTES DE LA IRRADIACION CON DIFERENTES DOSIS ALTAS DE RAYOS GAMMA DE 60Co.

Dosis	A G U A			A E T			L - CISTEINA.		
	Long.plántula (mm)	Long.coleóptilo (mm)	Germinación	Long.plántula (mm)	Long.coleóptilo (mm)	Germinación.	Long.plántula (mm)	Long.coleóptilo (mm)	Germinación.
0	153	65	100	157	67	99	153	65	100
	155	66	99	157	66	100	157	67	99
	155	64	100	155	66	100	156	66	100
100	10	16	96	13	22	96	11	25	100
	10	15	98	10	24	99	11	24	100
	10	16	96	11	24	100	12	20	100
200	8	21	98	11	29	98	10	28	99
	9	20	97	10	28	100	11	27	98
	10	19	96	12	28	100	11	28	100
400	12	23	97	12	29	99	10	29	97
	11	23	96	11	29	99	12	29	100
	11	24	96	11	31	98	10	30	100
600	14	18	87	14	22	97	12	22	100
	13	18	85	12	23	99	11	22	99
	13	18	85	13	23	100	11	23	100
800	8	9	42	13	19	86	14	22	70
	9	8	51	13	22	77	13	21	76
	9	9	49	12	22	80	13	19	75
1000	8	8	33	12	12	70	9	10	70
	8	8	30	11	12	65	8	9	68
	8	8	35	11	12	71	9	9	67
1200	0	0	0	10	8	42	9	9	33
	0	0	0	11	9	49	9	9	31
	0	0	0	11	10	50	9	9	39
1400	0	0	0	9	9	8	9	8	4
	0	0	0	10	10	6	9	9	5
	0	0	0	10	9	4	9	9	6
1600	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* EN CADA REPETICION SE MIDIERON 100 OBSERVACIONES.

TABLA No 13 Promedio de tres experimentos* de la longitud del coleóptilo, plántula y germinación presentados como porcentaje del promedio de los lotes tratados con agua en cada dosis para las semillas de cebada tratadas con AET y L-cisteína, antes de la irradiación gamma del ^{60}Co .

DOSIS(Kr)	COLEOPTILO		PLANTULA		GERMINACION	
	AET	L-CIST	AET	L-CIST	AET	L-CIST
0	99.4	100.2	100.5	100.0	103.2	102.1
10	97.0	101.9	103.3	111.6	102.1	102.1
30	148.0**	122.2**	101.7	103.5	101.1	101.1
50	125.1**	110.0	119.5	120.3	99.0	98.0
75	126.4**	119.5**	117.8	113.2	100.0	100.0
100	118.8**	123.2**	105.1	95.7	102.1	98.0
125	135.7**	126.8**	116.7	95.4	98.0	98.0
150	142.9**	157.1**	101.0	103.0	98.0	100.0
200	145.8**	162.7**	111.8	108.9	102.1	100.0

* EN CADA EXPERIMENTO SE OBTUVIERON 100 OBSERVACIONES.

** LONGITUDES DE COLEOPTILOS QUE RESULTARON DIFERENTES SIGNIFICATIVAMENTE AL 5% EN RELACION AL CONTROL.

TABLA No 14 ANALISIS DE LA VARIANZA FACTORIAL DE 3 x 9 CON 3 REPETICIONES - PARA UN DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR PARA DETERMINAR EL EFECTO SOBRE LA ALTURA- DE LA PLANTULA (mm) DE SEMILLAS DE CEBADA TRATADAS UNA HORA CON AGUA, AET y --- L-CISTEINA (I FACTOR) ANTES DE LA IRRADIACION CON DIFERENTES DOSIS DE RAYOS - GAMMA DE 60Co. (II FACTOR).

FUENTE DE VARIACION	S C	GL	CM	F exp.
TRATAMIENTOS (AGUA,AET y L-Cist.)	71.51	2	35.75	3.07 +
DOSIS (1)	149337.43	8	18667.18	1601.74 **
TRATAMIENTO X DOSIS	233.38	16	14.59	1.25 NS
ERROR	629.33	54	11.65	
TOTAL	150271.65	80		

NS DIFERENCIA NO SIGNIFICATIVA

+ DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5%

** DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA.

(1) = 0, 10, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 200 Kr.

TABLA No 15 PRUEBA DE TUKEY PARA COMPARACION MULTIPLE DE MEDIAS DE LA ALTURA DE LAS PLANTULAS (mm) DE SEMILLAS DE CEBADA TRATADAS CON AGUA, AET y L-CISTEINA ANTES DE LA IRRADIACION A DIFERENTES DOSIS DE RAYOS GAMMA DE ^{60}Co .

DOSIS	\bar{x} (ALTURA mm)
1	129.11 —
2	103.78 —
3	61.67 —
4	27.89 —
5	14.22
6	11.88
9	11.11
7	11.00
8	10.22

DOSIS 1-0, 2-10, 3-30, 4-50, 5-75, 6-100, 7-125, 8-150, 9-200 Kr.

— | — DIFERENCIA NO SIGNIFICATIVA AL 5%.

las divisiones celulares, lo que tuvo un efecto determinante en las dosis de 75 a 200 Kr (Schwartz y Bay 1956). No se encontró diferencia entre las medias obtenidas para cada dosis en los lotes tratados con agua, AET y L-cisteína, lo que demuestra que no hubo protección a nivel de la división celular. Estos resultados no están de acuerdo con la protección brindada por el AET en los cultivos de células L-5 de mamífero donde Kawasaki (1977), encuentra protección por bloqueo de la fase G_2 del ciclo celular. Este autor encuentra una recuperación del índice mitótico iniciándose 2 horas después de la irradiación de las células a 200 rads; probablemente porque el protector reacciona con una sustancia denominada "blanco" relacionada con el retraso mitótico, o con un radical libre específico que inactiva esa sustancia. En nuestro sistema no se obtuvo protección en virtud de que la sustancia "blanco" relacionada con el retraso mitótico fue lábil, en rangos de dosis mayores, entre 10 y 200 Kr.

Kak en 1977, irradiando semillas de cebada pretratadas con L-cisteína 16 hrs antes de la irradiación a 30 Kr con rayos X encuentra un 63% de protección manifestada en la altura de la plántula en comparación al testigo. En nuestros resultados no obtuvimos protección al nivel de la plántula para esta dosis, lo que probablemente pueda deberse a las diferentes condiciones experimentales de ambas investigaciones.

Los resultados para la longitud de la plántula durante los experimentos con dosis altas, así como el % RC y el % DRC se muestran en las Tablas 12, 16 y Figura 16.

Los valores indican una fuerte caída de la media a partir de la dosis de 100 Kr, en relación al valor del grupo testigo.

De las medias dadas en la Tabla 12 se generó un análisis de varianza para un diseño factorial desbalanceado de 3×9 con 3 repeticiones; debido a que en el lote tratado con agua de la dosis de 1200 Kr en adelante, no hubo germinación de las semillas. Para los lotes tratados ésto sucedió en la dosis de 1600 Kr, donde se observa una notoria

LONGITUD DE LA PLANTULA COMO PORCENTAJE DEL CONTROL

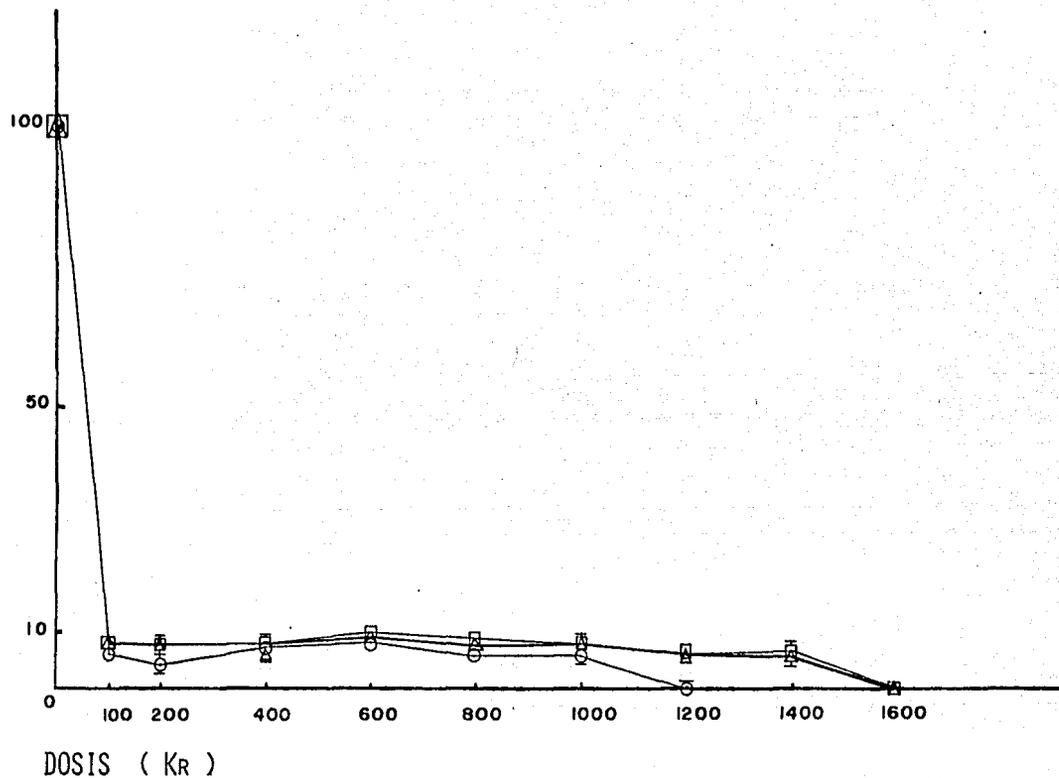


Fig.16. LONGITUD DE LAS PLANTULAS (COMO PORCENTAJE DEL CONTROL) DE LAS SEMILLAS DE CEBADA TRATADAS CON AGUA, AET Y L-CISTEINA UNA HORA ANTES DE LA IRRADIACIÓN CON RAYOS GAMMA DE ^{60}Co .

- TRATAMIENTO CON AGUA
- TRATAMIENTO CON AET
- △ TRATAMIENTO CON L-CISTEINA
- I ERROR ESTANDAR

TABLA No 16 CRECIMIENTO, PORCENTAJE RELACIONADO AL CONTROL (% RC) Y PORCENTAJE DE DAÑO RELACIONADO AL CONTROL (% DRC) DE LA MEDIA DE TRES EXPERIMENTOS * DE LA LONGITUD DE LA PLANTULA (mm) DE SEMILLAS DE CEBADA VAR. HIMALAYA TRATADAS CON AGUA, AET Y L-CISTEINA UNA HORA ANTES DE LA IRRADIACION A DIFERENTES DOSIS ALTAS DE RAYOS GAMMA DE 60Co.

Dosis	A G U A			A E T			L - CISTEINA		
	\bar{x}	% RC	% DRC	\bar{x}	% RC	% DRC	\bar{x}	% RC	% DRC
0	154.33	100.0	—	156.33	101.30	—	155.33	100.65	—
100	10.00	0.65	99.35	11.33	7.34	92.66	11.33	7.34	92.66
200	9.00	5.83	94.17	11.00 ^{••}	7.13	92.87	10.66 ^{••}	6.91	93.09
400	11.33	7.34	92.66	11.33	7.34	92.66	10.66	6.91	93.09
600	13.33	8.64	91.36	13.00	8.43	91.57	11.33	7.34	92.66
800	8.66	5.61	91.34	12.66 ^{••}	8.20	91.80	13.33 ^{••}	8.64	91.36
1000	8.00	5.18	94.82	12.00 ^{••}	7.78	92.22	8.67	5.62	94.38
1200	0	0	0	10.66 ^{••}	6.91	93.09	9.0 ^{••}	5.83	94.17
1400	0	0	0	9.66 ^{••}	6.26	93.74	9.0 ^{••}	5.83	94.17
1600	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* EN CADA EXPERIMENTO SE MIDIERON 100 OBSERVACIONES.

•• Longitudes diferentes significativamente al 5% en relación al control.

diferencia entre tratamientos y dosis (Tabla 17). En la interacción de ambos, la diferencia fue al 5%. Al aplicar la prueba de Tukey para contraste múltiple de medias, se obtuvieron los resultados que se muestran en las Tablas 18 y 19 donde se analizan diferencias significativas entre el lote tratado con agua y los protegidos con AET ó L-cisteína, con las dosis de 200, 800, 1000, 1200 y 1400 Kr, mientras que para las otras dosis los valores de las medias fueron semejantes.

Wright (1961 y 1966), muestra que las semillas irradiadas con radiaciones ionizantes entre 100 y 200 Kr se inhibe la división celular y que el crecimiento del coleóptilo se lleva a cabo por elongación celular. Schwartz (1954) y Schwartz y Bay (1956), obtienen una recuperación del crecimiento en la plántula de maíz irradiada a altas dosis, asociándolo a un proceso de elongación celular, considerando los autores que es te efecto en la plántula depende de la interacción del daño cromosómico y de la disminución de la tasa de divisiones celulares. Los resultados muestran una ligera recuperación del crecimiento en la plántula de las semillas tratadas con AET o con L-cisteína lo que hace suponer que estas sustancias favorecieron de alguna manera la síntesis de las auxinas involucradas en la elongación celular; como observó Muir et al., (1974), en relación al aumento de la síntesis de la auxina, ác. indolacético, por el efecto de dosis altas de radiación con irradiaciones mayores a 680 Kr.

Los resultados indican que el incremento del crecimiento de la plántula a dosis de 800, 1000, 1200 y 1400 Kr, pudo haberse favorecido por el tratamiento con la AET o la L-cisteína, cuyas aplicaciones pro picieron la síntesis de esta auxina.

2. Determinación del efecto protector de la AET y la L-cisteína en los coleóptilos.

Se evaluó el crecimiento, % RC y % DRC en los coleóptilos de

TABLA No 17 ANALISIS DE LA VARIANZA FACTORIAL DESBALANCEADO DE 3 X 9 - CON TRES REPETICIONES ⁺ PARA UN DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR PARA DETERMINAR EL EFECTO SOBRE LA ALTURA DE LA PLANTULA (mm) DE SEMILLAS DE CEBADA-TRATADAS UNA HORA CON AGUA, AET Y L-CISTEINA (I FACTOR) ANTES DE LA IRRA--DIACION CON DIFERENTES DOSIS ALTAS DE RAYOS GAMMA DE 60Co. (II FACTOR).

FUENTES DE VARIACION	SC	GL	CM	F exp
Tratamiento (AGUA, AET Y L-CISTEINA)	40.15	2	20.07	28.41 **
Dosis (I)	165515.83	8	20689.48	29277.39 **
Tratamiento X Dosis	54.69	14	3.91	5.53 *
Error	35.33	50	0.71	
T O T A L	165645.99	74		

* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5%

** DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA

(I) = 0, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 y 1400 Kr.

+ EN CADA REPETICION SE TABULARON 100 OBSERVACIONES.

TABLA No 18 PRUEBA DE TUKEY PARA COMPARACION MULTIPLE DE MEDIAS DE LA ALTURA DE LAS PLANTULAS
 () DE SEMILLAS DE CEBADA TRATADAS UNA HORA CON AGUA, AET y L-CISTEINA ANTES DE LA IRRADIACION -
 A DIFERENTES DOSIS ALTAS DE RAYOS GAMMA DE 60Co.

TRATAMIENTOS

A G U A		A E T		L - CISTEINA	
1	154.33 —	1	156.33 —	1	155.33 —
5	13.33 T	5	13.00 T	6	13.33 T
4	11.33 T	6	12.67	2	11.33 T
2	10.00 T	7	12.00 T	5	11.33 T
3	9.00	2	11.33 T	3	10.67 T
6	8.67	4	11.33 T	4	10.67 T
7	8.00 T	3	11.00 T	8	9.00
8	-	8	10.67 T	9	9.00
9	-	9	9.67 T	7	8.67 T
10	-	10	-	10	-

Dosis 1-0, 2-100, 3-200, 4-400, 5-600, 6-800, 7-1000, 8-1200, 9-1400, 10-1600 Kr.

— DIFERENCIAS NO SIGNIFICATIVAS AL 5%.

TABLA No 19 Prueba de Tukey para comparación múltiple de medias de la altura de las plántulas (mm) de semillas de cebadas tratadas una hora con AGUA, AET y L-CISTEINA antes de la irradiación a diferentes dosis altas de rayos gamma de ^{60}Co .
 DOSIS (Kr)

0	100	200	400	600	800	1000	1200	1400
T ₂ 156.33	T ₂ 11.33	T ₂ 11.00	T ₁ 11.33	T ₁ 13.33	T ₃ 13.33	T ₂ 12.00	T ₂ 10.67	T ₂ 9.67
T ₃ 155.33	T ₃ 11.33	T ₃ 10.67	T ₂ 11.33	T ₂ 13.00	T ₂ 12.67	T ₃ 8.67	T ₃ 9.0	T ₃ 9.0
T ₁ 154.33	T ₁ 10.00	T ₁ 9.00	T ₃ 10.67	T ₃ 11.33	T ₁ 8.67	T ₁ 8.0	T ₁ 0	T ₁ 0

TRATAMIENTOS T₁ AGUA,
 T₂ AET y
 T₃ L-CISTEINA.



DIFERENCIA NO SIGNIFICATIVA AL 5%.

semillas de cebada variedad himalaya, con base en las medias de 3 repeticiones, con 100 observaciones cada una.

En la Tabla 20, se presentan las medias de los 3 experimentos y en la número 21, el % RC y el % DRC de los coleóptilos de semillas tratadas durante una hora con agua AET o L-cisteína, antes de ser irradiadas a dosis bajas de rayos gamma.

En esta Tabla se observa una caída en las medias al incrementarse las dosis de radiación; notándose también que las medias obtenidas para los grupos tratados con la AET o la L-cisteína, fueron mayores en relación a los tratados con agua. Para determinar la acción de los tratamientos con agua AET o L-cisteína, así como con las diferentes dosis de rayos gamma, se realizó un análisis de varianza para un diseño factorial de 3 x 9 con 3 repeticiones.

Los resultados muestran una diferencia altamente significativa para los tratamientos con las sustancias agua, AET o L-cisteína y para dosis de radiación, así como para la interacción entre los 2 factores. Los resultados se muestran en la Tabla 22. Debido a que la interacción entre los factores resultó significativa, se efectuó la prueba de contrastes múltiples de Tukey y en cada dosis para comparar los tres tratamientos y en cada tratamiento para comparar las nueve dosis y de esta forma determinar las diferencias entre tratamientos para cada dosis y las diferencias entre las distintas dosis para cada tratamiento. Los resultados se muestran en las Tablas 23 y 24. Como puede analizarse, se obtuvo protección en las dosis de 30, 125, 150 y 200 Kr, en virtud de que las medias obtenidas para los tratamientos con AET o L-cisteína fueron mayores a las del lote tratado con agua: los valores se indican en la Tabla 25, donde también puede analizarse que el % DRC en las dosis de 30, 125, 150 y 200 para los lotes tratados con AET o L-cisteína fueron menores en relación al lote tratado con agua.

El crecimiento del coleóptilo se debe a 2 procesos: divisio-

TABLA No20 Media de tres repeticiones* de la longitud del COLEOPTILO de semillas de cebada var. Himalaya tratadas una hora con AGUA, AET y L-CISTEINA antes de la irradiación GAMMA de 60Co.

DOSIS (Kr)	A G U A	A E T	L - CISTEINA
0	68.21	61.16	64.54
	63.62	67.84	60.11
	60.12	61.72	67.50
10	62.10	60.51	63.41
	65.34	66.90	66.02
	62.44	58.56	64.06
30	24.52	35.24	28.26
	25.33	30.72	24.61
	16.41	32.80	28.22
50	18.51	21.12	18.91
	16.68	23.64	19.16
	16.14	19.46	18.50
75	18.62	22.80	21.04
	18.87	21.64	22.32
	14.82	21.92	19.27
100	18.74	21.40	21.92
	17.50	21.43	25.73
	18.12	21.58	20.40
125	17.81	19.72	20.62
	15.45	25.04	23.81
	17.22	23.81	19.44
150	13.80	28.42	25.64
	14.81	21.95	24.35
	20.31	22.36	25.63
200	17.81	26.21	28.84
	20.36	25.61	26.92
	15.04	25.64	30.62

* EN CADA REPETICION SE OBTUVIERON 100 OBSERVACIONES.

TABLA No 21 CRECIMIENTO, PORCENTAJE RELACIONADO AL CONTROL (% RC) Y PORCENTAJE DE DAÑO RELACIONADO AL CONTROL (% DRC) DE LA MEDIA DE TRES EXPERIMENTOS • DE LA LONGITUD DEL COLEOPTILO DE SEMILLAS DE CEBADA - VAR. HIMALAYA TRATADAS CON AGUA, AET Y L-CISTEINA UNA HORA ANTES DE LA IRRADIACION GAMMA CON 60Co.

Dosis	A G U A			A E T			L-CISTEINA		
	\bar{x}	% RC	% DRC	\bar{x}	% RC	% DRC	\bar{x}	% RC	% DRC
0	64.00	100.00	0	63.67	99.48	0.52	64.33	100.52	—
10	63.00	98.44	1.56	62.33	97.39	2.61	64.33	100.52	—
30	22.00	34.38	65.62	33.00 ^{••}	51.56	48.44	27.00 ^{••}	42.19	57.81
50	17.33	27.08	72.92	21.33	33.33	66.67	19.00	29.69	70.31
75	17.67	27.61	72.39	22.33	34.89	65.11	20.67	32.30	67.70
100	18.33	28.64	71.36	21.33	33.33	66.67	22.67	35.42	64.58
125	16.67	26.05	73.95	23.00 ^{••}	35.94	64.06	21.33 ^{••}	33.33	66.67
150	16.33	25.52	74.48	24.00 ^{••}	37.50	62.50	26.33 ^{••}	41.14	58.86
200	17.67	27.61	72.39	26.00 ^{••}	40.63	59.37	29.00 ^{••}	45.31	54.69

* EN CADA EXPERIMENTO SE MIDIERON 100 OBSERVACIONES.

•• LONGITUDES DE LOS COLEOPTILOS QUE RESULTARON DIFERENTES SIGNIFICATIVAMENTE AL 5% EN RELACION AL CONTROL.

TABLA No. 22 ANALISIS DE LA VARIANZA FACTORIAL DE 3 x 9 CON 3 REPETICIONES - PARA UN DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR PARA DETERMINAR EL EFECTO SOBRE LA LONGITUD DEL COLEOPTILO (mm) DE SEMILLAS DE CEBADA TRATADAS UNA HORA CON AGUA, AET Y L-CISTEINA (I FACTOR) ANTES DE LA IRRADIACION CON DIFERENTES DOSIS DE RAYOS GAMMA DE ^{60}Co . (II FACTOR).

FUENTE DE VARIACION	S C	GL	C M	F exp.
TRATAMIENTOS (AGUA, AET Y L-CIST.)	408.62	2	204.31	29.87**
DOSIS (1)	24625.14	8	3078.14	450.05**
TRATAMIENTO X DOSIS	303.38	16	18.96	2.77*
ERROR	369.33	54	6.84	
TOTAL	25706.47	80		

* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 1%

** DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA.

(1) = 0, 10, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 200 Kr.

TABLA No 23 PRUEBA DE TUKEY PARA COMPARACION MULTIPLE DE MEDIAS DE LA ALTURA DE LOS COLEOPTILOS:
 (mm) DE SEMILLAS DE CEBADA TRATADAS CON AGUA, AET Y L-CISTEINA ANTES DE LA IRRADIACION A DIFERENTES -
 DOSIS DE RAYOS GAMMA DE 60Co.

T R A T A M I E N T O

A G U A		A E T		L-CISTEINA	
1	64.00	1	63.67	1	64.33
2	63.00	2	62.33	2	64.33
3	22.00	3	33.00	9	29.00
6	18.33	9	26.00	3	27.00
5	17.67	8	24.00	8	26.33
9	17.67	7	23.00	6	22.67
4	17.33	5	22.33	7	21.33
7	16.66	4	21.33	5	20.67
8	16.33	6	21.33	4	19.00

Dosis 1-0, 2-10, 3-30, 4-50, 5-75, 6-100, 7-125, 8-150, 9-200 Kr


 DIFERENCIA NO SIGNIFICATIVA AL 5%

TABLA No 24 PRUEBA DE TUKEY PARA COMPARACION MULTIPLE DE MEDIAS DE LA ALTURA DE LOS COLEOPTILOS (mm) DE SEMILLAS DE CEBADA TRATADAS CON AGUA, AET Y L-CISTEINA ANTES DE LA IRRADIACION A DIFERENTES DOSIS DE RAYOS GAMMA DE 60Co.

Dosis (Kr).

0	10	30	50	75	100	125	150	200
T ₃ -64.33	T ₃ -64.33	T ₂ -33.00 - T ₂ -21.33	T ₂ -22.33	T ₃ -22.67	T ₂ -23.00	T ₃ -26.33	T ₃ -29.00	
T ₁ -64.00	T ₁ -63.00	T ₃ -27.00 - T ₃ -19.00	T ₃ -20.67	T ₂ -21.33	T ₃ -21.33	T ₂ -24.00	T ₂ -26.00	
T ₂ -63.66	T ₂ -62.33	T ₁ -22.00 - T ₁ -17.33	T ₁ -17.67	T ₁ -18.33	T ₁ -16.67	T ₁ -16.33	T ₁ -17.67	

TRATAMIENTOS T₁ = AGUA

T₂ = AET

T₃ = L-CISTEINA.

— = DIFERENCIA NO SIGNIFICATIVA AL 5%.

nes y elongaciones celulares. Liptay y Davidson (1972), concluyen que el crecimiento de los coleóptilos en semillas irradiadas con dosis que inhiben la división celular, se mantiene por elongación celular.

Las dosis que inhiben las divisiones celulares son de 100 y 200 Kr (Haber y Luippold 1960, Haber et al., 1961, Liptay y Davidson 1972, Palomino et al., 1979).

Se ha propuesto que las radiaciones tienen un efecto estimulante en la elongación celular que ocurre sin la intervención de la división celular y sin la síntesis del ADN, pero con la participación de otros procesos como son síntesis de ARN y de las proteínas (Haber et al., 1961, Wright 1961, Haber 1962).

Se ha considerado a las auxinas como causantes del proceso de la elongación celular (Muir 1974). El hecho de que la elongación se efectúe aún después de dosis altas de radiación, podría explicarse sobre la base de que el proceso de producción de auxinas no resulta afectado a ese nivel de dosis.

En los resultados, el encontrar protección para la dosis de 30 Kr, hace suponer que la AET o la L-cisteína protegieron ambos procesos celulares, la división y la elongación celular. Los resultados son congruentes con los señalados por Kak (1977), que reporta protección en la plántula de semillas de cebada variedad himalaya, tratada con L-cisteína, 16 horas antes de irradiarlas con rayos X.

La acción protectora del AET o la L-cisteína ha sido ampliamente probada, tanto a nivel radioquímico—capturando radicales libres altamente reactivos y dañinos a biomoléculas, enzimas, auxinas, ARN y aún ADN (Bacq y Alexander 1961)—o bien debido a la formación de disulfuros con las moléculas blanco como histonas, proteínas de reparación, etc. (Eldjarn y Phil 1958).

Hernádi et al., (1969), probaron en E. coli que la aplicación de la L-cisteína antes de la irradiación cesaba la síntesis de ARN y proteínas mientras que la del ADN continuaba su síntesis original, hecho que se asocia a una mayor radioresistencia.

Estos datos sugieren, que la protección brindada por AET o la L-cisteína en las dosis 125, 150 y 200 Kr, favoreció la síntesis de los precursores de las auxinas que determinan la elongación celular.

En la Tabla 12 se presenta la media de 3 experimentos con 100 observaciones para cada uno, en la Tabla 25, se presenta el % RC y el % DRC de los coleóptilos de semillas de cebada tratadas una hora con agua, AET o L-cisteína, antes de irradiarlas con dosis altas de rayos gamma.

Como se analiza en estas tablas y en la Figura 17, los valores de las medias disminuyen en la dosis de 100 Kr. En las de 200 y 400 Kr los valores de las medias se incrementaron y a partir de 600 Kr las medias disminuyen, a medida que aumentan las dosis de radiación.

En el lote tratado con agua la supervivencia se mantiene aún en dosis de 1000 Kr y en los tratados con la AET o la L-cisteína hasta 1400 Kr.

Este comportamiento muestra una recuperación en el crecimiento del coleóptilo, resultante de semillas de cebada irradiadas con dosis mayores de 100 Kr de radiaciones de bajo LET, como lo han reportado diversos autores (Schwartz y Bay 1956, Moutschen 1959, Palomino et al., 1979). Este fenómeno es debido a la mayor resistencia de la elongación celular a dosis altas de radiación (Moutchen 1959 y Cercek et al., 1967). Este efecto se ha relacionado directamente con las auxinas, como es el caso del ác. indolacético causante del proceso de elongación.

Como para algunos tratamientos se perdieron todas las semillas,

TABLA No 25 CRECIMIENTO, PORCENTAJE RELACIONADO AL CONTROL (% RC) Y PORCENTAJE DE DAÑO RELACIONADO AL CONTROL (% DRC) DE LA MEDIA DE TRES EXPERIMENTOS DE LA LONGITUD DEL COLEOPTILO (mm) DE SEMILLAS DE CEBADA VAR. HI MALAYA TRATADAS CON AGUA, AET Y L-CISTEINA, UNA HORA ANTES DE LA IRRADIACION A DIFERENTES DOSIS ALTAS DE RAYOS GAMMA DE 60Co.

Dosis	A G U A			A E T			L - CISTEINA		
	\bar{x}	% R C	% D R C	\bar{x}	% RC	% DRC	\bar{x}	% R C	% D R C
0	65.0	100	0	66.33	102.01	—	66.0	101.54	—
100	15.67	24.11	75.89	23.33	35.89	64.11	23.0	35.38	64.62
200	20.0	30.77	69.23	28.33	43.58	56.42	27.67	42.57	57.43
400	23.33	35.89	64.11	29.67	45.65	54.35	29.33	45.12	54.88
600	18.00	27.69	72.31	22.67	34.88	65.12	22.33	34.35	65.65
800	8.67	13.34	86.66	21.0	32.31	67.69	20.67	31.80	68.20
1000	8.0	12.31	87.69	11.33	17.43	82.57	9.33	14.35	85.65
1200	0	0	0	9.0	13.85	86.15	9.0	13.85	86.15
1400	0	0	0	9.33	14.35	85.65	8.67	13.34	86.66
1600	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* EN CADA EXPERIMENTO SE MIDIERON 100 OBSERVACIONES. ●● LONGITUDES DE LOS COLEOPTILOS QUE RESULTARON DIFERENTES SIGNIFICATIVAMENTE AL 5% EN RELACION AL CONTROL.

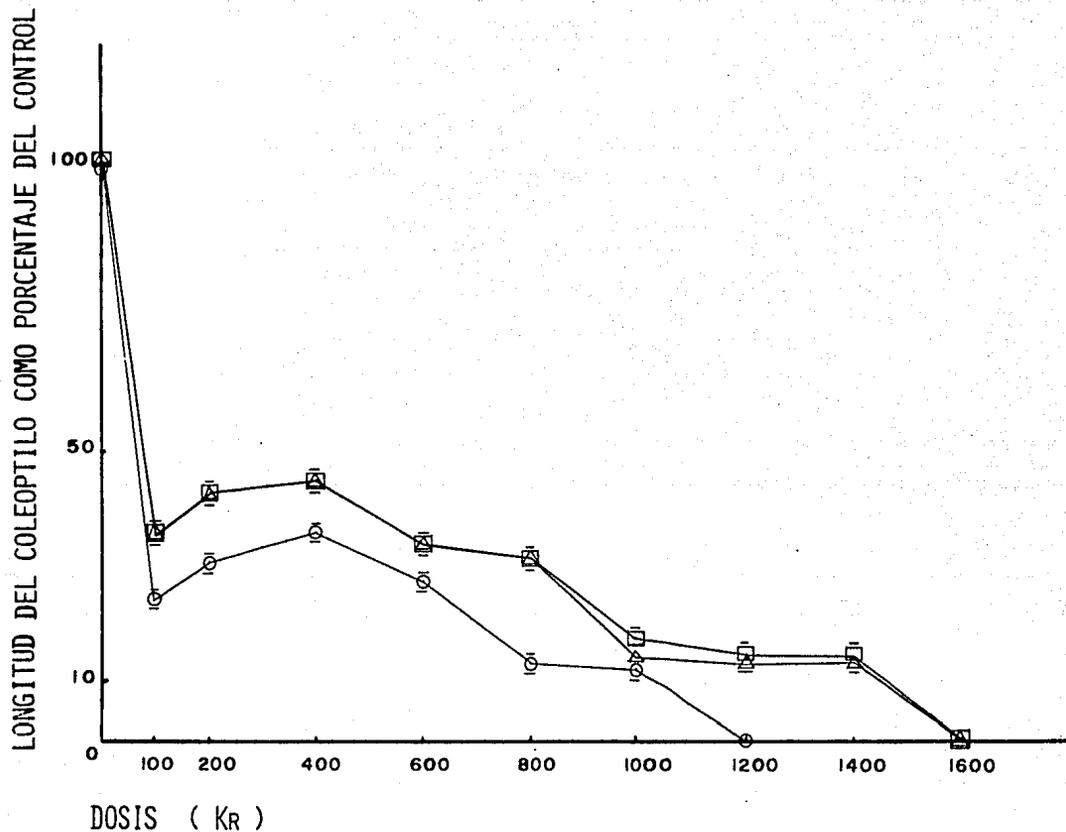


FIG.17. LONGITUD DEL COLEOPTILO (COMO PORCENTAJE DEL CONTROL) DE LAS SEMILLAS DE CEBADA TRATADAS CON AGUA, AET Y L-CISTEINA UNA HORA ANTES DE LA IRRADIACIÓN A DIFERENTES DOSIS ALTAS DE RAYOS GAMMA DE ^{60}Co .

- TRATAMIENTO CON AGUA
- TRATAMIENTO CON AET
- △ TRATAMIENTO CON L-CISTEINA
- I ERROR ESTANDAR

para el análisis estadístico se utilizó un análisis de varianza para un diseño factorial desbalanceado completamente al azar (Tabla 26).

De este análisis resultó una diferencia significativa entre los tratamientos de protectores, la dosis de radiación y la interacción entre ambos. Por ello se aplicó la prueba de Tukey para contraste de medias, para cada dosis y cada tratamiento (Tablas 27 y 28).

En las Tablas se observa, así como también en la Figura 17, que excepto para el testigo y la dosis de 1000 Kr hubo una alta diferencia entre el lote control (tratado con agua) y los que se trataron con la AET y la L-cisteína. Al igual que en el lote con agua puede notarse la disminución de la media en lotes que fueron pretratados con los protectores. Se aprecia también la recuperación del crecimiento a las dosis de 200 y 400 Kr y la caída de la media desde 600 a 1400 Kr.

Estos resultados parecen deberse como ya se ha probado, a que los lotes tratados con la AET o la L-cisteína favorecieron a las auxinas precursoras de la elongación celular, en mayor grado que lo que se observa en el grupo tratado con agua.

Esto está apoyado por los resultados que obtuvo Biswas y Matsuo (1966) y Kak (1977). Dichos autores encuentran protección en la altura de la plántula al tratar las semillas de cebada con L-cisteína antes de la irradiación. También Kawasaki (1977) encuentra protección con la L-cisteína o la AET en células de cultivo de mamífero, a nivel de la fase G_2 del ciclo celular; concluyendo el autor, que los protectores reaccionan con una sustancia "blanco" relacionada con el retraso mitótico, inactivándolo. En este trabajo se observó el efecto protector, más a nivel de la división que de la elongación celular.

También Reddy y Smith (1978), aplicando un postratamiento de L-cisteína a las semillas de sorgo irradiadas, encuentra protección a

TABLA No 26 ANALISIS DE LA VARIANZA FACTORIAL DESBALANCEADO DE 3 x 9 -
CON TRES REPETICIONES PARA UN DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR PARA DETERMINAR
EL EFECTO SOBRE LA LONGITUD DEL COLEOPTILO (mm) DE SEMILLAS DE CEBADA TRA-
TADAS UNA HORA CON AGUA, AET Y L-CISTEINA (I FACTOR) ANTES DE LA IRRADIA-
CION CON DIFERENTES DOSIS ALTAS DE RAYOS GAMMA DE 60Co (II FACTOR).

FUENTE DE VARIACION	SC	GL	CM	F exp
Tratamiento (AGUA, AET Y L-CISTEINA)	508.74	8	254.37	293.53 **
Dosis (I)	21507.04	2	2688.38	3102.21 **
Tratamiento X dosis	174.82	14	12.49	14.40 **
Error	43.33	50	0.87	
T O T A L	22233.93			

** DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA

(I) = 0, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 y 1400 Kr.

+ EN CADA REPETICION SE TABULARON 100 OBSERVACIONES.

TABLA No 27 Prueba de Tukey para comparación múltiple de medias de la altura de los Coleóptilos (mm) de semillas de cebada tratadas una hora con AGUA, AET y L-CISTEINA antes de la irradiación a diferentes dosis altas de rayos gamma de 60Co.

TRATAMIENTOS

A G U A		A E T		L - CISTEINA.	
1	65.00 —	1	66.33 —	1	66.00 —
4	23.33 —	4	29.67 I	4	29.33 I
3	20.00 I	3	28.33 I	3	27.67 I
5	18.00 I	2	23.33 I	2	23.00 I
2	15.67 —	5	22.67 I	5	22.33 I
6	8.67 I	6	21.33 I	6	22.33 I
7	8.00 I	7	11.33 I	7	9.33 I
8	-	9	9.33 I	8	9.0 I
9	-	8	9.0 I	9	8.67 I
10	-	10	-	10	-

DOSIS 1-0, 2-100, 3-200, 4-400, 5-600, 6-800, 7-1000, 8-1200, 9-1400 y 10-1600 Kr.

— DIFERENCIAS NO SIGNIFICATIVAS AL 5%.

nivel de la longitud de la raíz primaria, de la altura de coleóptilo y de la plántula. Ellos concluyen que el efecto protector se debe a que la elongación fue menos severamente inhibida que la división celular, efecto resaltado por la L-cisteína.

Con la aplicación de la AET, Strazhevskaya et al., (1977), encuentran protección en células de carcinoma de ascites, detectando una disminución de 2 a 3 veces de subunidades de ADN ligadas a lípidos. Al respecto, Billen (1963), probó una mayor cantidad de ADN relacionado con una mayor resistencia. Mori (1978), encuentra un aumento de supervivencia en células L en ratón y la atribuye a una disminución en rupturas sencillas y dobles de ADN. Esto es debido a que al retardar la síntesis de ARN y la de proteínas, se da una mayor oportunidad de reparación a las células. Es posible que en este trabajo una situación similar brindada por los protectores, favoreciera la reparación celular, estimulando así los caminos enzimáticos que ayudaran a la elongación celular.

3. Cuantificación del efecto protector del AET y la L-cisteína en el número, anchos y largo celulares de los coleóptilos de semillas irradiadas con rayos gamma.

En la Tabla 29 se presentan las medias de los números celulares de los coleóptilos de las semillas tratadas con los 2 protectores antes de ser irradiadas.

Se observa una disminución en los números celulares, a las dosis de 10 Kr, de cerca del 50% en la dosis de 50 Kr, en la de 75 Kr es todavía mayor, siendo la disminución hasta cerca del 26% en las dosis de 125, 150 y 200 Kr.

En la Tabla 30 se presentan los resultados del análisis de varianza factorial de 3 x 7 con 3 repeticiones para un diseño completamente al azar, en él se observa una alta diferencia significativa para la

TABLA No 29 Prueba de Tukey para la comparación múltiple de medias para el número ($\times 10^2$) de las células de los coleóptilos de semillas tratadas con AGUA, AET y L-CISTEINA antes de irradiarlas con rayos gamma de 60Co .

Dosis (Kr)	\bar{x} ($\times 10^2$)
2	692.67
1	689.22
3	374.11 —
4	330.44 —
5	182.22
6	180.33
7	178.56

1-0 Kr, 2-10 Kr, 3-50 Kr, 4-75 Kr, 5-125 Kr, 6-150 Kr y 7-200 Kr.

— Diferencia no significativa al 5%.

TABLA No 30 ANALISIS DE LA VARIANZA FACTORIAL DE 3 x 7 CON 3 REPETICIONES PARA UN DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR PARA DETERMINAR EL EFECTO SOBRE EL NUMERO- DE CELULAS DE LOS COLEOPTILOS DE SEMILLAS DE CEBADA TRATADAS UNA HORA CON AGUA, AET Y L-CISTEINA (I FACTOR) ANTES DE LA IRRADIACION CON DIFERENTES DOSIS DE - RAYOS GAMMA DE 60Co. (II FACTOR).

Fuentes de variación	S C	G L	C M	F.exp.
Tratamiento (AGUA, AET y L-CISTEINA)	388.79	2	194.40	5.05 +
Dosis (1)	2837534.16	6	472922.35	12296.5 *
Tratamiento x dosis	484.32	12	40.36	NS 0.43
ERROR	1615.33	42	38.46	
TOTAL	2840022.60	62		

* Diferencia altamente significativa.

+ Diferencia significativa al 5%

NS Diferencia no significativa al 5%

(1) = 0, 10, 50, 75, 125, 150 y 200 Kr.

dosis, no así para los tratamientos ni la interacción.

Como solo resultaron significativamente diferentes las dosis de radiación y no así los tratamientos, se puede concluir que los protectores no actuaron incrementando los números celulares, es decir no actuaron a nivel de la división celular. Los resultados son congruentes con los de otros autores, al probar la alta radiosensibilidad en la división de las células, a dosis críticas entre 100 y 200 Kr (Wright 1961, Haber 1962, Cercek 1967, 1969, etc.). En ellas no fue patente el efecto protector de la AET o la L-cisteína. En este caso solo se realizaron comparaciones múltiples entre las dosis (Tabla 29) ya que solo se detectaron diferencias significativas para este factor.

En la Tabla 31 y Figura 18 se presenta la media de 3 experimentos con 20 observaciones cada uno y el % RC de los largos celulares en micrómetros (μ) de los coleóptilos de semillas tratados con agua, AET o L-cisteína, antes de ser irradiadas.

Se puede observar que estas medias disminuyen a las dosis de 10 y 50 Kr, en relación al control. A partir de la dosis de 75 Kr, se nota un ligero incremento, mayor en los lotes tratados con los protectores, el cual se hace evidente en las dosis de 150 y 200 Kr.

En estos resultados, se realizó el análisis de varianza factorial 3 x 7 con 3 repeticiones para un diseño completamente al azar (Tabla 32), en la cual se obtuvieron diferencias altamente significativas para tratamientos con AET y L-cisteína, para las diferentes dosis usadas y para la interacción.

Al aplicar la prueba de Tukey para comparar las medias entre tratamientos para cada dosis y entre dosis para cada tratamiento, se observaron en las dosis de 50, 75, 125, 150 y 200 Kr, altas diferencias entre las medias obtenidas para los lotes tratados con AET o L-cisteína

TABLA No 31 MEDIA Y PORCENTAJE EN RELACION AL CONTROL (% RC), DE TRES EXPERIMENTOS *, DE LOS LARGOS CELULARES (mm) DE LOS COLEOPTILOS DE LAS SEMILLAS DE CEBADA TRATADAS CON AGUA, AET Y L-CISTEINA UNA -- HORA ANTES DE LA IRRADIACION CON RAYOS GAMMA DE 60Co.

Dosis	A G U A		A E T		L - CISTEINA.	
	\bar{x}	% R C	\bar{x}	% RC	\bar{x}	% R C
0	272.00	100.00	268.66	98.77	268.33	98.65
10	268.33	98.65	275.00	101.10	270.00	99.26
50	253.67	93.26	271.00	99.63	271.33	99.75
75	276.00	101.47	331.00	121.69 **	329.33	121.08 **
125	284.00	104.41	331.66	121.93 **	330.33	121.44 **
150	331.33	121.81	397.00	145.96 **	390.67	143.63 **
200	382.00	140.44	485.33	178.43 **	472.00	173.53 **

* EN CADA EXPERIMENTO SE OBTUVIERON 20 MEDIDAS.

** LARGOS CELULARES QUE RESULTARON DIFERENTES SIGNIFICATIVAMENTE AL 5% EN RELACION AL CONTROL.

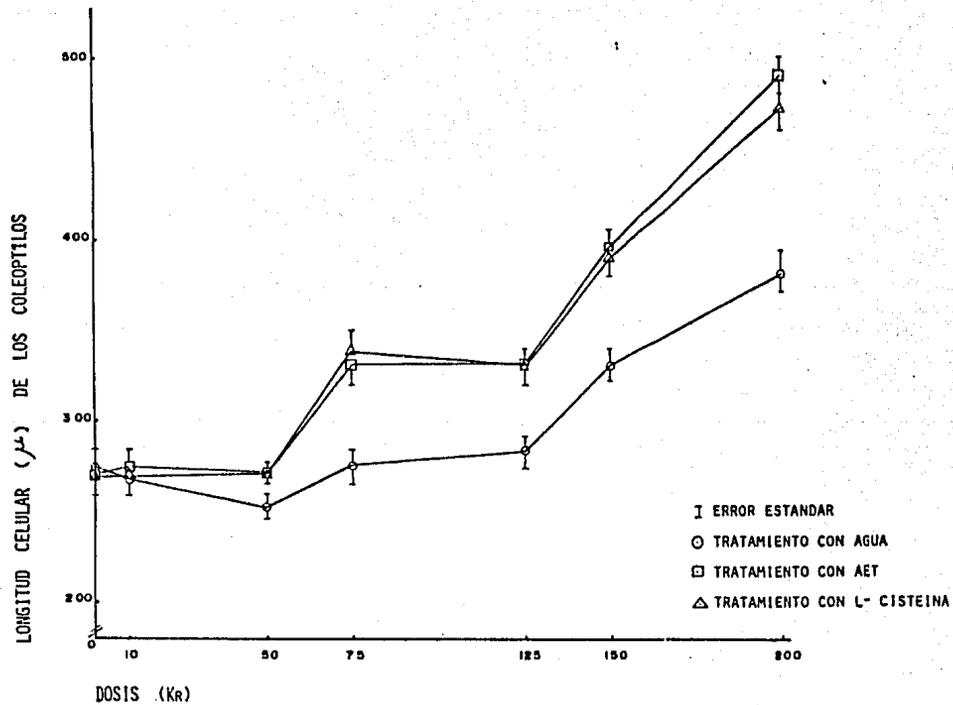


FIG. 18. LONGITUDES CELULARES (μ) DE LOS COLEÓPTILOS DE LAS SEMILLAS DE CEBADA TRATADAS CON AGUA, AET Y L-CISTEINA UNA HORA ANTES DE LA IRRADIACIÓN A DIFERENTES DOSIS DE RAYOS GAMMA DE ^{60}Co .

TABLA No 32 ANALISIS DE LA VARIANZA FACTORIAL DE 3 x 7 CON 3 REPETICIONES PARA UN DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR PARA DETERMINAR EL EFECTO SOBRE LOS LARGOS CELULARES (μ) DE LOS COLEOPTILOS DE SEMILLAS DE CEBADA TRATADAS UNA HORA CON AGUA, AET Y L-CISTEINA (I FACTOR) ANTES DE LA IRRADIACION CON DIFERENTES DOSIS DE RAYOS GAMMA DE ^{60}Co (II FACTOR).

Fuentes de variación	S C	GL	C M	F.exp.
Tratamiento (AGUA, AET y L-CISTEINA)	22324.67	2	11162.33	821.99 **
DOSIS (1)	240921.71	6	40153.62	278.84 **
Tratamiento x dosis	15506.0	12	1292.17	32.28 **
ERROR	1681.33	42	40.03	
TOTAL	280433.71	62	4523.12	

** Diferencia altamente significativa.

(1)= 0, 10, 50, 75, 125, 150 y 200 Kr.

y el tratado con agua (Tablas 33 y 34), de tal manera que se obtuvo en los grupos tratados con AET y L-cisteína y para las dosis de 200 Kr, el 27 y el 24% de protección en relación al grupo tratado con agua como se hace notar en la Tabla 31.

En la Tabla 35 y Figura 19 se presenta la media y el % RC de 3 experimentos de 20 observaciones cada uno de los anchos celulares (μ) de los coleóptilos de semillas tratadas con los protectores e irradiadas a diferentes dosis.

En general, los anchos celulares parecen ser semejantes al testigo en las dosis de 10 y 50 Kr y aumentar igualmente en las dosis de 75, 125 y 150 Kr, siendo ese incremento mayor en la dosis de 200 Kr, para el control.

En los lotes tratados se presenta un incremento en los anchos celulares, a partir de la dosis de 50 Kr y que se mantiene hasta los 125 Kr, siendo bastante mayor en 150 y 200 Kr. Esto fue confirmado al aplicar el análisis de varianza para un diseño factorial de 3 x 7 completamente al azar, de la misma manera que para los largos celulares (Tabla 36). Al obtenerse alta significatividad con el tratamiento con protectores, dosis e interacción, se realizó el contraste de medias para determinar diferencias entre ellas. En las Tablas 37 y 38 como puede notarse lo anterior, coincidiendo con el comportamiento de los largos celulares, se observan diferencias en las medias de los anchos celulares de los coleóptilos tratados con los protectores, con respecto al lote tratado con agua hasta de un 38 y 36% a la dosis de 150 Kr y de un 41 y 38% de protección a la dosis de 200 Kr con respecto a los lotes tratados con la AET o la L-cisteína respectivamente; como se ha señalado en la Tabla 35.

Como se ha explicado anteriormente, varios autores han probado que el crecimiento de los coleóptilos a partir de la inhibición de las divisiones celulares a dosis cercanas a 100 Kr, se lleva a cabo por

TABLA No 33 PRUEBA DE TUKEY PARA COMPARACION MULTIPLE DE MEDIAS DEL LARGO DE LAS CELULAS (μ) - DE LOS COLEOPTILOS DE SEMILLAS DE CEBADA TRATADAS CON AGUA (T_1) AET (T_2) Y L-CISTEINA (T_3) ANTES DE LA IRRADIACION A DIFERENTES DOSIS DE RAYOS GAMMA DE $60Co$.

T R A T A M I E N T O S

A G U A		A E T		L-CISTEINA	
7	382.00 —	7	485.33 —	7	472.00 —
6	331.33 —	6	397.00 —	6	390.67 —
5	284.00	5	331.67	5	330.33
4	276.00	4	331.00	4	329.33
1	272.00	2	275.00	3	271.33
2	268.33	3	271.00	2	270.00
3	251.00 —	1	268.67	1	268.33

DOSIS 1-0, 2-10, 3-50, 4-75, 5-125, 6-150, 7-200 Kr.

— | DIFERENCIA NO SIGNIFICATIVA AL 5%.

TABLA No 35 MEDIA Y PORCENTAJE EN RELACION AL CONTROL (% RC) DE TRES EXPERIMENTOS * DE LOS ANCHOS CELULARES (μ) DE LOS COLEOPTILOS DE LAS SEMILLAS DE CEBADA TRATADAS CON AGUA, AET Y L-CISTEINA UNA HORA - ANTES DE LA IRRADIACION CON RAYOS GAMMA DE 60Co.

Dosis	A G U A		A E T		L - CISTEINA	
	\bar{x}	% RC	\bar{x}	% RC	\bar{x}	% RC
0	46.00	100.00	46.00	100.00	47.33	102.89
10	46.33	100.72	46.00	100.00	46.30	100.65
50	46.67	101.46	57.67	125.37 **	56.67	123.20 **
75	51.30	111.52	56.67	123.20 **	55.67	121.02 **
125	51.00	110.87	56.67	123.20 **	57.00	123.91 **
150	51.33	111.59	71.00	154.35 **	70.00	152.17 **
200	54.00	117.39	76.00	165.22 **	74.67	162.33 **

* EN CADA EXPERIMENTOS SE OBTUVIERON 20 MEDIDAS.

** ANCHOS CELULARES QUE RESULTARON DIFERENTES SIGNIFICATIVAMENTE AL 5% EN RELACION AL CONTROL.

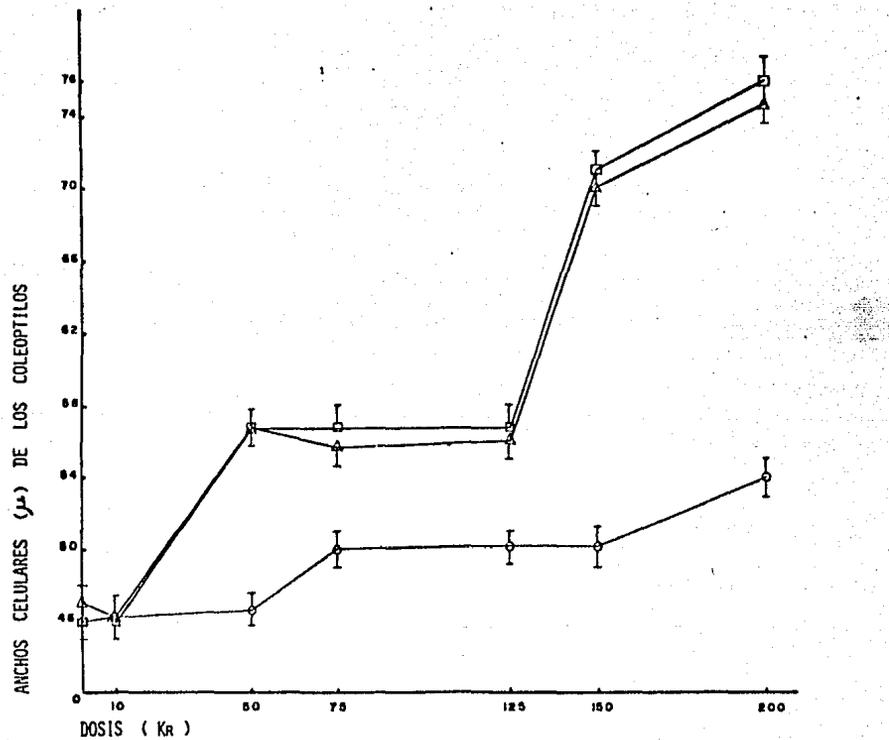


FIG. 19. ANCHOS CELULARES (μ) DE LOS COLEÓPTILOS DE LAS SEMILLAS DE CEBADA TRATADAS CON AGUA, AET Y L-CISTEINA UNA HORA ANTES DE LA IRRADIACIÓN A DIFERENTES DOSIS DE RAYOS GAMMA DE ^{60}Co .

○ TRATAMIENTO CON AGUA
 □ TRATAMIENTO CON AET
 ▲ TRATAMIENTO CON L-CISTEINA
 I ERROR ESTANDAR

TABLA No 36 ANALISIS DE LA VARIANZA FACTORIAL DE 3 x 7 CON 3 REPETICIONES- PARA UN DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR PARA DETERMINAR EL EFECTO SOBRE EL ANCHO - CELULAR (μ) DE LOS COLEOPTILOS DE SEMILLAS DE CEBADA TRATADAS UNA HORA CON --- AGUA, AET y L-CISTEINA (I FACTOR) ANTES DE LA IRRADIACION CON DIFERENTES DO-- SIS DE RAYOS GAMMA DE 60Co. (II FACTOR).

Fuentes de variación	S C	GL	C M	F. Exp.
Tratamiento (agua, AET y L-Cisteina)	29580.29	2	14790.14	1.30 NS
Dosis (1)	66336.64	6	11056.10	0.97 NS
Tratamiento x dosis	142213.27	12	11851.11	1.04 NS
ERROR	479236.67	42	11410.40	
TOTAL	717366.86	62	11570.43	

NS Diferencia no significativa al 0.05%

(1) = 0, 10, 50, 75, 125, 150 y 200 Kr.

TABLA No 37 PRUEBA DE TUKEY PARA COMPARACION MULTIPLE DE MEDIAS DEL ANCHO DE LAS CELULAS (μ) DE LOS COLEOPTILOS DE SEMILLAS DE CEBADA TRATADAS CON AGUA (T_1) AET (T_2) Y L-CISTEINA (T_3) ANTES DE LA IRRADIACION A DIFERENTES DOSIS DE RAYOS GAMMA DE $60Co$.

T R A T A M I E N T O S

A G U A		A E T		L - CISTEINA	
7	54.00	7	76.00 —	7	74.67 —
6	51.33	6	71.00 —	6	70.00 —
4	51.30	3	57.67	5	57.00
5	51.00	5	56.67	3	56.67
3	46.67	4	56.67	4	55.67
2	46.33	2	46.30	1	47.33
1	46.00	1	46.00	2	46.30

DOSIS 1-0, 2-10, 3-50, 4-75, 5-125, 6-150, 7-200 Kr.

— | DIFERENCIA NO SIGNIFICATIVA AL 5%.

TABLA No 38 PRUEBA DE TUKEY PARA COMPARACION MULTIPLE DE MEDIAS DEL ANCHO DE LAS CELULAS (سر) DE LOS COLEOPTILOS DE SEMILLAS DE CEBADA TRATADAS CON AGUA (T₁) AET (T₂) Y L-CISTEINA (T₃) ANTES DE LA IRRADIACION A DIFERENTES DOSIS DE RAYOS GAMMA DE 60Co.

D O S I S (K r)

0	10	50	75	125	150	200
T ₃ 47.33	T ₁ 46.33	T ₂ 57.67	T ₂ 56.67	T ₃ 57.00	T ₂ 71.00	T ₂ 76.00
T ₂ 46.00	T ₃ 46.30	T ₃ 56.67	T ₃ 55.67	T ₂ 56.67	T ₃ 70.00	T ₃ 74.67
T ₁ 46.00	T ₂ 46.00	T ₁ 46.67	T ₁ 51.30	T ₁ 51.00	T ₁ 51.33	T ₁ 54.00

TRATAMIENTOS T₁ AGUA T₂ AET T₃ L-CISTEINA.

—| DIFERENCIA NO SIGNIFICATIVA AL 5%

ESTA TESIS HA DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

elongación celular (Schwartz y Bay 1956, Moutschen 1959, Cercsek et al., 1971); que este proceso se ve favorecido por los tratamientos con AET o L-cisteína, como lo muestran nuestros resultados. Probablemente este efecto sea llevado a cabo por protección radioquímica y bioquímica o metabólica, (Hernádi et al., 1969, Bacq y Alexander 1961, Kawasaki 1977, Mori 1978).

Lo anterior, también ha sido analizado por Nagata y Yamaguchi (1978), que probaron la protección por compuestos con radical SH, en relación a su alta reactividad con los radicales hidroxilo : los que parecen presentar la energía orbital más baja en el vacío de su molécula (compuestos LUMO), en comparación a la energía alta encontrada al estar ocupado el orbital de la molécula (compuestos HOMO). Estos compuestos pueden transferir energía inter o intra molecular, hecho que ha sido altamente correlacionado con la acción protectora de los compuestos SH; en virtud de que son capturadores de la energía de la radiación, lo que se explica con los valores extremadamente bajos de LUMO de los compuestos SH.

Resultados evidentes y actuales en relación a la protección bioquímica brindada por los aminotioles son los analizados por Romantzev et al., (1977), el cual ha probado en ratas tratadas con una serie de aminotioles antes de ser irradiadas, que el efecto protector parece relacionado con la formación, por absorción, de enlaces tioésteres amida y disulfuro con ciertas enzimas. El momento en que se rompe la mezcla de disulfuros entre los radioprotectores y las proteínas o enzimas, coincide con el efecto protector: éste puede traducirse como una disminución en el daño molecular, acompañado de una inhibición de la replicación y elevación en el rango de reparación. Este mecanismo parece mediado con la habilidad del protector para unir receptores, moléculas y macromoléculas biológicamente importantes.

4. Determinación de las dosis letales 50 (DL50) para las semillas de cebada tratadas con AET o L-cisteína antes de ser irradiadas.

La determinación de las DL50 se ha considerado como un factor muy importante en el comportamiento de los agentes mutagénicos frente a diversos materiales biológicos, (Konzak y Michaelsen 1977). En general los parámetros fisiológicos medidos en la generación tratada (M_1)—como longitud de la plántula del coleóptilo, anchos y largos de las células de los coleóptilos etc.—son función de la dosis, es decir al aumentar ésta se eleva el efecto del agente sobre las variables consideradas (Gaul 1977). La Tabla 39 y Figura 11 muestran esta tendencia general en los resultados obtenidos. En ellas se muestran los valores promedio, el % RC y el % DRC de 3 experimentos. Para su normalización, estos valores fueron transformados con la raíz cuadrada del Arco Seno de la proporción de semillas germinadas. Al aplicar un análisis de la varianza para un diseño factorial desbalanceado, se obtuvieron diferencias altamente significativas para la proporción de semillas germinadas en lo que se refiere al tratamiento con protectores, dosis e interacción (Tabla 40). Para cuantificar diferencias y semejanzas entre las medias, se aplicó la prueba de Tukey cuyos resultados se muestran en las Tablas 41 y 42. En ellas se muestra una diferencia significativa entre la proporción de semillas germinadas para los lotes tratados con AET o L-cisteína, en relación al grupo control en el que se aplicaron dosis de 200, 600, 800, 1000, 1200 y 1400 Kr; resultado indicado en la Tabla 39. En ella se nota que mientras que el lote control llegó a cero supervivientes en las dosis de 1200 Kr en adelante, en los tratados con los protectores se logró hasta la dosis de 1600 Kr.

Lo anterior muestra un notable efecto de los protectores sobre la supervivencia siendo en los lotes tratados con AET o L-cisteína de 34% a 27% mayor en relación al control, a nivel de 800 Kr. En tanto que a 100 Kr el número de germinadas para los lotes tratados representa un 36 % más en relación al lote tratado con agua. Así mismo, en la dosis de 1200 Kr, la supervivencia se elevó 47 y 34% en relación al control

TABLA No 39 PORCENTAJE DE GERMINADAS RELACIONADO AL CONTROL (% RC) Y PORCENTAJE DE DAÑO RELACIONADO AL CONTROL (% DRC) DE LA MEDIA DE TRES EXPERIMENTOS * DEL NUMERO DE SEMILLAS GERMINADAS DE CEBADA VAR. HIMALAYA TRATADAS CON AGUA, AET Y L-CISTEINA UNA HORA ANTES DE LA IRRADIACION A DIFERENTES DOSIS ALTAS DE RAYOS GAMMA DE 60Co.

Dosis	A G U A			A E T			L - CISTEINA		
	\bar{x}	% RC	% DRC	\bar{x}	% RC	% DRC	\bar{x}	% RC	% DRC
0	100	100	—	100	100	—	100	100	—
100	97	97	3	98	97	3	100	100	—
200	97	97	3	99 ^{••}	99	1	99 ^{••}	99	1
400	96	96	4	99	99	1	99	99	1
600	86	86	14	99 ^{••}	99	1	100 ^{••}	100	—
800	47	47	53	81 ^{••}	81	19	74 ^{••}	74	26
1000	33	33	67	69 ^{••}	69	31	68 ^{••}	68	32
1200	0	0	0	47 ^{••}	47	53	34 ^{••}	34	66
1400	0	0	0	6 ^{••}	6	94	5 ^{••}	5	95
1600	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* EN CADA EXPERIMENTO SE OBTUVIERON 100 OBSERVACIONES.

•• NUMERO DE SEMILLAS GERMINADAS QUE RESULTARON DIFERENTES SIGNIFICATIVAMENTE AL 5% EN RELACION AL CONTROL.

TABLA No 40 ANALISIS DE LA VARIANZA FACTORIAL DESBALANCEADO DE 3 X 9 CON TRES REPETICIONES ⁺ PARA UN DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR PARA DETERMINAR EL EFECTO SOBRE LA VARCO SENO DE LA PROPORCION DE LAS SEMILLAS GERMINADAS DE CEBADA TRATADAS UNA HORA CON AGUA, AET Y L-CISTEINA (1 FACTOR) ANTES DE LA IRRADIACION CON DIFERENTES DOSIS ALTAS DE RAYOS GAMMA DE 60Co. (11 FACTOR).

FUENTE DE VARIACION.	SC	GL	CM	F exp
Tratamiento (AGUA, AET Y L-CISTEINA)	0.883	2	0.110	20.95 **
Dosis (1)	18.163	8	2.270	430.71 **
Tratamiento X dosis	0.459	14	0.033	6.22 **
Error	0.264	50	0.0053	
T O T A L	19.769	74		

** DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA

(1) = 0, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 y 1400 Kr.

+ EN CADA REPETICION SE TABULARON 100 OBSERVACIONES.

TABLA No. 41 PRUEBA DE TUKEY PARA LA COMPARACION MULTIPLE DE MEDIAS DE LA $\sqrt{\text{ARCO SENO}}$ DE LA PROPORCION DEL NUMERO DE SEMILLAS GERMINADAS DE CEBADA TRATADAS UNA HORA CON AGUA, AET y L-CISTEINA -- ANTES DE LA IRRADIACION A DIFERENTES DOSIS ALTAS DE RAYOS GAMMA DE 60Co .

TRATAMIENTOS

A G U A		A E T		L-CISTEINA	
1	1.524 —	1	1.524	2	1.571
3	1.328	3	1.504	1	1.524
2	1.315	5	1.442	5	1.524
4	1.300	2	1.429	4	1.489
5	1.029 —	4	1.410	3	1.457
6	0.494	6	0.947 —	6	0.829
7	0.333	7	0.758 —	7	0.752
8	-	8	0.490 —	8	0.351 —
9	-	9	0.060 —	9	0.050 —
10	-	10	-	10	-

Dosis 1-0, 2-100, 3-200, 4-400, 5-600, 6-800, 7-1000, 8-1200, 9-1400 y 10-1600 Kr.

— | DIFERENCIAS NO SIGNIFICATIVAS AL 5%.

TABLA No 42 PRUEBA DE TUKEY. PARA LA COMPARACION MULTIPLE DE MEDIAS DE LA $\sqrt{\text{ARCO SEÑO}}$ DE LA PROPORCION DEL NUMERO DE SEMILLAS GERMINADAS DE CEBADA TRATADAS UNA HORA CON AGUA, AET Y L-CISTEINA ANTES DE LA IRRADIACION A DIFERENTES DOSIS ALTAS DE RAYOS GAMMA DE 60Co .

Dosis (Kr)

0	100	200	400	600	800	1000	1200	1400
T ₁ 1.524	T ₃ 1.571	T ₂ 1.504	T ₃ 1.489	T ₃ 1.524	T ₂ 0.947	T ₂ 0.758	T ₂ 0.490	T ₂ 0.060
T ₂ 1.524	T ₂ 1.429	T ₃ 1.457	T ₂ 1.410	T ₂ 1.442	T ₃ 0.829	T ₃ 0.752	T ₃ 0.351	T ₃ 0.050
T ₃ 1.524	T ₁ 1.315	T ₁ 1.328	T ₁ 1.300	T ₁ 1.029	T ₁ 0.494	T ₁ 0.333	T ₁ 0	T ₁ 0

TRATAMIENTOS T₁ AGUA, T₂ AET y T₃ L-CISTEINA.

— | — DIFERENCIA NO SIGNIFICATIVA AL 5%

para los grupos tratados con AET y L-cisteína respectivamente.

Para obtener las DL50 y las ecuaciones de regresión de la proporción de semillas germinadas de los 3 experimentos, se transformó la proporción de germinación a unidades probit como se muestra en la Figura 11, en donde se dan las ecuaciones de las rectas de regresión para la proporción transformada a probit de semillas germinadas de cebada tratadas con diversos protectores antes de ser irradiadas con dosis altas.

En la Tabla 9 se muestran las dosis máximas para que germinen el 50, 75 y 95%, en los lotes testigos y los tratados con AET o L-cisteína antes de ser irradiadas y los intervalos del 95% de confianza, (1C95 %).

Como puede observarse, para obtener el 50% de supervivientes, en el lote tratado con agua la dosis máxima que se puede aplicar es de 852.79 Kr, mientras que para los grupos tratados con AET o L-cisteína se requirieron dosis de 1125.46 y de 1089.55 Kr respectivamente. Esto significa que se puede utilizar una dosis 28 y 32% mayor en los tratados con los protectores en relación al control para obtener el mismo efecto; situaciones similares suceden en las dosis máximas para obtener el 75 y 95% de germinación en los lotes tratados con AET o L-cisteína en relación al grupo control.

En nuestros resultados es notable la protección brindada por la AET y la L-cisteína en lo que se refiere a la supervivencia, que coinciden con los reportados por Sadilková y Fremuth (1976), quienes prueban un incremento del 15.4% en la supervivencia de las células de médula ósea en "Hamsters", tratados con AET antes de ser irradiados; igualmente Sigdestad et al., (1976), prueban la efectividad de la protección conferida por la AET a nivel de la supervivencia en ratones irradiados. Resultados similares a éstos fueron obtenidos por Mori (1978) y Shinoda et al., (1978).

También se ha probado la alta efectividad de la L-cisteína a

nivel de supervivencia en diversos materiales irradiados, como en bacterias por Kovács et al., (1968), en ratones por Tsukiyama (1976) y en cepas de levaduras como lo muestran en sus resultados Petin y Matrenina (1979). Todos estos autores coinciden en que la protección brindada por la AET y la L-cisteína puede actuar a niveles radioquímicos y bioquímicos o metabólicos, bien neutralizando los radicales libres provocados por la radiación a nivel del agua celular o los producidos en biomoléculas; o ayudando directamente a la reparación celular, ya sea por vía metabólica, favoreciendo la síntesis retardada de ADN, ARN y proteínas; o bien a nivel de los precursores de las auxinas que dirigen procesos celulares vitales y que dan como resultado el incremento en la supervivencia del material biológico empleado.

CONCLUSIONES

1. Se mantuvieron constantes las cantidades de grupos sulfhidrilo, a cuya reactividad se debe la acción protectora de la AET y la L-cisteína, durante el tiempo de tratamiento y las molaridades usadas en el trabajo; como se pudo detectar mediante la cuantificación por métodos colorimétricos durante una hora a intervalos de 10 minutos, tiempo de tratamiento del material biológico.

2. No se encontró efecto protector de la AET y la L-cisteína al final del crecimiento de la plántula en los experimentos con bajas dosis, observándose una drástica inhibición de la división celular, principal actividad a la que se debe su desarrollo. En los experimentos a altas dosis se obtuvo un mayor crecimiento de las plántulas al aplicar dosis de 200, 800, 1000, 1200 y 1400 kr en los lotes tratados con AET y L-cisteína, al actuar los protectores probablemente sobre la síntesis de las auxinas responsables de la elongación celular y con ello favorecer su crecimiento.

3. Se obtuvo un efecto protector, reflejado en el incremento de las longitudes de los coleóptilos de las semillas tratadas con AET y L-cisteína comparado con los obtenidos en las semillas tratadas con agua. En los experimentos de bajas dosis el aumento en la longitud de los coleóptilos protegidos con AET y L-cisteína a dosis de 30, 125, 150 y 200 kr, correspondió a un incremento porcentual en la longitud del coleóptilo del 50, 38, 47 y 47 para la AET y del 22, 28, 61 y 64 para la L-cisteína al compararlas con el lote tratado con agua. A dosis altas, el aumento en la longitud de los coleóptilos se observó a los 100, 200, 400, 600 y 800 kr, en los cuales el incremento porcentual fue de 48, 41, 27, 26, 242 para la AET y de 47, 38, 26, 24 y 238 para L-cisteína al compararlas al lote tratado con agua. Estos resultados se deben a que los lotes tratados con los protectores se vieron favorecidos en la síntesis de las auxinas responsables de la elongación celular, lo cual favoreció el crecimiento de los coleóptilos de las semillas irradiadas y trata-

das con los protectores.

4. Los protectores no favorecieron la división celular como se desprende de los resultados estadísticamente no significativos observados en los números celulares encontrados en lotes tratados a diferentes dosis y con AET y la L-cisteína. Por otra parte los resultados altamente significativos obtenidos al comparar las longitudes y anchos celulares de los lotes tratados con los químicos, en relación a los que recibieron agua, muestran que los protectores favorecieron la elongación celular.

5. En relación a las dosis necesarias para obtener el 50, 75 y 95% de supervivientes fue notable el efecto de la AET y la L-cisteína; en virtud de que para el lote tratado con agua se requirieron dosis menores : 852.79, 696.35 y 370.99 kr, para obtener los parámetros mencionados, mientras que para lograr los mismos valores en lotes protegidos con AET y con L-cisteína se requirieron dosis de 1125.46, 950.79 y 623.97 kr para el AET y de 1089.55, 91928 y 599.72 kr para la L-cisteína, respectivamente. El efecto fue debido a la protección de estas sustancias a niveles radioquímicos y bioquímicos o metabólicos que favorecieron los procesos vitales para la célula, dando por resultado un notable aumento en la supervivencia de las semillas de cebada.

En las dosis de 1200 y 1400 kr el efecto protector fue notable ya que el lote tratado con agua no se obtuvieron supervivientes y en los tratados con los protectores se observaron 47 y 34% de plantas germinadas para AET y cisteína con 1200 kr y de 6 y 5% para esas sustancias en las dosis de 1400 kr.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ADAMS G. E., ARMSTRONG R. C., CHARLESBY A., MICHAEL B. D. y WILLSON R. L. (1969) *Trans. Faraday Soc.* 65: 732.
- AHNSTROM G. y EDVARDSSON K. A. (1974). *Int. J. Radiat. Biol.* 26: 493.
- AHNSTROM G. (1977). En: *Manual in Mutation Breeding*. 2a. ed. IAEA Tech. Rep. Ser. 119. Vienna. 21-27.
- ANTOKU S. (1975). *Int. J. Radiat. Biol.* 27 (3) 287-292.
- APHA. American public health association (1975). *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. Fourteen ed. 709.
- ASHRI A. y LEVY A. (1974). *Radiat. Bot.* 14: 223-228.
- AZAMAR B. A J. (1982). *Isimetría de las fuentes de irradiación gamma de 60 Co del Centro de Estudios Nucleares, UNAM: Gammabeam 650 y Gammacell 200. Informe Técnico Q-01-82.*
- BACQ Z. M. y MOUTSCHEN J. (1956). *Experientia* 12: 314-316.
- BACQ Z. M. y ALEXANDER P. (1961). *Fundamentals of Radiobiology*. 2nd ed. Pergamon Press, Oxford.
- BACQ. Z. M. (1975). ed. *Bacq. Z. M. Sulfur-containing radioprotective agents* Pergamon Press, Oxford.
- BILLEN D. (1963). *Biochem. Biophys. Acta* 72: 608.
- BISWAS S. y MATSUO I. (1966). *Radiat. Bot.* 6: 275-278.
- CERCEK L., EBERT M., FROST P. y BREENE D. (1967). *Int. J. Radiat. Biol.* 12 (5): 405-413.
- CERCEK L., EBERT M. y BREENE D. (1971). *Int. J. Radiat. Biol.* 20 (5): 485-491.
- CONGER B. V., NILAN R. A., KONZAK C. F. y METTER S. (1966). *Radiat. Res.* 6: 129-144.
- CONGER B. V., NILAN R. A. y KONZAK C. F. (1968). *Radiat. Bot.* 8: 31-36.
- CONGER B. V. Y CARABIA J. V. (1972). *Radiat. Bot.* 12: 411-420.
- CONGER B. V., CONSTANTIN M. J. Y CARABIA J. V. (1972). *Int. J. Radiat. Biol.* 22: 225-235.
- CONGER B. V. y CONSTANTIN M. J. (1974). En: *Proc. Symp. Neuherberg, 1973, IAEA Vienna*: 417-432.
- COSGROVE G. E., UPTON A. C., SMITH L. H. y DENT J. N. (1965). *Radiat. Res.* 25: 725-735.
- COSGROVE G. W. (1978). *I. Phys. Chem.* 72: 3669.
- CHERNY I. V., SHKUARNIKOV P. K. Y MAKSIMENKO V. P. (1970). En: *Polyploidy and Induced Mutations in Plant Breeding. 1974. IAEA. Vienna Austria*: 303-343.

- DAVIS W. E., COLE L. J. y NOWEL P. C. (1970). *Radiat. Res.* 41: 400-408.
- DEAN C. J., FELDSCHEIBER P. y LETT J. T. (1966). *Nature (London)* 209: 49-52.
- DEWEY D. L. y BEECHER J. (1965). *Nature (London)* 206: 1369.
- ELDJARN L. y PHIL A. (1958). *Auh. Det. Norske Vitens Kaps Akademi i Oslo I Mat. Naturv. Klasse* 3: 253.
- ELLMAN G. L. (1959). *Arch. Biochem. Biophys.* 82: 78-77.
- FATOME M., ANDRIEU L., DUTROMP G., COLLET Y. y DELIEZ R. (1976) CRSSA-RA: 139-140.
- FAVRET E. A. Y RYAN G. (1962). En: *Polyploidy and Induced mutations in plant breeding*. 1974. IAEA Vienna. Austria: 303-343.
- FINNEY D. F. (1964) *Probit Analysis*, Second Ed. The syndics of the Cambridge University Press.
- FREIFELDER D. (1965). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54: 128.
- GAUL H. (1959). *Proc. 2nd Congr. European Association for Research on Plant Breeding*, Cologne: 65-69.
- GAUL H. (1963). *Mutationen in der Pflanzenzucht*, *Z. Pflanzenzuecht* 50: 194-307.
- GAUL H., FRIMMEL G., GICHNER T. Y ULONSKA E. (1972). En: *Induced Mutations and Plant Improvement*. *Proc. Meeting Buenos Aires, 1970*. IAEA Vienna: 121-139.
- GAUL H. (1977). En: *Manual in mutation Breeding*. 2a. ed. IAEA. Tech. Rep. Ser. 119, Vienna: 87-105.
- GAWLIK S. R. y SHEN-MILLER J. (1974). *Plant Physiol.* 54: 217-221.
- GORDON S. A. (1955) *Proc. Int. Conf. Peaceful Uses Atomic Energy*. Genève 11: 283-291.
- GORELIK YU. YA., RUSANOV A M., KRUTOVS G. N. Y GORNAEVA G. F. (1977). *Radiobiolgiya* 17 (6): 897-900.
- GROTE S. J. Y REWELL S. H. (1972). *RADIAT. RES.* 7: 9-303.
- HABER A. H. Y LUIPPOLD H. J. (1960). *Am. J. Bot.* 47 (2): 140-144.
- HABER A. H. CARRIER W. L. Y FOARD D. E. (1961). *Am. J. Bot.* 48 (6): 431-438.
- HABER A. H. (1962) *Pl. Physiol.* 37: 18-26.
- HARLE J. R. (1965). *Radiat. Bot.* 5: 417-422.
- HERNADI F. NAGY Z., KOVACS P. Y KARI C. (1969). En: *Radiation Protection and Sensitization*. Ed. Moroson H. L. y Quintiliani M. Rome.
- HOWARD-FLANDERS P. Y BOYCE R. P. (1966). *Radiat. Res. Suppl.* 6: 156-184
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (1966). *Proc. Int. Seed Test. Ass.* 31 (1): 128-134.

- ISMACHIN M. Y MICKAELSEN H. (1976). En: Seed Improvement in Cereals and Grain Legumes (Proc. Symp. Neuherberg 4-8 Sept. 1978).
Vol. II. IAEA 1979. Vienna
- KAK S. N. (1977). Sci. Cult. 43 (1): 509.
- KAWASAKI S. (1977) Int. J. Radiat. Biol. 32 (6): 577-581.
- KONZAK C. F. Y FAVRET A. (1972). En: Morton W. Miller (Ed.) The Dynamics of Meristem Cell Populations. Plenum Publishing Corporation. N. Y., 227-249.
- KONZAK C. F. WICKHAM I. M. Y DEKOCK M. J. (1972). En: Proc. Meeting Buenos Aires 1970. IAEA Vienna: 95-118.
- KONZAK C. F. Y MICKAELSEN K. (1977). En: Manual on Mutation Breeding 2a. Ed. IAEA Tech. Rep. Ser. 119. Vienna, 125-137.
- KOVACS P., KARI Cs., NAGY Zs. Y HERNADI F. (1968). Radiat. Res. 36: 217-224.
- LEA D. E. (1955). Actions of Radiations on Living Cells, The University Press. Cambridge, 416.
- LAFLEUR M. V. M., WOLDHUIS J. Y LOMAN H. (1980). Int. J. Radiat. Biol. 37 (5) 493-498.
- LEDOUXX. Y HUART R. (1962). Biochem. Biophys. Acta 61: 185-196.
- LAGENDORFF H. KOCH R. AND SAVER H. 1954 Strahlentherapie 93:281.
- LEHNINGER A. L. (1975). Biochemistry (The Molecular Basis of Cell Structure and Function). Second Ed. Worth Publ. Inc. New York
- LIPTAY A. Y DAVIDSON D. (1971). Ann. Bot. London 35: 991-1002.
- LIPTAY A. Y DAVIDSON D. (1972). Ann. J. Bot. 59 (3): 266-269.
- MAISIN J. R. GERBER G. B., LAMBIET - COLLIER M. Y MATTELIN G. (1978). Radiat. Environm. Biophys. 15: 35-35.
- MCGRATH R. A. Y WILLIAMS R. W. (1966). Nature (London) 212, 534.
- MENDEZ I. (1976). Comunicaciones Técnicas. Serie Azul: Monografías. No. 17. IIMAS . UNAM.
- MITCHELL J. S. (1968). Brit. J. Radiol. 41: 729.
- MORI T. (1978). J. Radiat. Res. 19 (4): 319-335.
- MOUTSCHEN J. (1959). Radiobiol. Lat. 2: 15-36.
- MOTOHASHI N., MORI I, SUGIURA Y Y TANAKA H. (1977) Chem. Pharm. Bull. 25 (10): 2516-2523.
- MUIR R. M. (1974) Evidence for the direct action of IAA in cell elongation: 715-720. En: BIELESKI R. L., FERGUSON A. R. y Cresswell M. M. eds. Mechanism of regulation of plant growth, bull 12. The Royal Society of New Zeland, Wellington.
- NAGATA C. Y YAMAGUCHI T. (1978). Radiat. Res. 73 (3). 430-439.
- NILAN R. A., KONZAK C. F., LEGAULT R. R. Y HARLE J. R. (1971). En: Proc. Conf. Karlsruhe. 1960 IAEA Vienna: 139-154.

- NILAN R. A., KONZAK C. F., HEINER R. E. y FROESE-GERTZEN E. E. (1964). En: Rep. FAO/ IAEA Tech. Meeting Rome 1964. Pergamon Press. Oxford: 71-89.
- NILAN R. A. KONZAK C. F., WAGNER J. Y LEGAULT R. R. (1965) Rep. FAO/IAEA Tech. Meeting Rome 1964. Pergamon Press Oxford: 71-89.
- NILAN R. A. Y VIG. B. K. (1976) En: Hollaender A. (Ed.) Chemical Mutagens Principles and Methods for their detection 4: 143-169.
- NISHIYAMA I., IKUSHIMA T. Y ICHIKAWA S. (1966) Radiat. Bot. 6: 211-128.
- OHSHIMA T., IWAO T. Y AKIHIKO M. (1977) Radiat. Res. 37 (5): 444-446.
- OKADA S. (1970). Cells. Radiaton Biochemistry I Academic Press, New York: 353.
- OSBORNE T. S., LUNDEN A. O. CONSTANTIN M. S. (1963). Radiat. Bot. 3: 19-28.
- OSBORNE T. S. Y LUNDEN A. O. (1965). En: Rep. FAO/IAEA Tech. Meeting Rome 1964. Pergamon. Press. Oxford: 133-149.
- PADOVA R. Y ASHRI A. (1977) Env. Exp. Bot. 17: 167-171.
- PALOMINO G., NEPAMUCENO F. Y VILLALOBOS PIETRINI R. (1979) Env. Exp. Bot. 19: 105-115.
- PARODI P. C., DIAZ M. S. y NEBREDA I. M. (1976). En: Evaluation of seed Protein alterations by mutation breeding. IAEA Vienna: 137.
- PATT H. M., TYREE E. B., STRAUBE R. L. Y SMITH D. E. 1949. Science 110: 213.
- PRASAD A. B. Y GODWARD M. B. E. (1975). Cytología 40: 535-542.
- PETIN V. G. Y MATRENINA V. L. (1979). Genetika 15 (3): 426-432.
- RAHMAN M. M. y SORIANO J. D. (1972). Radiat. Bot. 12: 291-295.
- RAJAGOPAL R. (1968). Physiol. Plant. 21: 378-385.
- REDDY C. S. Y SMITH J. D. (1978). Env. Exp. Bot. 18: 241-243.
- REYES L. J. Y FLORES H. J. M. (1972). IFUNAM 72-408.
- ROSE R. J. y ADAMSON D. (1969). Planta (Berl.) 88:274-281.
- ROMANTZEV E. F. KOSHCHENKO N. N. y FILIPPOVICH I. V. (1969). En: Ra diation Protection and Sensitization. Ed. Moroson H. L. y Quintiliani M. Rome. May 1969. Taylor and Francis LTD..
- ROMANTZEV E. F., BLOKHINA V. D., ZHULANOVA Z. I KOSHCHENKO N. N. Y FILIPPOVICH I. V. (1977) Radiobiologiya 17 (5): 672-686.
- RUIZ VELASCO S. (1982). Modelos lineales generalizados y su relación con GLIM Tesis Profesional. Actuario. Fac. Ciencias UNAM.
- SADILKOVA M. y FREMUTH F. (1976). Folia Biológica. 22 (3): 330-334.
- SANNER T. y PHIHL A. (1969). Radiat. Res. 37: 216.

- SANTOS I. S., ELEC J. V., VERANO BREWBAKETZ L. M. Y ASCENSION A. B.
(1970) En: Poliploidy and induced mutation in
Plant Breeding. IAEA Vienna 303-343.
- SCHMIDT J. Y BORG C. D. (1976). Radiat. Res. 65: 220-237.
- SCHWARTZ D. (1954). Science 119: 45-46.
- SCHWARTZ D. Y BAY C. F. (1956). Am. Nat. 90: 323-327.
- SHAMSUL M. (1970) En: Poliploidy and induced Mutation in Plant Breeding
IAEA Vienna: 303-343.
- SHINODA M, SETSUKO O. Y YUKITOSHI H. (1978) Yakagaku Zasshi. 98 (3):
397-400.
- SIGDESTAD C. P., CONNOR A. M, Y SCOTT R. M. (1976). Acta Radiol. Ther
Phys. Biol. 15 (5): 401-409.
- SIGURBJORNSSON B. Y MICKE A. (1974). En: Póliploidy and induced Mutation
in Plant Breeding IAEA Vienna: 303-343.
- SIGURBJORNSSON B. (1977). En: Manual in Mutation Breeding. 2a. ed. IAEA
Tech. Rep. Ser. 119. Vienna: 87-105.
- SKOOG F. 1935. J. Cell. Comp. Physiol. 7: 227-270.
- SMITH H. H. Y ROSSI H. H. (1966). Radiat. Res. 28: 302-321.
- SPARROW A. H., CUANTY R. L., MIKSCHÉ J. P. Y SCHAIRER L. A. (1961) Radiat.
Bot. 1: 10-34.
- STRAUBE R. L. Y PATT H. M. (1963). Ann. Rev. Pharmacol. 3: 293.
- STRAZHEVSKAYA N. B. , SRUCHKOV V. A., STRELKOV R. B., RONIN M. YA Y CHIZHOV
A. YA. (1977). Proc. of 4^o Int. Congress of Int.
Radiat. Protec. Assoc. Paris 1977. 4: 1311-1312.
- STADLER, J. L. (1928). Science 68: 186-187.
- SPSS. STATISTICAL PACKAGE FOR THE SOCIAL SCIENCES (1975). Nie N. H., Hadai
Hullc., Jenkins J. G. Streinbrenner K. y Bent.
D. H. Second Ed. Mc. Graw Hill.
- SUTHERLAND R. M., ROTHSTEIN A. Y WEED R. I. (1967). J. Cell Comp. Physiol.
69: 185.
- SUTHERLAND R. M., STANNARD J. N. Y WEED R. I. (1967). Radiat. Biol. 12: 551
-564.
- SWAMINATHAN M. S. (1967) En: Poliploidy and induced Mutation in Plant Breeding
IAEA Vienna: 303-343.
- SZERAFINNE R. E., BENKOE GY SZABO D. L. (1980). Kiserl. Orvostud.
32 (1): 51-56.
- TANAKA M. (1976). En: Seed improvement in cereals and Grain Legumes (Proc.
Symp. Neuherberg 4-8 Sept 1978). II IAEA Vienna.
- TAPPEL A. L. (1972). Ann. N. Y. Acad. Sci. 203: 12-28.
- TSUKIYAMA I. (1976). Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi 36 (7): 652-663.
- VELEMINSKY J., ZADRAZIL S., POKORNI V., GICHNER T. Y SRACHULOVA J. (1973).
Mutation Res. 19: 73-81.

- VLADIMIROV Y. A. y ARCHAKOV A. I. (1972) Perekisnoe Okislenie lipidov v biologii cheskin membranah. Nauka, Moskva.
- WALTHER H. y SEIBOLD K. H. (1979). En: Seed protein improvement in cereals and grain legume. II 1979. IAEA. Vienna
- WRIGHT S. T. C. (1961). Nature London 190: 699-700.
- WRIGHT S. T. C. (1966) J. Exp. Bot. 17 (50): 165-176.
- YAMAGUCHI H. (1969) En Poliploidy and induce. Mutations in Plant Breeding IAEA Vienna: 303-343.
- YUHAS J. M. y LI A. P. (1978). Radiat. Res. 75 (3): 563-572.