

79
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

IRRADIACION DE MERISTEMOS
"in vitro" PARA INDUCIR MUTACIONES
EN PLANTAS DE ORNATO
(Petunia híbrida)

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
JOSEFINA GONZALEZ JIMENEZ

MEXICO, D. F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
ANTECEDENTES.....	4
A) CULTIVO DE TEJIDOS IN VITRO	
A.1) <u>Antecedentes Históricos</u>	4
A.2) <u>Beneficios</u>	7
A.3) <u>Desventajas</u>	8
A.4) <u>Elementos necesarios</u>	9
B) PETUNIA HYBRIDA.....	20
C) MUTACIONES Y MUTAGENOS	
C.1) <u>Mutaciones Puntuales</u>	25
C.1.2.) <u>Mutaciones Cromómicas</u>	26
C.1.3.) <u>Mutaciones extranucleares</u>	27
C.2.1.) <u>Mutágenos químicos</u>	29
C.2.3.) <u>Mutágenos físicos</u>	31
D) CULTIVO IN VITRO Y MUTACIONES PRODUCIDAS POR RADIACION GAMMA: UNA NUEVA BIOTECNOLOGIA.....	38
Objetivos.....	40
 METODOLOGIA	
I. Cultivo in vitro	
I.1. Esterilización.....	41
I.2. Preparación de medios nutritivos.....	42
I.3. Selección y disección de los meristemos.....	46
I.4. Desinfección del material biológico.....	46
I.5. Siembra del material.....	47
I.6. Desarrollo de los explantes.....	47
Experimento I.1. Determinación del medio nutritivo óptimo.....	47

II) Irradiación de plantas <i>in vitro</i> .	
Determinación de la Dosis Letal 50 <i>in vitro</i> .	
Experimento II.1 Estado Maduro	48
Experimento II.2 Estado Inmaduro	48

III) Determinación de las Dosis Óptimas <i>in vitro</i> .	
Experimento III.1 Estado Maduro	50
Experimento III.2 Estado Inmaduro	51
Exp. III.3 Aplicación de las dosis óptimas <i>in vitro</i>	51
Exp. III.4 Determinación del medio óptimo para el desarrollo de raíz para plántulas irradiadas a 7.5 Gys.....	53
Exp. III.5 Resiembra de los meristemos irradiados.....	53

IV) Irradiación de plantas <i>in vivo</i> .	
Exp. IV.1 Dosis letal 50 <i>in vivo</i>	54
Exp. IV.2. Aplicación de las dosis óptimas <i>in vivo</i>	55

RESULTADOS.

Experimento I.I.....	56
Experimento II.1 Estado Maduro	66
Experimento II.2 Estado Inmaduro	66
Experimento III.1 Estado Maduro	71
Experimento III.2 Estado Inmaduro	71
Experimento III.3 Estado Inmaduro	91
Experimento III.4.....	96
Experimento III.5.....	99
Experimento IV.1.....	100
Experimento IV.2.....	103

Experimento I.1.....	106
Experimento II.1 y II.2.....	108
Experimento III.1 y III.2.....	109
Experimento III.3.....	111
Experimento III.4.....	116
Experimento III.5.....	118
Experimento IV.1.....	120
Experimento IV.2.....	121
FOTOS Y FIGURAS.....	122
CONCLUSIONES.....	129
BIBLIOGRAFIA.....	131

RESUMEN

Una meta buscada por los agricultores desde tiempos inmemorables es el cultivar intentando mejorar, mantener y propagar genotipos útiles y deseables; se desconoce cuando la propagación vegetativa comenzó a emplearse para conquistar dicha meta, sin embargo actualmente, el cultivo de tejidos representa la mejor metodología para realizarla. Así mismo desde hace pocas décadas en el mercado florícola se ha considerado el uso de la Inducción de mutaciones por medio de radiaciones gamma con el objeto de producir nuevas variedades.

Por otro lado, Petunia hybrida Hort es una de las plantas herbáceas ornamentales más populares y esplendorosas, especialmente en Estados Unidos además, es considerada como un sistema biológico ideal para la realización de investigaciones.

El presente trabajo se realizó con el objeto de inducir mutaciones somáticas ó genéticas en las plantas de Petunia hybrida mediante la aplicación de radiación gamma a sus meristemas desarrollados "in vitro" y con ello demostrar que la irradiación gamma de meristemas "in vitro" conforma una valiosa biotecnología que aporta resultados altamente significativos en corto tiempo y espacio; además de proporcionar mejores ventajas que las obtenidas al irradiar "in vivo".

Para ello, como primera parte del estudio, se prepararon y probaron 3 medios nutritivos diferentes tomando como punto de partida los medios básicos de Mys y Nitch con diferentes concentraciones de fitohormonas para determinar el medio nutritivo óptimo para el desarrollo de los meristemas de Petunia hybrida.

Posteriormente, se irradiaron plantas "in vitro" e "in vivo" a diferentes dosis en dos estados fisiológicos para determinar la dosis letal 50 y las posibles dosis óptimas para cada estado y tipo de desarrollo.

Los resultados revelaron que el medio nutritivo óptimo fué el elaborado en base a los macro y microelementos descritos por Murashige y Skoog adicionado con benzilamino purina (1×10^{-5}) y Acido Naftalen acético (1×10^{-7}).

Las dosis letal 50 para plántulas "in vitro" e "in vivo" fueron muy similares para el estado fisiológico inmaduro el cual, resulto ser el estado más radiosensible e ideal para efectuar las aplicaciones de las dosis óptimas. Sin embargo durante la aplicación de las dosis óptimas las respuestas encontradas "in vitro" fueron diferentes en comparación a las presentadas "in vivo" observándose un gran número de cambios en un período corto. Dentro de estas destacan las observadas en los organismos irradiados a 7.5 Gys. en estado fisiológico inmaduro, en las cuales en la "primera generación" se indujó la formación de multimeristemas y la activación de los meristemas adventicios.

En la segunda generación destaca la formación de plántulas con hojas variegadas y flores con corolas de periferia morada.

INTRODUCCION

Después de diversas pláticas sostenidas con personalidades en el ramo de la floricultura, en relación al nivel actual del mercado florícola mexicano se detectó que a pesar del enorme potencial con el que cuenta nuestro país en relación a la producción de flor de corte, maceta y jardín, éste se encuentra apenas en las primeras etapas de desarrollo. Esto posiblemente se debe a la baja calidad de nuestras flores hecho que nos impide competir con países como Holanda, Colombia, Japón y Francia que tienen monopolizado el mercado florícola Internacional.

Asimismo se observó que además de la ancestral hibridación, tecnología empleada desde los inicios de la agricultura en nuestro país, se ha efectuado poca o casi nula investigación en lo que se refiere a la mejora de variedades ornamentales existentes en la actualidad.

En base a esto, en el laboratorio de Radiobiología Vegetal del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), se ha pensado desarrollar una biotecnología en la que se combina el cultivo de tejidos vegetales con la radiación gamma *in vitro* con el objeto de mejorar algunas variedades ornamentales.

Esta tesis pretende aportar los fundamentos necesarios para la confirmación de dicha biotecnología, en ella se irradian plántulas *in vitro* e *in vivo* de Petunia hybrida, por considerarse a esta especie como un modelo biológico ideal para la realización de investigaciones, lo que nos permitirá obtener resultados que pueden ser comparados con los obtenidos en estudios anteriores y confirmar que esta Biotecnología aporta no solo rapidez sino confiabilidad.

ANTECEDENTES

A. CULTIVO DE TEJIDOS IN VITRO.

1) Antecedentes Históricos.

Desde la época de los Griegos, de la curiosidad que despertó el conocimiento de los vegetales, surgió la idea aristotélica; ésta afirmaba que las sustancias necesarias para el crecimiento de las plantas provenían de la tierra donde se cultivaban .

A pesar de que en esta época se consideraba a la tierra, el agua, el aire y el fuego como los cuatro elementos fundamentales de la materia, la idea propuesta por Aristóteles no fué aceptada del todo, sin embargo desde entonces se inició un verdadero interés sobre el comportamiento de las plantas y sus necesidades, originando un sinnúmero de estudios que fueron reforzados por los descubrimientos de los elementos químicos (1).

Según Steward y Shantz (2) los primeros trabajos sobre fisiología vegetal se originaron en 1690 con Woodwar, quien predijo el papel nutricional de los materiales disueltos en el agua, sin embargo no fué hasta el siglo XIX que se conocieron los solutos necesarios en un determinado volumen de sustrato, para el desarrollo normal de las plantas. En 1860 y en 1861 Saks y Knop observaron que los principales nutrientes de las plantas superiores eran sustancias inorgánicas y ésto los condujo a preparar una solución con ellas (3).

Lo primeros trabajos sobre cultivo de tejidos fueron efectuados en el siglo pasado por tres famosos investigadores Vochting, Rechanger y Haberlandt. Los dos primeros citados por Butenko (4) y el tercero se menciona en numerosos reportes (5, 6). Las primeras investigaciones que se efectuaron consistieron en pruebas rudimentarias: Vochting en 1878, estudió la polaridad

de las plantas empleando yemas jóvenes y raíces de Salix cultivadas en una cámara de vacío; las yemas brotaron de la parte superior de las raíces, lo que demostró la polaridad de cada zona e incluso de las mismas células aisladas. En 1893 Reehinger colocó segmentos de tallo de álamo y de acelgas así como raíces de Diente de león sobre papel filtro humedecido con una sustancia no descrita observando formaciones de callo.

Haberlandt un destacado botánico y fisiólogo vegetal, en 1898 (7), fué el primero en proponer el cultivo de células vegetales *in vitro*. Intentó el cultivo de células aisladas de tres géneros de monocotiledóneas: Erothronium, Ornithogalum y Tradescantia, sin tener éxito ya que no observó división celular. A pesar de ello su estudio, publicado en 1902, provocó el interés de numerosos científicos en este campo. Además debemos tomar en cuenta que el trabajo de Haberlandt se realizó 30 años antes del descubrimiento de las fitohormonas y como se sabe, el cultivo de monocotiledóneas *in vitro* es de difícil realización en ausencia de estas sustancias.

Desde 1902 hasta 1934 transcurrió un largo período durante el cual se realizaron innumerables intentos para encontrar un medio conveniente, así como las condiciones óptimas para el desarrollo de órganos, tejidos y células de diversas plantas. No fué sino hasta 1934 que aparecieron dos grandes científicos que reaniman el estudio *in vitro*: Phillip White, en Estados Unidos, y Gautheret en Francia, (8) cada uno obtuvo el desarrollo de células aisladas cultivadas *in vitro*.

Según White (9), el primer cultivo de tejidos verdadero lo establecieron en 1939 White, Gautheret y Nóbécourt. Dicha versión es apoyada por gran número de estudiosos ya que fueron estos investigadores los primeros en obtener un crecimiento verdadero e ilimitado del *cambium* de zanahoria; producido gracias a la acertada selección del implante así como a la adecuada

determinación de un medio nutritivo para el crecimiento de los mismos.

Ya con un medio base se realizaron diferentes estudios y se lograron nuevos conocimientos sobre las necesidades de los vegetales y sus procesos fisiológicos. Así, no se hicieron esperar el uso de los diferentes elementos inorgánicos necesarios para el desarrollo de las plantas por ejemplo el Zinc, Magnesio, Boro y el de las diferentes fitohormonas como el Acido Indol Acético (AIA) (10) y vitaminas como la Tiamina.

En 1952 se estableció el primer Cultivo de meristemos realizado por Morel y Martin, obteniéndose plantas libres de virus (11). En 1957 Kanichi Mori introdujo en Japón la técnica de cultivos de meristemos para el control de enfermedades ocasionadas por virus en plantas (12).

Murashige y Skoog en 1958 modificaron el medio de White, desarrollando un medio nutritivo que actualmente representa la base para el cultivo *in vitro* de numerosas variedades vegetales (13).

En México en 1969 , en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares se efectuó cultivo *in vitro* de meristemos radicales de Zea mays obteniendo callos desarrollados de ésta especie (14).

Actualmente esta técnica representa un método seguro y totalmente establecido, que ha promovido un impulso repentino de la Biología y en particular de la Fisiología Vegetal, ya que gracias a ella se han podido dilucidar procesos celulares de los organismos vegetales superiores e inferiores; conocimientos que se han aprovechado para incrementar la producción y/o calidad de los mismos, evitando en algunos casos la desaparición de ciertas especies.

A.2. Beneficios del Cultivo In Vitro

Entre los diferentes beneficios que actualmente trae consigo la utilización del cultivo *in vitro* podemos mencionar los siguientes (15):

Inducción de plantas haploides a través del cultivo de antera y pólen.- Son de gran interés en la producción de plantas mutantes ya que las mutaciones recesivas inducidas en ellas pueden identificarse inmediatamente replicando directamente a los genes letales.

Cultivo de Protoplastos.- El interés primario proviene de la posibilidad de crear o modificar el genoma vegetal por medio del manejo exógeno del DNA y de la creación de híbridos entre especies sexualmente incompatibles a través de la fusión de protoplastos; sin embargo un gran número de híbridos creados por medio de esta técnica son inútiles. Además el número de especies en las cuales las plantas pueden ser regeneradas a partir de protoplastos es reducido.

Inducción y Selección de Mutantes.- La ocurrencia de mutaciones en cultivo de células somáticas ha sido de gran utilidad para la inducción y aislamiento de mutantes resistentes a algunas enfermedades; el cultivo de células somáticas producidas por callo, por ejemplo ha permitido el estudio de los cambios provocados en un organismo por la aplicación de un mutágeno facilitando el manejo y selección de organismos más sanos y vigorosos.

Propagación Clonal o Multiplicación Rápido de Genotipos Específicos.- Una de las áreas más avanzadas dentro del cultivo de tejidos, es el uso de esta técnica en la propagación asexual. La diferencia entre el método tradicional para la clonación y el cultivo de tejidos, radica en el uso en este último, de pequeños propágulos, así como de un medio artificial aséptico que originan sustancialmente una rápida multiplicación, esto último dá como resultado la producción acelerada de nuevos cultivos

Eliminación de Virus ó Producción de Plantas Libres de Virus.- En diversos países el promedio de enfermedades ocasionadas por virus en plantas de propagación vegetativa como la papa, Dalia, caña de azúcar, árboles frutales, entre otras se vió incrementado a un ritmo acelerado en los años 60 debido al abuso intensivo del comercio y la forma de cultivo con dichas plantas. La aparición del *cultivo de meristemos in vitro* permitió reducir este promedio. Se ha comprobado que el uso de meristemos como inóculos acompañado de una serie de pretratamientos entre ellos termoterapia, etiolación, verde de malaquita, etc. permite producir plantas libres de virus. A pesar de que muchos investigadores están en contra de este método para el control de enfermedades, debido a que se requiere de tiempo y labor considerable, los descubrimientos y avances realizados por los científicos han demostrado que representa un método práctico y controlado para la obtención de plantas sanas.

A.3. Desventajas del cultivo In Vitro.

Sin embargo, el cultivo de tejidos, según diferentes autores entre ellos Margara (16), presenta desventajas o riesgos que deben ser tomados en cuenta para evitar errores o resultados confusos como los siguientes:

-Un clon en condiciones naturales, no tiene la capacidad de adaptación de las poblaciones genéticamente heterogéneas.

- La mayor parte de los fenómenos de degeneración son atribuidos a los virus latentes o micoplasmas.

- La formación de callo es un inconveniente importantísimo en el *cultivo in vitro*, aunque muchos autores lo mencionan como paso inicial en esta técnica; los individuos originados de él presentan una variación genética impredecible ya que esta formación es el resultado de una división celular ilimitada e irregular que puede llevar a la producción de organismos con diferente número cromosómico que el paterno. Este hecho puede ser favorecido por el uso de fitohormonas artificiales como el Acido 2,4-Diclorofenoxilacético (2,4-D) que ataca el huso acromático.

Recordemos que estas desventajas han sido superadas gracias al descubrimiento de los elementos necesarios para realizar esta técnica por ejemplo: explantes óptimos como el meristemo; sales adecuadas para el desarrollo de las plantas y el uso de fitohormonas.

A.4 Elementos necesarios para el cultivo in vitro.

Como se ha visto, la técnica de cultivo *in vitro* ofrece un importante número de ventajas sobre la propagación vegetativa tradicional, sin embargo para elaborar un cultivo de tejidos adecuado para cualquier especie, deben de tomarse en cuenta diferentes factores ya que de ellos depende el buen desarrollo de las plantas (15):

- 1) Asepsia
- 2) Medio Nutritivo
- 3) Explante
- 4) Luz
- 5) Temperatura
- 6) Fase de Gas
- 7) Polaridad
- 8) Subcultivo
- 10) Genotipo.

A.4.1 ASEPSIA.

Para un desarrollo eficiente de ésta técnica, es necesario prevenir la presencia de agentes contaminantes en el área de trabajo así como en el material a utilizar, con el objeto de evitar la pérdida de un sin número de medios nutritivos o inóculos por contaminación. Actualmente para tal efecto se usan autoclaves, lámparas de luz ultravioleta, campana de flujo laminar y soluciones estériles.

A.4.2. MEDIO NUTRITIVO.

Uno de los factores más importantes que regulan el desarrollo y morfogénesis en el cultivo de tejidos es la composición del medio nutritivo. Debe citarse que el medio no sólo es la fuente nutritiva del inóculo sino que además da a la planta el sostén necesario para llevar a cabo su crecimiento. Este es un medio artificial mezcla de sales minerales, fuente de carbono, vitaminas y fitohormonas.

A.4.2.1 Sales minerales.

Recordemos que Haberlandt en sus primeros estudios utilizó la solución descrita por Knop que aunque rudimentaria, contiene algunos de los elementos inorgánicos necesarios para el crecimiento de las plantas (3).

Dentro de los medios que han sobresalido respecto a este punto se pueden mencionar los siguientes:

White: presenta un bajo nivel de potasio y nitrógeno, se utiliza para los cultivos de callo por ejemplo en Daucus carota (17).

Murashige y Skoog (MyS): como ya se mencionó es una modificación al medio de White, elevando el contenido de nitratos, potasio y amonio; actualmente se utiliza para el desarrollo de una gran variedad de monocotiledóneas y dicotiledóneas (13).

Medio B5: se caracteriza por su alto nivel en nitratos, lo que permite principalmente el cultivo de especies dependientes de este elemento como algunas especies de la familia Rosacea (18).

Nitsch y Nitsch: se utiliza frecuentemente para el desarrollo de algunas especies ferrodpendientes como la Strelitzia reginae, y Anthurus sp. entre otras (19).

Respecto al fierro es indispensable citar que se ha utilizado en los medios MyS, Nitch, B5 etc, adicionando un elemento quelante EDTA (Etilen dinitrilo tetracetato disódico) que ayuda a disolver el fierro pues éste presenta una gran dificultad para ser absorbido por las plantas. El uso del sulfato de fierro adicionado con el EDTA ha demostrado mayor eficacia en la inducción de embriones que el citrato férrico (20).

A.4.2.2. Fuente de Carbono.

En algunos casos se emplean la glucosa y la fructuosa, sin embargo se ha observado que la sacarosa es la fuente de carbono más frecuentemente utilizada adicionada en niveles bajos. Empero en ocasiones donde la concentración de sacarosa es muy baja el tejido tiende a formar callos (21) por lo que se hace necesario determinar los niveles de azúcar para cada especie vegetal que se trabaje.

A.4.2.3 Vitaminas.

En la actualidad se han descubierto un gran número de vitaminas, no obstante parece ser que la más importante para el cultivo de células y órganos *in vitro* es la tiamina ya que la ausencia de otras vitaminas como la piridoxina y el Ac. nicotínico no altera el desarrollo de los explantes; contrario a lo que sucede cuando se excluye la Tiamina (22). A pesar de esto cuando el medio nutritivo de una especie no ha sido establecido, como medida preventiva las vitaminas no deben ser excluidas.

A.4.2.4. Fitohormonas o fitoreguladores.

Las fitohormonas son los elementos esenciales para el adecuado desarrollo del inóculo; aunque se ha reportado el crecimiento de plántulas en medios nutritivos carentes de hormonas, después de cierto período de efectuada la siembra, las fitohormonas deben agregarse al medio para proseguir el desarrollo del implante (23). Estas sustancias se dividen en: Promotores e inhibidores del crecimiento.

Promotores: auxinas, citocininas y giberelinas

Inhibidores: ácido abscísico y etileno.

A continuación se describirán los promotores del crecimiento debido a la importancia que representan en el cultivo de tejidos (24).

A.4.2.4.1. Auxinas.

Las auxinas del griego *auxein* = crecer, son sustancias reguladoras de las proporciones del crecimiento y de los fenómenos de diferenciación.

Funciones principales:

Promueven el crecimiento longitudinal

Reducen el número de flores

Aceleran la maduración

Estimulan el :Enraizamiento,Desarrollo partenocárpico,
Inicio de la floración y el crecimiento.

Ayudan a suprimir la incompatibilidad sexual de algunas plantas

Aumentan el azúcar en frutos jóvenes.

Actúan como herbicidas.

Estas se sintetizan principalmente en los meristemas apicales, presentan una traslocación principalmente basipétala (25) por los tejidos vasculares puesto que pueden encontrarse en grandes concentraciones en el estele. Pueden ser : naturales y sintéticas:

Naturales:

Acido 3-indolacético (A.I.A.)

Sintéticas

Acido 3-indolbutírico (A.I.B.)

Acido naftalenacético (A.N.A.)

Acido 4-clorofenoxilacético (C.P.A.)

Acido 2,4-diclorofenoxilacético (2,4-D)

Acido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Tordón)

Acido 2,4,5-triclorofenoxilacético.

A.4.2.4.2. Citocininas.

Se les conoce también como "Citoquininas"; son sustancias que se emplean principalmente para estimular la división celular o "citocinesis". Existe evidencia de que su concentración aumenta en los tejidos de crecimiento activo, ya que los niveles son muy altos en frutos jóvenes en desarrollo, en semillas, embriones y sobre todo en las raíces, sitio que parece ser la principal fuente de producción desde el cual se envían hacia los brotes.

Funciones principales:

- Ayudan al crecimiento y a la diferenciación celular
- Inhiben senescencia en hojas verdes
- Retardan el rompimiento en las proteínas
- Movilizan los aminoácidos en las hojas,
- Estimulan el alargamiento celular del tallo
- Estimulan la formación de brotes
- Aumentan la efectividad de la luz en la germinación de las semillas.

Casi todas las citocininas tanto naturales como sintéticas, se derivan de la adenina. Algunas de ellas son :

- Bencil aminopurina (B.A.P.) 6-6-Bencil adenina,
- 6- -Dimetil alil aminopurina (2iP) 6
isopenteniladenina (I.P.A.)
- 6- Furfuril aminopurina (Cinetina 6 Kinetina)
- 6-(4-hidroxi,3-metil-trans-2-butenilamino)purina (Zeatina).

A.4.2.4.3. Giberelinas.

Estas sustancias son consideradas como fitohormonas naturales debido a que se encuentran distribuidas en pequeñas cantidades por toda la planta. En algunos casos actúan de manera similar al A.I.A. ya que estimulan el alargamiento celular, inducen la partenocarpia y producen nueva síntesis de RNA y proteínas. Además de su papel sobre el alargamiento de los entrenudos, actúan como un factor que regula el crecimiento de éstos y el desarrollo de las hojas.

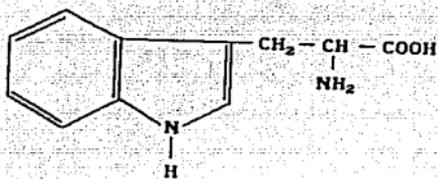
Funciones:

- Inducen el crecimiento excesivo
- Cambian durante la maduración y germinación
- Terminan la dormancia
- Estimulan el crecimiento de las plantas y los procesos de desarrollo

Además las giberelinas se han empleado para inhibir el "enanismo genético", enfermedad presente en algunas plantas y ocasionada por la mutación de un gene (26) . Las cinco giberelinas más comunes son:

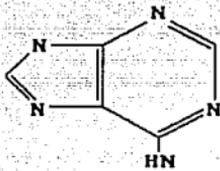
- GA₁ (C₁₉H₂₄O₆),
- GA₂ (C₁₉H₂₆O₆),
- GA₃ (C₁₉H₂₂O₆),
- GA₄ (C₁₉H₂₄O₅),
- GA₅ (C₁₉H₂₂O₅).

Precursor de auxinas



TRIPTOFANO

Precursor de citocinas



ADENINA

A.4.3. EXPLANTES.

Un explante es un "trozo" de tejido, órgano ó célula de determinadas dimensiones el cual es aislado de la planta y sembrado en el medio nutritivo. El cultivo del explante está influenciado por factores inherentes al mismo incluyendo su origen, genotipo, dimensión y estado fisiológico.

A.4.3.1 Dimensión del explante.

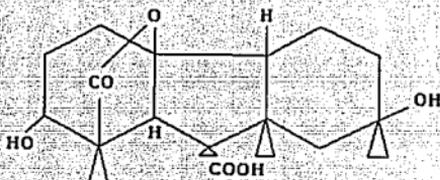
Se ha generalizado la idea de que el explante tiene una probabilidad de desarrollo proporcional a su tamaño es decir, los explantes pequeños (0.5 mm.) presentan un rango bajo de sobrevivencia en un cultivo "in vitro"; sin embargo, uno muy grande (2.5 cm.), lleva en algunos casos a confusiones, ya que el medio nutritivo sufre un acelerado desgaste antes de observar si la morfogénesis puede realizarse en él. A pesar de ello generalmente el tamaño del explante no es problema, a menos que el propósito del sistema del cultivo sea obtener plantas libres de virus, ya que de acuerdo a lo mencionado por Kanichi Mori en 1971, en este tejido el virus no se presenta sino hasta las últimas etapas de la enfermedad. En este caso será necesario efectuar un implante con una longitud de 0.7 cm., es decir solo el domo meristemático.

Precursor de flavonoides
y antocianinas



FENOL

Precursor de Giberelinas



TREPTENOS

A.4.3.2 Estado fisiológico.

El estado fisiológico influye en el tipo de desarrollo del cultivo. Se recomienda el uso de tejidos jóvenes, no diferenciados en los cuales se presentan los tejidos meristemáticos, ya que en un tejido maduro y diferenciado la morfogénesis es más compleja de inducirse. También se propone el uso de células, tejidos ó órganos jóvenes con "cambium".

A.4.3.3. Fuente del explante.

Según Hurtado (27), Haberlandt, en su primer trabajo menciona que si se desea realizar con eficacia el cultivo *in vitro*, se debe elaborar un estudio acerca de las condiciones bajo las cuales determinadas células aisladas del organismo progenitor se dividen. Lo anterior se fundamenta en la totipotencialidad de las células vegetales, concepto que fué introducido por Scheilden y Schwann en 1839 (28), y que menciona que " un tejido ó célula es totipotente si puede desarrollar por sí solo una planta nueva y completa". Numerosas especies en el reino vegetal, pueden ser "regeneradas" y propagadas *in vivo* e *in vitro* gracias al cultivo de "callo", raíces, bulbos hojas, puesto que en ellos se encuentran células no diferenciadas. En la práctica, los tejidos indiferenciados que retienen su capacidad para dar origen a nuevos órganos son limitados y estas áreas varían de una a otra especie. A pesar de ésto se puede asegurar que en un explante sea cual fuere su origen podrá llevarse a cabo la morfogénesis siempre y cuando esté presente el tejido meristemático o "centros quiescentes".

A.4.4 LUZ.

La luz puede provocar alteraciones en el desarrollo del cultivo, ésto se previene aplicando la intensidad de luz y los fotoperíodos idóneos para la especie con que se trabaje (29).

A.4.4.1 Fotoperíodo

Varía entre cada taxa y en la práctica se recomienda igualar el número de horas luz/oscuridad que la planta recibe *in vivo* hasta conocer su exacta necesidad *in vitro*.

A.4.4.2. Intensidad de luz.

Diversos autores (30, 31) reportan que la intensidad óptima de luz para un cultivo de tejidos vegetales difiere de acuerdo a los requerimientos de cada planta. Scott, Hadley, entre otros (32, 33) recomiendan que en las primeras semanas de desarrollo la intensidad de luz sea de 1000 lux (1x.) y posteriormente se utilice una intensidad entre los 3000 y 10 000 lx.

A.4.5: TEMPERATURA.

La temperatura es un factor determinante en la morfogénesis de un implante. Esta, al igual que la luz, varía de organismo a organismo según las necesidades ambientales específicas de cada especie; es importante que no se presenten rangos de oscilación muy grandes ya que los cambios bruscos provocan una aceleración en la evapotranspiración del inóculo induciendo necrosis (34).

A.4.6. FASE DE GAS.

La variabilidad obtenida en el explante puede ser debida en gran parte, a la fase de gas producida en el cultivo, es decir la producción de gas que puede ser desencadenada por las condiciones extrínsecas durante la siembra son adversas. Según Butenko (20) el flameo de los tubos con medio nutritivo induce la formación de etileno dentro de los frascos el cual puede originar el desarrollo de "callos". Sin embargo, gracias a los nuevos métodos de esterilización, como esterilizadores con luz ultravioleta, la formación de gases en los cultivos se ha visto reducida.

A.4.7. SUBCULTIVO.

Se efectúa después de tres semanas, período en el que el medio nutritivo se desgasta por el desarrollo de las plántulas,

asimismo es necesario mencionar que la pérdida del potencial morfogénico del explante puede presentarse varias veces después de realizado el subcultivo. Este paso se realiza principalmente en los cultivos de "callo".

A.4.8. GENOTIPO.

El genotipo de la planta influye en la respuesta al cultivo (35). En algunas especies sus genotipos permiten su cultivo, en otras impiden su realización. El material genético de ciertas partes tienden a formar brotes, otras formarán callo aún sembrados en el mismo medio y con los mismos factores ambientales (36).

Para obtener resultados positivos con la aplicación de esta metodología es necesario determinar las características mencionadas anteriormente apropiadas a especie a trabajar.

B. Petunia hybrida

Desde los primeros trabajos efectuados por Darwin, en 1880, con esta especie (37) , se ha evidenciado su versatilidad como una especie modelo para realizar estudios genéticos. Durante la década de los años 20 se dió énfasis principalmente a la citogenética: cariogamia, poliploidía y aneuploidía alcanzando su cima a fines de los 30 con el descubrimiento de los efectos de la colchicina. Posteriormente hubo un período de letargo hasta los 70 cuando las investigaciones se renovaron en Dijon Francia, Holanda y en los Estados Unidos. Recientemente se han empleado diversas especies de Petunia en numerosos trabajos para realizar estudios de hibridación somática, enfocados a la genética molecular y celular.

A continuación se mencionan algunas características sobresalientes de Petunia por las que son consideradas como un modelo ideal para la investigación:

1^o Las numerosas variedades de Petunia presentan una considerable diversidad en cuanto a sus colores. Las diferencias en el color de la flor son en muchos casos el resultado de las alteraciones en los pigmentos florales. La cromatografía ha permitido realizar diferentes análisis químicos sobre estos pigmentos, lo que ayuda a responder algunas preguntas concernientes a la biosíntesis de "flavonoides" manejando plantas que pueden ser definidas exactamente con respecto a sus genes para el color. Como la Petunia es una planta ornamental comercial, las investigaciones genéticas sobre sus colores y algunas otras de sus peculiaridades ofrecen información importante para muchos productores de ornamentales (38).

2^o Es una planta que se propaga por semillas fácilmente obtenidas por autocruza o cruza; el investigador puede realizar la polinización artificial obteniendo cientos de semillas después

de 4 o 5 semanas del período de maduración. El ciclo de vida es corto, lo que permite lograr 3 o 4 generaciones por año si las plantas son cultivadas en un invernadero y alimentadas con luz durante los días de períodos cortos. Además, las petunias pueden ser propagadas por estacas o esquejes y se pueden obtener clones tanto "in vitro" como "in vivo".

3^o Su reducido número cromosómico ($2n=14$) permite la construcción de cariotipos como apoyo para los análisis genéticos, así como para los estudios de los efectos de tratamientos mutagénicos sobre la estructura y el número de cromosomas.

4^o En este material se han encontrado numerosas mutaciones inducidas o espontáneas en genes involucrados en el color, deficiencias clorofílicas, caracteres morfológicos de las flores y crecimiento en el habitat. Actualmente se conocen más de 70 loci; muchos de ellos situados en siete grupos de "encadenamiento" localizados dentro de los 7 cromosomas (39).

5^o Este género ofrece además importantes posibilidades para la desarrollo de investigaciones genéticas, como por ejemplo, el mecanismo genético de la autoincompatibilidad y de los factores citoplásmicos que ocasionan la esterilidad del pólen, lo que puede contribuir a ampliar las teorías genéticas (40, 41). Asimismo la Petunia también contribuye al desarrollo de la técnica de Cultivo de Protoplastos aumentando la posibilidad de efectuar investigaciones moleculares o relacionadas con este campo.

Clasificación Taxonómica. (42)

CLASE : DICOTILEDONES

ORDEN : SOLANALES

FAMILIA : SOLANACEA

GENERO : PETUNIA

ESPECIE : hybrida

VARIEDAD : Hort

Cromosomas

Existen cinco especies de Petunia, con 14 cromosomas, $2n = 14$ (39): Petunia axilaris, P. inflata, P. parodii, P. violacea y P. hybrida. P. axilaris y P. violacea fueron llamadas anteriormente P. nyctaginiflora Juss. y P. integrifolia, respectivamente y una especie con 18 cromosomas: Petunia parviflora.

Diferentes estudios (43, 44) han aportado evidencias bioquímicas y genéticas de la estrecha relación que existe entre las especies que contienen los 14 cromosomas . Además todas las cruza recíprocas interespecíficas involucran estas cinco especies, excepto una, Petunia inflata paterna polinizada por P. parodi, se produjeron progenies F_1 que podrían ser fácilmente autocruzadas o retrocruzadas. Estas observaciones indican un alto grado de homología cromosómica en relación con todas las especies silvestres y las cultivadas. De acuerdo con Cornu y Maizonnier (39) P. axilaris, P. inflata, P. violacea y P. parodii poseen loci en común con Petunia hybrida así es que podrían haber participado como ancestros, en la variabilidad que existe entre los cultivares de las especies hortícolas.

Cariogamia.

El primer cariotipo lo estableció Marthaler en 1936 (45); describió 7 pares de cromosomas que se distinguían fácilmente uno de otro. Más tarde en 1971 Maizonnier (46), usando la técnica clásica de análisis con haploides, estableció un cariotipo en el que se identificaban 5 cromosomas fácilmente, los cromosomas V y VI no podían apreciarse como dos. Finalmente, Smith y Oud en 1972

observaron los cromosomas V y VI a través del reflectodensitómetro de Fluorescencia, el cual permitió obtener curvas de intensidad de cada uno de los cromosomas.

Los 7 cromosomas fueron clasificados dentro de tres grupos de acuerdo a la posición de su centrómero:

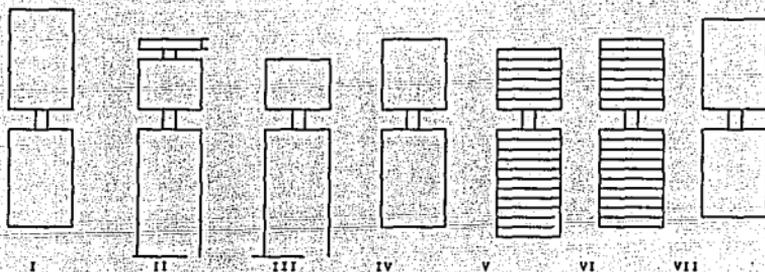
Grupo A.- Metacéntricos (cromosomas I, IV y VII).

Grupo B.- Submetacéntricos (cromosoma II y III).

Los cromosomas II llevan el organizador nucleolar y los satélites de varios tamaños; algunas veces como en el caso de los cromosomas III llevan satélites pequeños.

Grupo C.- Con un centrómero en una posición intermedia (cromosomas V y VI).

CROMOSOMAS



Color:

El color en las flores de Petunia se debe en su mayoría a los pigmentos existentes en las vacuolas de las células de la

corola, sin embargo, dependiendo de los genotipos los pigmentos pueden presentarse en los tubos de la corola, en las anteras, en el polen, en los estambres y en el estigma.

Las flores contienen diferentes pigmentos:

Las antocianinas, por ejemplo existen como una familia de moléculas diferentes. Generalmente hay 7 tipos de antocianinas dentro de un pétalo dando coloraciones entre los rangos de verdes claros y púrpuras oscuros.

Otros pigmentos, los flavonoides, al igual que las flavonoidinas, están presentes en las vacuolas. Estos pueden formar complejos con las antocianinas y modificar los colores. Algunas variedades contienen carotenoides, pero generalmente estos no tienen influencia importante.

Se conocen cerca de 30 genes en Petunia que codifican para el color, estos se dividen en cuatro grupos de acuerdo con la función química en que intervengan:

- 1) Síntesis de Antocianinas y Flavonoides.
- 2) Hidroxilación y Metilación
- 3) Glicosidación y Acilación.
- 4) Efectos localizados.

C.1.) MUTACIONES

Las *mutaciones* se definen como cambios en la calidad, cantidad y arreglo de los genes o de los cromosomas. Estas pueden ser espontáneas o inducidas; son parte importante en la evolución de las especies ya que son la fuente de variabilidad en los seres vivos, lo que permite la adaptación de los organismos en las diversas condiciones a las que se ven expuestos y en algunos casos incrementan con ellas su valor comercial.

De acuerdo a lo mencionado por Goodenough (47), las mutaciones se pueden dividir en dos grupos:

Mutaciones puntuales y Mutaciones o aberraciones cromosómicas.

C.1.1. Las *mutaciones puntuales* son alteraciones de un gene sobre uno o varios nucleótidos, éstas pueden ser provocadas por sustitución, adición y deleción.

C.1.1.1. *Sustitución:* Cuando en las cadenas de los nucleótidos se reemplaza alguna base.



C.1.1.2. *Adición:* Rompimiento en un cromosoma, su fragmento se adiciona a otro cromosoma.



ROMPIMIENTO CROMOSOMICO
Y CRUZAMIENTO ENTRE
CROMATIDAS NO HERMANAS

C.1.1.3. Delección.

Pérdida de uno o más genes en el cromosoma.

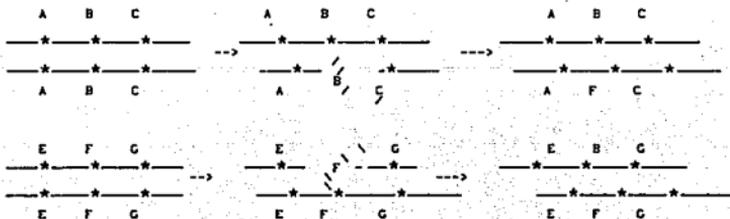


C.1.2. Mutaciones o aberraciones cromosómicas

Pueden originarse por daños de tipo estructural o numérico, los primeros se deben a alteraciones cromosómicas como son la inversión, translocación y duplicación en el número de genes dentro del cromosoma y los segundos ocurren por diferencia en el número cromosómico.

C.1.2.1. Daño estructural .- Traslocación.

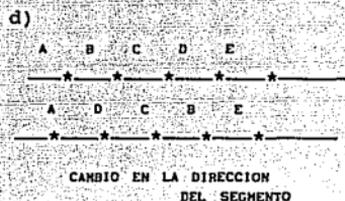
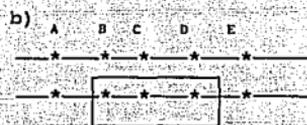
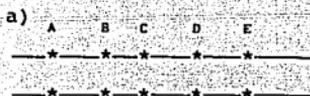
Rompimientos en dos cromosomas simultáneamente y ambos segmentos se reacomodan en los homólogos.



C.1.2.1.2. Inversión.

Es el resultado de dos rompimientos simultáneos en un cromosoma, una rotación de 180° del segmento y la subsecuente

reunión en los puntos rotos, es el rearrreglo de un segmento del cromosoma de la forma original.



C.1.2.2. Daños por alteraciones numéricas:

C.1.2.2.1. Poliploidías.- uno o más cromosomas completos se adicionan al número diploide cromosómico; en el caso de triploide $2x + x = 3x$, de tetraploide $2x + 2x = 4x$, donde „x“ representa el número básico.

C.1.2.2.2. Las Aneuploidías.- uno o más cromosomas extras se adicionan o se sustraen de un número diploide o poliploide completo (48).

En el área de fitomejoramiento se incluyen además las mutaciones extranucleares (49).

C.1.3. Mutaciones extranucleares.

Son mutaciones no asociadas al material genético nuclear y está determinada por dos estructuras que determinan a su vez el grado de cambios provocados por los mutágenos:

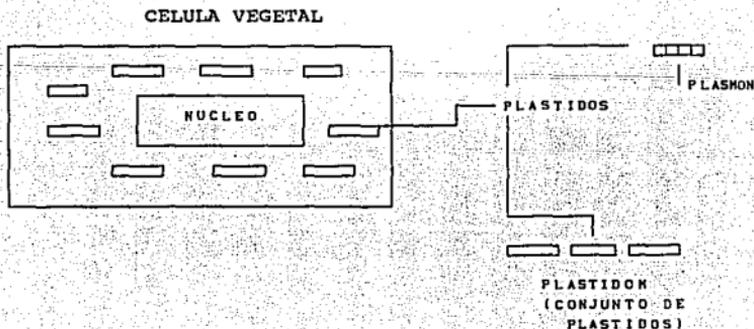
El Plasmón y El Plastidom.

C.1.3.1. El plastidom agrupa a los plástidos, por consiguiente esta herencia extranuclear se ve influenciada por las propiedades y funciones de todas estas estructuras características de una célula, sea somática o germinal (50).

C.1.3.2. El plasmón es el sistema de unidades hereditarias, para las estructuras que existen en el citoplasma, es decir. son los "fragmentos" constituyentes de los plástidos muy similares a los genes en los cromosomas (50).

Ya que los plástidos contienen DNA y RNA los cambios provocados en ellos en principio no son diferentes a las mutaciones cromosómicas o puntuales. Todavía no se conoce la bioquímica completa de los plástidos, por lo que las mutaciones a nivel plasmón y plastidom en la mayoría de los casos son hipotéticas.

Se han realizado estudios sobre éstas mutaciones en algunas plantas, como Nicotiana sp. y Anthiorinus sp. observándose que las estructuras citoplásmicas controlan la esterilidad masculina, la diferenciación sexual, la formación de la clorofila y la altura y vigor de los organismos (51, 52).



C.2. MUTAGENOS

Gracias a los resultados obtenidos por Müller (53) al irradiar Drosophila melanogaster con rayos X y a Auerbach (54) al tratarlas con gas mostaza, ha sido posible la inducción de mutaciones por medio de la aplicación de mutágenos físicos o químicos.

De acuerdo al papel que el metabolismo presenta al aplicar un agente mutágeno, se han postulado tres categorías (55, 56):

Participación del metabolismo sobre el mutágeno,
Interacción del mutágeno con el DNA.
Efectos biológicos que produce el mutágeno.

C.2.1. Participación del metabolismo sobre el mutágeno.

Los mutágenos se dividen en dos grupos: directos e indirectos. Los primeros son aquéllos que reaccionan directamente con macromoléculas como el DNA y las proteínas. Los indirectos, también llamados precursores o promutágenos, son aquellos que requieren de la acción metabólica de las enzimas ya que *per se* no poseen propiedad mutagénica. Entre ellos se encuentran: Aminas aromáticas, nitrosaminas e hidrocarburos heterocíclicos.

C.2.2. Interacción del mutágeno con el DNA.

Para esta categoría se toma en cuenta el mecanismo por medio del cual el mutágeno químico o físico interactúa con los ácidos nucleicos y si son directos o indirectos de acuerdo a su activación metabólica requerida. Existen dos grandes grupos: Los agentes alquilantes y los agentes intercalantes.

C.2.2.1. Agentes alquilantes.- Son los mutágenos químicos mas utilizados para experimentación debido a su acción acelerada, poseen uno o más grupos alquilantes los cuales pueden transferirse a otra u otras moléculas donde la densidad electrónica es mas alta que la original. Los agentes alquilantes

pueden ser monofuncionales, bifuncionales, trifuncionales y cíclicos. Ejemplos:

Monofuncional directo: Metil-metano-sulfonato (MMS) -reacciona directamente con el grupo metil.

Bifuncional directo: Bis (Cloroetil) nitroso - reacciona directamente con el etil

C.2.2.2. Agentes intercalantes

Estos pueden causar adición (análogos de base) o delección:

C.2.2.2.1. Análogos de base.- Estos mutágenos tienen una relación muy estrecha con las bases del DNA (adenina, guanina, citocina y timina) por lo que, si se adicionan al material genético, pueden incorporarse a éste en el momento de la replicación. Las pequeñas diferencias que existen entre ambas moléculas originan los "errores" en la replica, provocando así los cambios o mutaciones. Entre los análogos de base mas comunes encontramos:

5-Bromo-uracil (Timina)

2-Amino-purina (Adenina)

C.2.2.3. Antibióticos.- Estas sustancias ocasionan rompimiento de los cromosomas al efectuarse la replicación del DNA. Los dos antibióticos más empleados son la Mitomicina C y el Estreptonigrín.

C.2.3. Efectos biológicos.

En base a los daños biológicos que producen los mutágenos en el material genético al momento de efectuarse la replicación se dividen en dos:

- Efectos visibles, llamados macrolesiones, son detectables a través del análisis citológico de los cromosomas.

- Cambios no visibles, a nivel citológico, o microlesiones.

MUTACION



Dentro de las categorías antes citadas se consideran solo algunos tipos de mutágenos físicos como los rayos X y los ultravioleta, por lo que se acostumbra para este grupo utilizar otra clasificación.

C.2.3.. Mutágenos Físicos

Para la inducción de mutaciones por medio de mutágenos físicos se utilizan generalmente las radiaciones, entendiéndose por radiación, la emisión de energía en forma de partículas ó ondas electromagnéticas producidos por algunos elementos inestables llamados isótopos (57).

C.2.3.1. Radiaciones por partículas

Los núclidos deben su inestabilidad al elevado número de masa que los caracteriza por lo que emiten partículas alfa (cargadas positivamente) o partículas Beta (negativas) con el objeto de alcanzar su estabilidad. Las primeras son idénticas a los núcleos de Helio y constan de 2 protones y 2 neutrones. Las beta son muy similares a los electrones ordinarios solo que como el núcleo no contiene electrones, en esta desintegración el "electrón" procede de la conversión de un protón :

Neutrón =====> Protón + Electrón (partícula beta) + Neutrino

C.2.3.2. Radiaciones por ondas electromagnéticas.

Los rayos Gamma son radiaciones electromagnéticas penetrantes de una gran energía esencialmente idénticos a los rayos "X", sin embargo aquéllos provienen del núcleo, y éstos se originan

mediante procesos fuera de él. La radiación *gamma* se presenta como una transformación radioactiva cuando el núcleo resultante queda en lo que se llama un estado excitado, es decir, un estado que posee mayor energía interna que en el estado normal o fundamental de dicho núcleo así, el exceso de energía se emite casi instantáneamente en forma de radiación *gamma*.

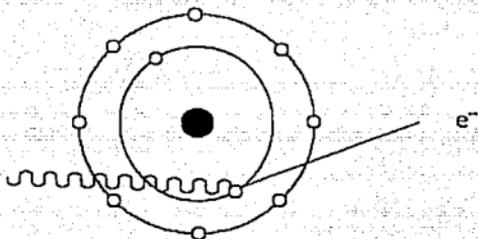
De acuerdo a la forma de interactuar con la materia existen dos tipos de radiación:

Radiación Ionizante y Radiación No Ionizante.

C.2.3.3. Radiación Ionizante.

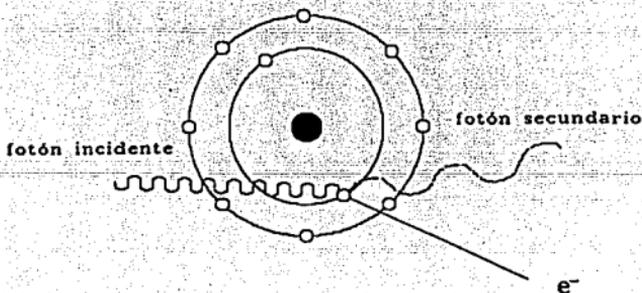
Al atravesar la materia, cabe la posibilidad de que una partícula cargada, *Beta* o *Alfa*, se acerque tanto a un átomo o a una molécula, que la interacción eléctrica sea suficiente para arrancar un electrón de su órbita; lo que da como resultado la formación de un ión de carga positiva y un electrón libre, un par iónico. Las partículas eléctricamente cargadas son capaces de provocar ionización en su recorrido a través de la materia dejando una estela de pares iónicos. A pesar de que los rayos *gamma* y los rayos X no poseen carga, producen también ionización aunque no en forma directa; cuando los rayos atraviesan la materia, gracias a la energía liberada por las ondas electromagnéticas, se origina la expulsión de los electrones orbitales produciéndose la ionización indirecta. Los neutrones, a pesar de ser eléctricamente neutros, también son capaces de producir ionización en una forma similar a la indirecta (58).

Efectos que producen las radiaciones ionizantes al interactuar con la materia:



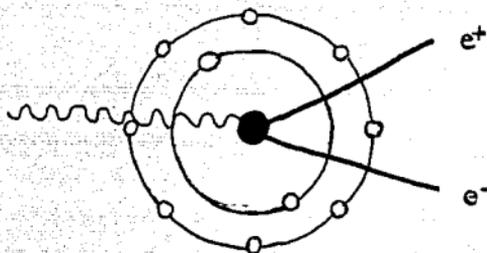
Efecto fotoeléctrico

Cuando un fotón interactúa con un átomo toda su energía se transfiere al electrón, removiendo a éste de su órbita.



Efecto Compton

El fotón incidente cede parte de su energía al electrón expulsándolo del orbital, y la energía restante emerge como un fotón de distinta frecuencia.

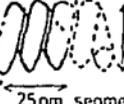
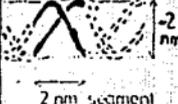
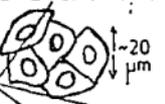
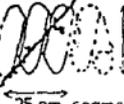
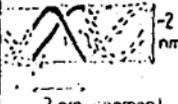
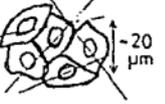
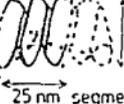
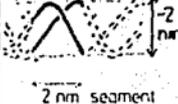


Un foton muy energetico que incide en el nucleo produce un par electron-positron.

C.2.3.4. Radiación No ionizante.

Los rayos Ultravioleta no son considerados como productores de ionización, sin embargo se utilizan como mutágenos sobre todo en estudios con bacterias y moscas. En la agricultura su uso es restringido a granos de pólen debido a su bajo poder de penetración en los tejidos vegetales. Para su producción es común el uso de lámparas de baja presión de mercurio (59).

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, para producir plantas mutantes potencialmente se dispone de los diferentes tipos de radiaciones ionizantes; sin embargo, a pesar de que cada una de éstas tiene la propiedad de producir efectos en el material irradiado, presentan ciertas características que deben ser tomadas en cuenta, si se desean obtener resultados significativos a un corto plazo; como la penetrabilidad de sus rayos por ejemplo (Cuadro 1) o el área que éstos puedan afectar dentro del tejido (Cuadro 2).

	Whole tissue	Individual cells	Chromatin fibre (total ~5 cm per cell)	DNA (total ~2 m per cell)	Mean number lethal lesions per cell
<u>External</u> <u>γ rays</u>		 ~20 μm	 ~25 nm 25 nm segment	 ~2 nm 2 nm segment	~0.001
Dose uniformity	Uniform Dose = 1 cGy	~ Uniform Dose = 1 cGy	Very large fluctuations Doses = 0 to $\sim 10^3$ Gy	Very large fluctuations Doses = 0 to $\sim 10^6$ Gy	
Mean number of tracks	10^9 gram ⁻¹	~ 50 cell ⁻¹ No cells unirradiated	~ 10^{-6} segment ⁻¹ ~20 segments hit cell ⁻¹	~ 10^{-8} segment ⁻¹ ~10 segments hit cell ⁻¹	
<u>Internal</u> <u>²²⁰Rn</u> <u>(3 α's)</u>		 ~20 μm	 ~25 nm 25 nm segment	 ~2 nm 2 nm segment	~0.01
Dose uniformity	Variable Doses = 0 to ~2 cGy	Large fluctuations Doses = 0 to ~30 cGy	Very large fluctuations Doses = 0 to $\sim 10^4$ Gy	Very large fluctuations Doses = 0 to $\sim 2 \times 10^6$ Gy	
Mean number of tracks	~ 10^7 gram ⁻¹	~ 0.1 cell ⁻¹ ~90% of cells unirrad.	~ 6×10^{-7} segment ⁻¹ ~1 segment hit cell ⁻¹	~ 10^{-8} segment ⁻¹ ~10 segments hit cell ⁻¹	
<u>External</u> <u>10 MeV</u> <u>neutrons</u>		 ~20 μm	 ~25 nm 25 nm segment	 ~2 nm 2 nm segment	~0.005
Dose uniformity	Uniform Dose = 1 cGy	Large fluctuations Doses = 0 to ~5 cGy	Very large fluctuations Doses = 0 to $\sim 5 \times 10^3$ Gy	Very large fluctuations Doses = 0 to $\sim 10^6$ Gy	
Mean number of tracks	~ 10^7 gram ⁻¹	~ 1 cell ⁻¹ ~37% of cells unirrad.	~ 4×10^{-6} segment ⁻¹ ~8 segments hit cell ⁻¹	~ 10^{-8} segment ⁻¹ ~10 segments hit cell ⁻¹	

CUADRO NUMERO 1. - Diagrama representativo de los patrones de radiación

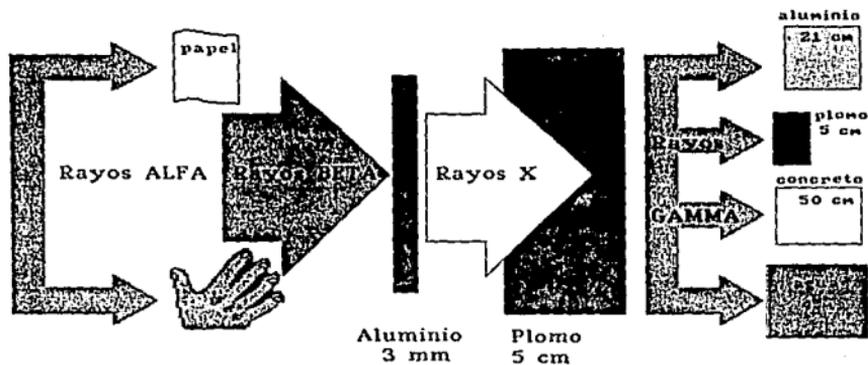
Actualmente en estudios y trabajos de Botánica se usan e instalan una gran cantidad de fuentes de radiación gamma en cámaras o cuartos con ambientes controlados para facilitar la exposición del material vegetal, a diversas dosis de radiación.

Los irradiadores contienen una fuente de Cobalto-60 (Co60) de aproximadamente 2500 Curie (Ci), que permiten irradiar en forma crónica o aguda ciertas partes ó un organismo completo en una cámara con cubierta de plomo.

Dos ejemplos de irradiadores comerciales y seguros son el Gammacel-2000 y el Vickrad-220 fuentes que el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) posee.

Por otro lado el uso de dosímetros, permiten obtener lecturas confiables acerca de la dosis recibida por el material irradiado, son necesarios si se desea repetir cierta experimento y obtener resultados semejantes. El laboratorio de Dosimetría del ININ a cargo del M. en C. Juan Azorin Nieto elabora Dosímetros Termoluminiscentes (TLD) con un alto grado de confiabilidad, debido a que los materiales empleados para su construcción semejan en un alto porcentaje el grado de absorción que presentan los tejidos a las radiaciones ionizantes (60).

Alcance de los tipos de radiación más importantes



Cuadro 2

40

D. CULTIVO "IN VITRO" Y MUTACIONES PRODUCIDAS POR RADIACION GAMMA: UNA NUEVA BIOTECNOLOGIA.

En el mercado florícola actualmente se ha incrementado la tendencia a crear nuevas variedades, ya que, el obtener un "arquetipo" sano y fuerte con características comerciales idóneas como color, aroma, duración, etc. acarrea grandes beneficios económicos para los fitomejoradores así como la posibilidad de competir en el mercado internacional.

Para la realización de tal objetivo la inducción de mutaciones por medio de radiaciones ionizantes representa el grupo de mutágenos físicos más empleados en numerosos países (61, 62). Dentro de este grupo destaca el uso de las radiaciones gamma.

En las últimas décadas los fitomejoradores han realizado una gran diversidad de estudios en plantas ornamentales entre las que podemos citar especies como Dalia, Chrysantemo, Hortencias, Gerberas, Strelitzia, Rosa, Clavel, etc. En casi un 80% de dichos estudios, el material genético tratado con la irradiación es el contenido de la semilla. A pesar de que el uso de la semilla facilita la irradiación por su sencillo manejo los posibles efectos originados por la radiación como ya se ha mencionado pueden, o no, ser expresados en la primera generación lo que provoca una inversión de tiempo y labor en espera de las posibles respuestas positivas.

En recientes estudios se ha observado que si se desean obtener resultados rápidos y positivos éstos se deben realizarse mediante tecnologías modernas que permitan conocer en un corto período los efectos de las radiaciones aplicadas a los organismos en estudio.

Por este hecho y basados en los antecedentes sobre las necesidades del mercado florícola mexicano, donde la mayoría de sus especies presentan una baja calidad lo que provoca la necesidad de importar semillas, esquejes o bulbos para su siembra; hace pensar en combinar dos técnicas; el Cultivo "in vitro" y la Irradiación con Rayos Gamma; logrando una moderna biotecnología que permita en corto tiempo conocer los cambios motivados por la irradiación Gamma "in vitro" a diferentes dosis. La petunia (Petunia hybrida) es una planta comercial, en algunos países como Estados Unidos y debido a que se considera una especie ideal para la realización de estudios de investigación, esta especie y el uso de la biotecnología antes citada permitirán realizar los objetivos del presente estudio:

Como objetivos generales se pretende:

Inducir mutaciones somáticas en las plantas de Petunia hybrida mediante la aplicación de radiación gamma a sus meristemos desarrollados "in vitro" e "in vivo".

Demostrar que la irradiación "in vitro" conforma una valiosa Biotecnología aportando resultados significativos en corto tiempo.

Para ello se cubrirán los siguientes objetivos particulares:

- a) Determinar el medio nutritivo óptimo para el desarrollo de los meristemos de Petunia hybrida.
- b) Determinar la dosis letal 50 "in vitro".
- c) Determinar la o las dosis óptimas "in vitro".
- d) Determinar la dosis letal 50 "in vivo".
- e) Determinar la o las dosis óptimas "in vivo".

METODOLOGIA

El presente estudio se dividió en cuatro etapas:

- I Cultivo "*in vitro*" y determinación del medio nutritivo óptimo.
- II Determinación de la dosis letal 50 "*in vitro*".
- III Determinación de las posibles dosis óptimas "*in vitro*".
- IV Determinación de la dosis letal 50 "*in vivo*".
y de las posibles dosis óptimas "*in vivo*".

I. Cultivo "*in vitro*".

- I.1. Esterilización del material
- I.2. Preparación de medios nutritivos,
- I.3. Selección y disección de los meristemos,
- I.4. Desinfección del material biológico,
- I.5. Siembra del material,
- I.6. Desarrollo de los explantes.

I.1. Esterilización del material

I.1.1. Con 9 lámparas de luz ultravioleta encendidas durante 3 6

4 horas se esterilizaron:

- Cuarto de siembra,
- Microscópio estereoscópico,
- Material de disección: pinzas, bisturíes, hojas del número 5 y 11

I.1.2. Con una autoclave a 21 libras de presión durante 20 minutos:

- Cajas de petri,
- Gasas,
- Agua destilada,
- Medios nutritivos,
- Portaobjetos.

I.2. Preparación de Medios Nutritivos.

Los medios preparados se hicieron a base de las sales minerales descritas por Murashige y Skoog y las de Nitch. Como éstos difieren en concentración para algunos elementos, se elaboraron en primer lugar y por separado las soluciones de cada una de ellas.

I.2.1. Medio básico de Murashige y Skoog (MyS).

I.2.1.1. Solución I

Sales minerales

Se disolvió cada una de las siguientes sales en 200 ml de agua destilada, formando una mezcla homogénea de 2000 ml.:

NH_4NO_3	33.0 g.
KNO_3	38.0 g.
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8.8 g.
KH_2PO_4	3.4 g.
H_3BO_3	0.124 g.
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.446 g.
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.172 g.
KI	0.0166 g.
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.005 g.
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0005 g.

I.2.2. Medio básico de Nitch.

I.2.2.1. Solución A.

Sales minerales.

Se disolvió cada una de éstas en 200 ml. de agua destilada y se formó una mezcla homogénea:

NH_4NO_3	14.4 g.
KNO_3	18.0 g.
CaCl_2	3.32 g.
KH_2PO_4	1.36 g.
H_3BO_3	0.20 g.

MnSO ₄ -4H ₂ O.....	0.36 g.
ZnSO ₄ -4H ₂ O.....	0.20 g.
CuSO ₄	0.0005g.
EDTA.....	0.74g.
FeSO ₄ -7H ₂ O.....	0.54g.

Las soluciones elaboradas a partir del número I.2.3. se emplearon para elaborar todos los medios ya que ambos coinciden en estas soluciones y difieren tan solo en las fitohormonas.

I.2.3. Solución II

Sulfato de Magnesio

MgSO₄-7H₂O.....3.7 g. en 100 ml. H₂O
destilada

I.2.4. Solución III

Fierro.

- 1) Na₂EDTA.....0.745 g.
- 2) FeSO₄-7H₂O.....0.557 g.

Se disolvió (1) en 20 ml. de agua destilada estéril caliente, así mismo (2) en 20 ml de agua destilada estéril. Se mezcló (1) y (2) dejando enfriar y aforando a 100 ml con agua destilada estéril.

I.2.5. Solución IV

Vitaminas:

Glicina.....200 mg.
Acido Nicotínico.....50 mg.
Piridoxina-HCL.....50 mg.
Tiamina-HCL.....10 mg.

Se disolvió cada una de ellas en 20 ml. de agua destilada , se mezcló y aforó a 100 ml.

I.2.6. Fito-hormonas

I.2.6.1. Solución V

Benzil amino purina (BAP).....100 mg en 100 ml.

I.2.6.2. Solución VI

Acido naftalen acético (ANA)....100 mg. en 100 ml.

I.2.6.3. Solución VII

Acido Giberélico (AG₃)..... 1 g. en 100 ml.

I.2.7. Solución VIII

Agar..... 6 g.

Sacarosa..... 30 g.

Se disolvieron en 500 ml. de agua destilada por medio de calor.

Debido a pruebas preliminares realizadas con anterioridad por la Bióloga Ma. Teresa Cruz Guzmán, en el Laboratorio de Radiobiología Vegetal del ININ, se realizaron los siguientes medios nutritivos par inducir el desarrollo de los meristemas apicales y axilares de petunia híbrida :

I.2.8. Medio "L" un litro:

Solución I.....100 ml.

Solución II.....10 ml.

Solución III.....5 ml.

Solución IV.....1 ml.

Inositol.....0.1 g.

Solución V.....0.1 ml.

Solución VI.....1.0 ml.

Se aforó a 500 ml. con agua destilada

Ajustando el pH a 5.6-5.8 con HCl ó NaOH.

Se prosiguió a mezclar perfectamente la solución de sales y la solución VIII.

Se vaciaron 22 ml. de este medio en tubos pyrex de 25x125 mm., se taparon y marcaron
Se esterilizó en autoclave a 21 libras de presión por 20 minutos,
Posteriormente se colocaron los tubos sobre una gradilla con 45° de inclinación, dejandolos enfriar.

I.2.9. Medio de "N" un litro :

Solución A.....100 ml.
Solución II.....5 ml.
Solución III.....10 ml.
Solución IV.....1 ml.
Inositol.....0.1 g
Solución V.....1.0 ml.
Solución VI.....0.1 ml.
Solución VII.....2.5 ml.

Se siguieron los mismos pasos (aforo, ajuste de ph, esterilizar, etc) descritos en el parrafo anterior

Los siguientes medios se prepararon para inducir sistema radicular en las plántulas irradiadas a 7.5 Gys.

I.2.10. Medio "n" un litro:

Se realizan los mismos pasos descritos anteriormente para el medio "N" descartando tan solo la solución VII.

I.2.11 Medio "1" un litro:

Se siguieron los pasos descritos para el medio "L" sin agregar las soluciones V, VI y VII.

I.2.12. Medio "2" un litro:

Similar al medio "N" pero sin V, VI y VII.

I.2.13. Medio "3" un litro:

Se preparó un litro de solución de Houglan según lo descrito por Cruz (Comunicación personal).

I.2.13.1.

Se realizaron los pasos de esterilización descritos en I.1.2.

I.2.14. Medio "4" un litro:

Se preparó un litro de medio "I" sin la solución VII y alterando las concentraciones de:

Solución V.....3 ml.

Solución VI.....6 ml.

I.2.15. Medio "5" un litro:

Similar al anterior pero sin solución V.

I.3. Selección y disección de los meristemos.

I.3.1. Se colectaron tallos jóvenes de Petunia hybrida desarrolladas "in vivo".

I.3.2. Se seccionaron en cortes de 1 cm. de longitud con un meristemo cada uno, ya sea apical o axilar.

I.4. Desinfección del material biológico.

I.4.1. Se colocaron los cortes en alcohol al 70% y se procedió a agitarlos durante 5 minutos.

I.4.2. Se desechó el alcohol

I.4.3. Se agregó Hipoclorito de Sodio comercial al 10% con una gota de Tween, agitando durante 20 minutos.

I.4.4. Se lavaron tres veces con agua destilada estéril

I.5. Siembra de los meristemas.

Los siguientes pasos se efectuaron dentro del cuarto de cultivo previamente esterilizado.

I.5.1. La disección del material biológico desinfectado se realizó bajo el microscopio, realizando cortes de 0.7 cm. de longitud incluyendo el domo meristemático y los dos primordios foliares.

I.5.2. Se sembró el explante en los tubos pyrex colocándolos posteriormente en una gradilla con 45° de inclinación.

I.6. Desarrollo de los implantes.

I.6.1. Las gradillas con los implantes se colocaron para su crecimiento, dentro de un cuarto con fotoperíodo de 16 horas luz y 8 oscuridad a temperaturas que fluctuaron entre los 19 y 23°C.

EXPERIMENTOS.

I). Determinación del medio nutritivo óptimo para el desarrollo de "Petunia hybrida"

Experimento I.I.

I.I.1. Se prepararon un litro de medio nutritivo "L", un litro de medio "N" y uno de medio "n", esterilizando y dejando enfriar.

I.I.2. Se seleccionaron y desinfectaron los meristemas del arquetipo de Petunia hybrida donados por la Asociación de Agricultores de Querétaro.

I.I.3. Se realizó la siembra en cada medio colocándolos en el cuarto de crecimiento con fotoperiodo de 16 hrs. luz y 8 oscuridad y con una temperatura que osciló entre los 19-23°C.

I.I.4. Se observó el desarrollo de cada meristemo anotando los resultados en cuanto a morfogénesis, altura, número de hojas, color general de las plántulas y el porcentaje de desarrollo de raíz, cada 8 días

II. Determinación de la Dosis Letal 50 (LD₅₀).

Para la determinación de la dosis letal 50 de las plantas desarrolladas "in vitro" se realizaron los siguientes experimentos:

Experimento II.1. Determinación de la LD₅₀ para el Estado Fisiológico en el intervalo de floración.

II.1.1. Se sembraron 50 meristemos de Petunia hybrida en medios nutritivos "L" y se colocaron en las condiciones mencionadas en el experimento anterior para su desarrollo.

II.1.2. Treinta y cinco días después de la siembra, se seleccionaron 35 plántulas con alturas entre los 4.5 y 5.5 cm. que corresponden a un estado cercano a la floración o en él.

II.1.3. Se formaron 7 lotes con plántulas homogéneas, marcándolos como A, B, C, D, E, F y G, respectivamente.

II.1.4. Se colocó un dosímetro TLD externo en el tubo a 5.5 cm. de su base.

- II.1.5. Cada lote se irradió con rayos gamma en un irradiador Vickrad a dosis de 0.0, 1.0, 3.5, 5.0, 7.0, 8.0 y 10 Grays (Gys.) .
- II.1.6. Media hora después de irradiados, se sembraron los minimeristemas axilares y apicales de cada plántula en medio "L" sin irradiar y colocándolos en el cuarto de crecimiento con las mismas condiciones de fotoperíodo y temperatura mencionadas anteriormente.
- II.1.7. Se observaron los resultados en cuanto a sobrevivencia presentada en cada dosis cada 8 días durante 40 días.

Experimento II.2. Estado Fisiológico en el intervalo inmaduro.

- II.2.1. Se sembraron 50 meristemas de Petunia hybrida en medio nutritivo "L".
- II.2.2. Se colocaron en el cuarto de crecimiento con las condiciones mencionadas anteriormente .
- II.2.3. Veinticinco días después se seleccionaron 35 plántulas con alturas entre los 3.5 y 4.0 cm. que corresponde a un estado fisiológico alejado a la floración.
- II.2.4. Se formaron 7 lotes homogéneos, marcando cada lote con numeración progresiva hasta el 7.
- II.2.5. Se colocó a cada tubo de cultivo un dosímetro TLD externo a 5.5 cm de su base.
- II.2.6 Se realizaron los mismos pasos descritos en II.1.5. y en II.1.7.

III Determinación de las dosis óptimas In Vitro.

Experimento III.1. Estado Fisiológico en el intervalo de la floración.

- III.1.1. Se sembraron 50 meristemos de Petunia hybrida en medio "L", se colocaron los cultivos en el cuarto de crecimiento con fotoperíodo de 16 hrs. luz y 8 hrs. oscuridad.
- III.1.2. Treinta y cinco días después, seleccionaron 40 plántulas con alturas entre 4.5 - 5.5 cm. y un estado fisiológico cercano a la floración o en él.
- III.1.3. Se formaron cuatro lotes de plántulas homogéneas marcándolos con A, B, C y D, respectivamente, colocándoles a cada un dosímetro TLD.
- III.1.4. Cada lote se irradió con rayos gamma en un irradiador Vickrad a dosis de 0.0, 3.5, 5.0 y 7.5 Gys. respectivamente. El lote no irradiado (0.0 Gys.) sirvió como testigo.
- III.1.5. Se sembraron los meristemos del material tratado en medios "L" nuevos colocando los cultivos en el cuarto de crecimiento con las mismas condiciones mencionadas en II.1.7.
- III.1.6. Se registraron las variaciones en cuanto a morfogénesis, altura, no. de hojas, sistema radicular, producción de plantas así como el aspecto general de las plántulas producidas

Experimento III.2. Estado fisiológico en el intervalo inmaduro.

III.2.1. Se realizaron los mismos pasos que los descritos en el experimento III.1 modificando las características de las plantas seleccionadas, en este caso plántulas con un estado fisiológico alejado de la floración (25 días) y con una altura entre los 3.5 y 4.0 cm. Lotes designados como 1, 2, 3 y 4.

Aplicación de las Dosis óptimas.

Experimento III.3. Aplicación de las Dosis óptimas.

III.3.1 Se sembraron 50 meristemos de Petunia hybrida en medio "L", se colocaron los cultivos en el cuarto de crecimiento con fotoperíodo de 16 hrs. luz y 8 hrs. oscuridad.

III.3.2. Veinticinco días después, se seleccionaron 30 plántulas con alturas entre 3.5 - 4.0 cm. y un estado fisiológico alejado a la floración o en él.

III.3.3. Se formaron tres lotes de plántulas homogéneas marcándolos con I, II y III, respectivamente y colocándoles un dosímetro TLD a cada uno.

III.3.4. Cada lote se irradió con rayos gamma en un irradiador Vickrad a dosis de 0.0, 3.5, y 7.5 Gys. respectivamente. El lote irradiado a 0.0 Gys. sirvió como testigo.

III.3.5. Se sembraron los meristemos del material tratado en medios "L" nuevos y se colocaron los cultivos en el

cuarto de crecimiento con las mismas condiciones de temperatura y fotoperíodos mencionadas.

III.3.6. Con el objeto de reafirmar o desechar los resultados observados en el experimento III.2, se realizó este experimento durante 180 días aproximadamente, cabe mencionar que fue necesario realizar 9 subcultivos para evitar alteraciones en el desarrollo de las plántulas ya que, como se mencionó en la introducción, el medio nutritivo tiene un tiempo de vida aproximado de 20 días. Después de 15 semanas de desarrollo las miniplántulas, con una altura promedio de 3.3 cm., fueron trasvasadas individualmente en tubos conteniendo medio nutritivo "L".

III.3.7. Las plántulas obtenidas al cabo de 180 días de desarrollo y con una altura promedio de 5.9 cm. se transplantaron a contenedores de plástico con una mezcla de hojarasca, tierra negra y sphagnum (1:2:1) asperjado con una solución similar al medio nutritivo "L" pero sin agar, azúcar y benzil amino purina. Cada una de estas plántulas fué cubierta con una bolsa de plástico transparente con el objeto de ambientarlas sutilmente.

III.3.8. Se observaron, anotaron y analizaron los resultados en cuanto a: morfogénesis, promedio de altura, no. de hojas, formación de tejidos así como el aspecto general de las plántulas, en el transcurso de 6 meses.

Experimento III.4. Determinación del medio nutritivo óptimo para el desarrollo de sistema radicular para meristemos irradiados in vitro a 7.5 Gys. de Petunia hybrida.

III.4.1. Se elaboró medio litro de cada uno de los medios nutritivos para inducir raíz: 1, 2, 3, 4 y 5; utilizando la metodología descrita en el apartado I.

III.4.2. Veinte plántulas obtenidas en el experimento III.3 se seleccionaron y sus minimeristemos fueron sembrados en los medio elaborados, y fueron colocados en el cuarto de crecimiento.

III.4.3. Se observó el desarrollo de cada meristemo anotando los resultados en cuanto a promedio de raíz desarrollada por medio, cada 8 días durante 96 días.

Experimento III.5.) Resiembra de los minimeristemos

III.5.1. Los minimeristemos obtenidos en el experimento III.3. se sembraron en medios "L" sin irradiar y se colocaron en el cuarto de crecimiento con un fotoperíodo de 16 hrs. luz y 8 hrs. oscuridad y con una temperatura que osciló entre los 19-23°C.

III.5.2. Se observó el desarrollo de cada meristemo anotando los resultados (mismos parámetros que los del experimento III.1.) cada 8 días durante 90 días.

Experimento IV. Dosis Letal 50 IN VIVO. (LD₅₀).

Experimento IV.1. Determinación de la LD₅₀ "In vivo" para el Estado Fisiológico en el intervalo inmaduro.

En este experimento se utilizaron plantas desarrolladas en macetas donadas por la Asociación de Floricultores de Querétaro.

- IV.1.1. Se seleccionaron 21 individuos sanos con un estado fisiológico alejado a la floración
- IV.1.2. Se formaron 7 lotes homogéneos y marcarlos I', II', III', IV', V', VI' y VII' respectivamente.
- IV.1.3. Se colocaron 2 dosímetros TLD a lo largo de las planta (3 y 6 cm).
- IV.1.4. Se irradió con rayos gamma a dosis de 0.0, 1.0, 3.5, 5.0, 7.0, 10.0 y 15.0 Gys. respectivamente.
- IV.1.5. Se colocaron a todos los individuos tratados en condiciones óptimas de temperatura entre los 19 y 23°C.y con un Fotoperíodo de 16 hrs. luz y 8 oscuridad

Experimento IV.2. Aplicación de las dosis óptimas "In vivo"

IV.1.1. Se seleccionaron 12 plantas en el mismo estado fisiológico que en el descrito en el experimento anterior.

IV.2.2. Se formaron 4 lotes homogéneos

IV.2.3. Se colocaron 2 dosímetros TLD a lo largo de cada planta a las mismas alturas que las usadas en en experimento anterior.

IV.2.4. Se irradió respectivamente a cada lote a dosis de 0.0., 3.5, 5.0 y 7.5 Gys.

IV.2.5. Se colocó el material para su desarrollo en las condiciones ambientales mencionadas en el experimento anterior.

RESULTADOS

Experimento I.I. Determinación del Medio Nutritivo Óptimo para el desarrollo de los meristemas de Petunia hybrida

La tabla no. 1 (gráfica 1) muestra que en los tres medios nutritivos elaborados los implantes presentan morfogénesis positiva destacando entre ellas las respuestas presentadas por los desarrollados en el medio "L", ya que en éste todos los inóculos activan su desarrollo en los primeros días alcanzando un porcentaje del 100% y con ello morfogénesis completa en un lapso no mayor de 32 días, a diferencia de los sembrados en los medios "N" y "n" que, para alcanzar dicho porcentaje, necesitan 48 y 64 días respectivamente.

Asimismo el promedio de altura óptimo alcanzado por las plántulas se presenta en el mismo medio "L", con un máximo de 7.0 cm (tabla 3, gráfica 3), donde el desarrollo va aumentando desde los primeros días originando con ello un desarrollo normal de los inóculos puesto que, como se observa en la tabla 4 (gráfica 4), el número de hojas se incrementa a medida de que va avanza el crecimiento. Además, no sólo se producen dichas características sino que, como se observa en la cuadro 3, se originan plántulas completas con hojas verdaderas, órganos reproductores y raíz en un alto porcentaje. Asimismo se puede observar un estado fisiológico sano representado por el aspecto normal de la plántula sin deformaciones (fotografía no. 1).

RESULTADOS

Experimento I.I. Determinación del Medio Nutritivo Optimo.

Tabla 1.

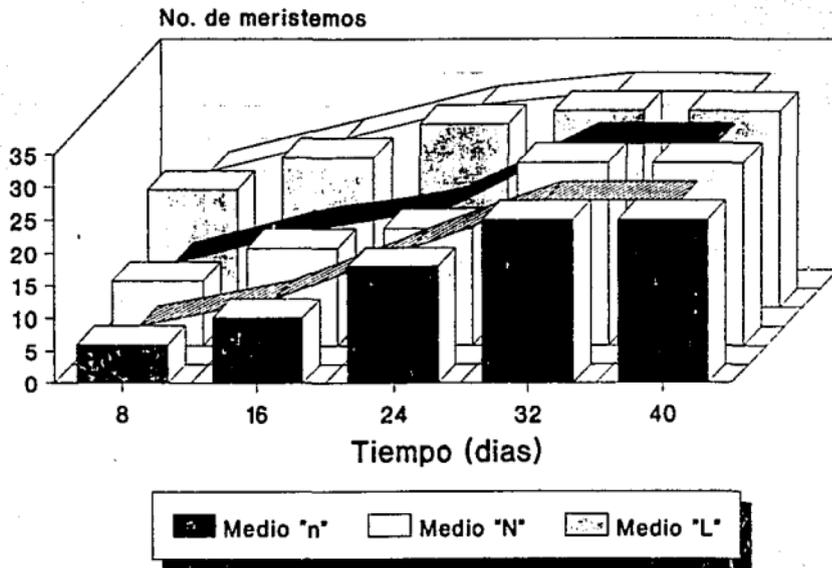
MORFOGENESIS EN LOS DIFERENTES MEDIOS

MEDIO NUTRITIVO	Número de Inóculos								
	Sem bra dos	Desarrollados (días)							
		8	16	24	32	40	48	56	64
" L "	30	18	23	28	30				
Porcentaje		60.	76.6	93.3	100				
" N "	30	10	15	18	28	28	30		
Porcentaje		33.3	50	60	93.3	93.3	100		
" n "	30	06	10	18	25	25	27	29	30
Porcentaje		28.8	33.3	60	83.3	83.3	90	96.6	100

Morfogénesis en los diferentes Medios

Experimento I.I

Gráfica 1.



Experimento I.I. Determinación del Medio Nutritivo Optimo.

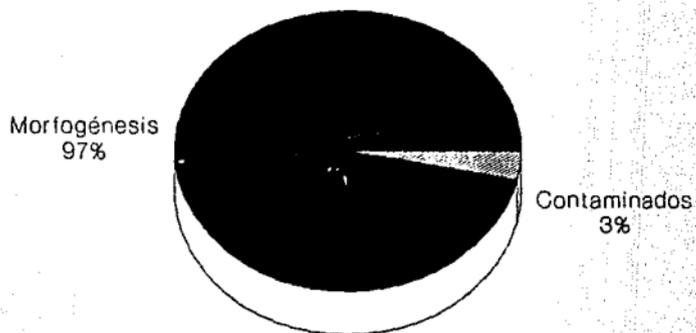
Tabla 2.

PORCENTAJE DE MORFOGENESIS EN 32 DIAS

MEDIO	TOTAL	CONTAMINADOS	DESARROLLADOS
" L "	30	3.33 %	96.66 %
" N "	30	3.33 %	96.66 %
" n "	30	3.33 %	96.66 %

Porcentaje de morfogénesis y Contaminación en los tres medios

Gráfica 2.



Experimento I.I. Determinación del Medio Nutritivo Optimo.

Tabla 3.

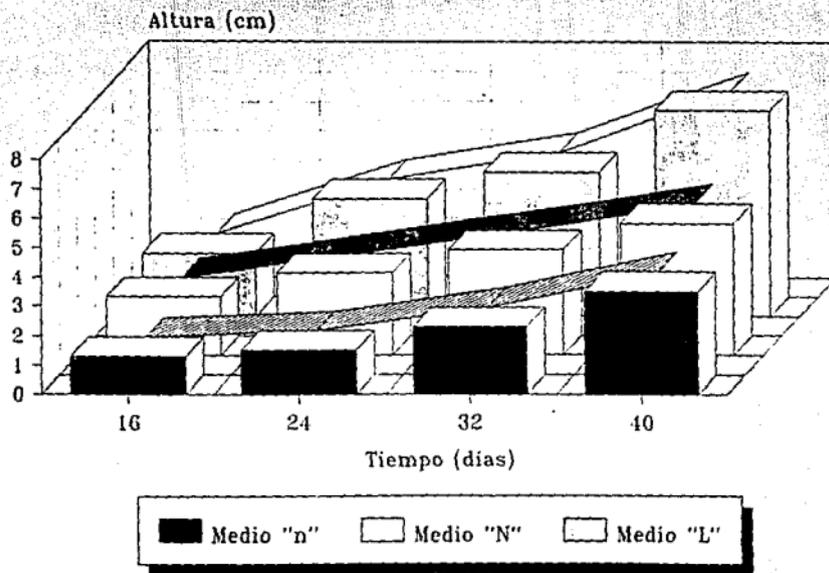
DESARROLLO DE LOS INOCULOS EN LOS DIFERENTES MEDIOS

PROMEDIO DE ALTURAS

EN LAS PLANTAS DESARROLLADAS IN VITRO

MEDIO	Alturas obtenidas en días/cm			
	16	24	32	40
" L "	2.16	4.0	4.9	7.0
" N "	1.98	2.8	3.6	4.5
" n "	1.29	1.5	2.3	3.5

Gráfica 3. Promedio de Alturas
Experimento I.I.



Experimento I. I. Determinación del Medio Nutritivo Optimo.

Cuadro 3.

COMPORTAMIENTO GENERAL DE LOS MERISTEMOS
EN LOS DIFERENTES MEDIOS

MEDIO NUTRITIVO	COLOR	ALTURA CH.	NUMERO DE HOJAS	ESTADO FISIOLÓGICO	IND. CON RAIZ PORCENTAJE
" L "	*	7.0	9.4	con flor sin flor	93.7
" N "	**	4.5	8.0	sin flor	92.3
" n "	**	3.5	6.4	sin flor	65.9

Nota:

Raíz:

Se toma como existencia de sistema radicular la raíz numerosa y con una longitud mínima de 0.5 cm.

Color:

* = Tendiendo a Verde

** = Siempre Verde

Ind. = Individuos

Experimento I. I. Determinación del Medio Nutritivo Optimo.

Tabla 4.

DESARROLLO DE LOS INOCULOS EN LOS DIFERENTES MEDIOS

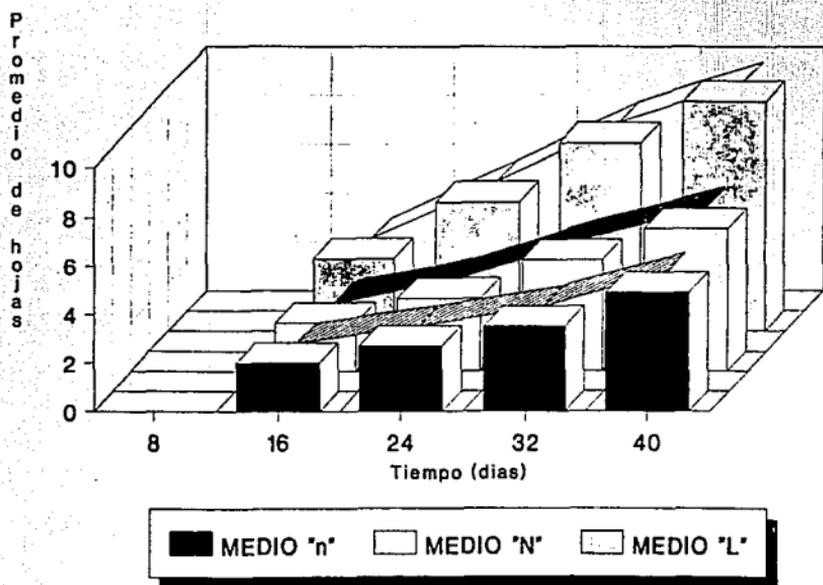
PROMEDIO DEL NUMERO DE HOJAS

DESARROLLADAS EN LOS DIFERENTES MEDIOS

MEDIO	PROMEDIO DE HOJAS (DIAS)			
	16	24	32	40
" L "	3	5.3	7.7	9.4
" N "	2	3.0	4.6	5.9
" n "	2	2.7	3.5	4.9

Variable	Medios			Fcal.	Ftab.
	L	N	n		
Morfogenesis	30.00	27.85	24.75	29.9	4.26
Longitud	1.79	1.12	0.82	17.01	4.26
No. de hojas	2.55	1.47	1.22	5.34	4.26

Gráfica 4 *Promedio del No. de hojas*
Experimento I.I.



Exp II.1. y II.2. Determinación de la Dosis Letal 50
(DL50) In Vitro:

Estados Fisiológicos de madurez e inmaduro.

Los resultados encontrados en el experimento II.1 revelan que en un estado fisiológico maduro las posibles dosis de irradiación con rayos gamma oscilan entre 1.0 y 9.0 Gys. puesto que como se observa en la tabla no.5 (gráfica 5), en dichos rangos existe entre un 100 y 50% de sobrevivencia. Así mismo, para las plántulas irradiadas en un estado inmaduro el rango de las dosis se reduce (1.0 Gys.) (tabla 6, gráfica 6); lo que nos condujo a la selección de tres dosis: 3.5, 5.0 y 7.5 Gys como las posibles dosis óptimas aplicables a ambos estados fisiológicos.

Experimento II.1 Determinación de la Dosis Letal 50 In Vitro

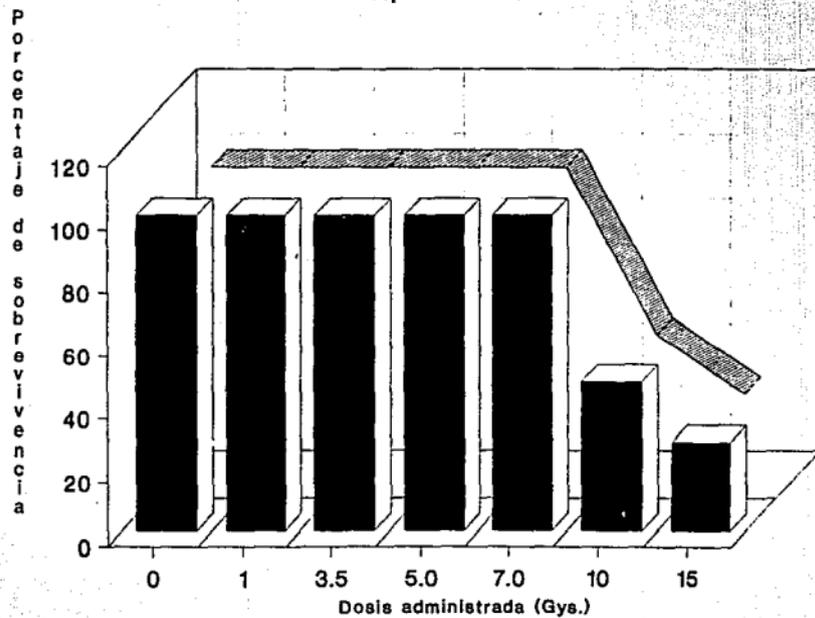
Tabla 5.

Estado Fisiológico Maduro

LD₅₀ FLORACION

LOTE	Número Organismos	Dosis (Gys)	Número de meristemos	Número de Sobrevivientes (40 días)	Porcentaje de Supervivencia
A	5	0.0	30	30	100
B	5	1.0	30	30	100
C	5	3.5	30	30	100
D	5	5.0	30	30	100
E	5	7.0	30	30	100
F	5	10.0	30	14.1	46.7
G	5	15.0	30	8.37	27.9

Gráfica 5 *Dosis Letal 50 Floración*
Experimento II.1



Experimento II.2 Determinación de la Dosis Letal 50 In Vitro

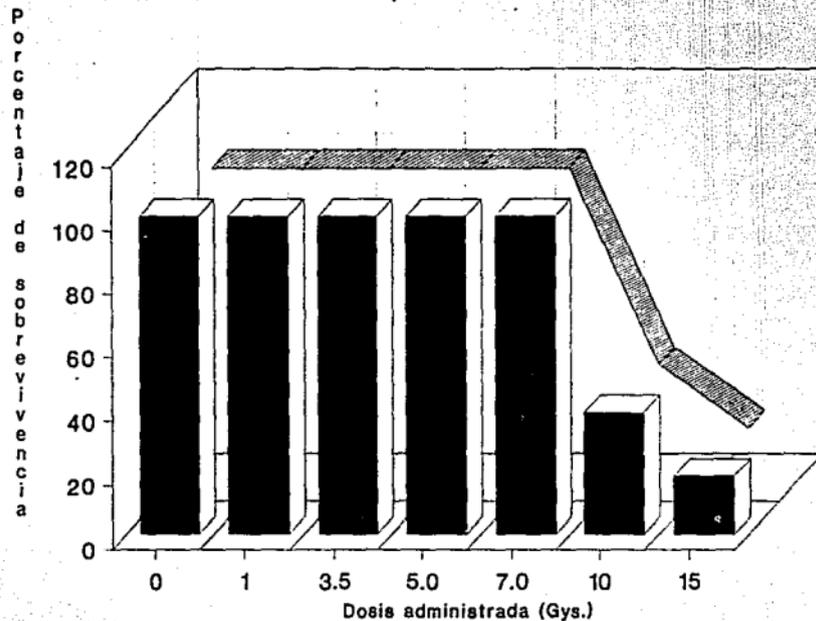
Tabla 6.

Estado Fisiológico Inmaduro

LD 50 INMADURO

LOTE	Número Organismos	Dosis (Gys)	Número de meristemas	Número de Sobrevivientes (40 días)	Porcentaje de Supervivencia
1	5	0.0	30	30	100
2	5	1.0	30	30	100
3	5	3.5	30	30	100
4	5	5.0	30	30	100
5	5	7.0	30	30	100
6	5	10.0	30	11.4	38
7	5	15.0	30	5.49	18.4

Gráfica 6 *Dosis Letal 50 Inmaduro*
Experimento II.1



Exp. III.1. y III.2. Dosis óptimas

Los cambios obtenidos en el experimento III.1 estado fisiológico maduro, revelan que en un lapso de 32 días post-tratamiento, el porcentaje de morfogénesis disminuye del 100% al 75% para la dosis de 3.5 Gys. y al 34% para los meristemos irradiados a 7.5 Gys. (tabla 7, gráfica 7).

Este parámetro no se observa alterado significativamente en la dosis de 5.0 Gys. igualandose el comportamiento de los meristemos como los presentados por el lote testigo.

Las alturas tienen un comportamiento similar ya que se obtiene un promedio de 3.5 y 2,5 cm. respectivamente en comparación con 4.9 cm. presentado por los testigos (tabla no. 8 gráfica 8).

Para los dos estados de desarrollo (maduro e inmaduro el porcentaje de desarrollo y la altura disminuyen en la dosis de 7.5 Gys (tablas 11 y 12).

En los meristemos irradiados en estado inmaduro se observa también una disminución en el desarrollo y altura (tabla 9 y 10, respectivamente). Los efectos se acrecentan en dicho estado destacando la repuesta a la dosis de 7.5 Gys.; ya que a los 80 días alcanzan tan solo el 82% de desarrollo y las alturas promedio de dichos meristemos son de 2.2 cm. (tabla 11 y 12).

En lo que respecta a la formación y número de hojas, en el estado maduro se observa en los primeros días de desarrollo cierto retardo en la formación de las hojas sin embargo, esta producción se incrementa a partir de la 3 y 4^a semana de desarrollo para todas las dosis (tabla 13, gráfica 13),

concentrándose esta producción en la base del tallo (cuadro 3).

Por otro lado en el estado inmaduro dicha producción se incrementa significativamente aún en la dosis de 5.0 Gys. y llega hasta a duplicarse en 7.5 Gys. (tabla 14 y gráfica 14).

Al comparar el número de hojas desarrolladas en ambos estados se observa un incremento en relación con el testigo destacando dicho aumento en el estado inmaduro (tabla 15).

Las modificaciones al fenotipo de los meristemos irradiados en estado fisiológico maduro se enlistan en el cuadro 3, dentro de ellas destacan las observadas a dosis de 3.5 y 7.5 Gys. donde las hojas se ven alteradas en forma y tamaño. El tamaño se reduce sobre todo en aquellas que se localizan en la base del tallo, sin embargo después de 7.8 semanas de desarrollo a dosis de 3.5 y 5.0 Gys., éstas recuperan su tamaño normal. La anormalidad en la forma de las hojas consiste en la presencia de un sin número de pequeñas depresiones en el haz y la tendencia a un crecimiento enroscado.

En las plántulas obtenidas tempranamente se manifiesta la carencia de un sistema radicular que se continúa hasta las décima semana de desarrollo.

Por otro lado en el estado inmaduro se aprecian los cambios al fenotipo más severos y numerosos aún en las dosis de 5.0 Gys. ya que los meristemos presentan cambios en el desarrollo de las hojas tendiendo a un aspecto de roseta por lo menos en un 50% de los individuos (cuadro 4). En este mismo estado en las dosis de 3.5 y 7.5 Gys. el crecimiento enroscado de las hojas se presenta a lo largo de 80 días. Así mismo destacan dos tendencias nuevas a dosis de 7.5 Gys; la activación de los meristemos adventicios (fig. no. 2, fotografía 2) y la formación de multimeristemos

(fig. no. 2a. fotografia 3). Los primeros se observan cuando la siembra de meristemas incluye los dos primordios foliares y la segunda cuando solamente se inocula el domo meristemático.

Las plántulas obtenidas a 5.0 Gys. pueden compararse con el testigo ya que, por una parte, sus alteraciones se presentan en menos del 50% de los individuos resultantes y por otra estos cambios desaparecen al cabo de 7 ó 8 semanas post-tratamiento (cuadro 3 y 4).

Experimento III.1. Determinación de las Dosis óptimas In Vitro

Tabla 7.

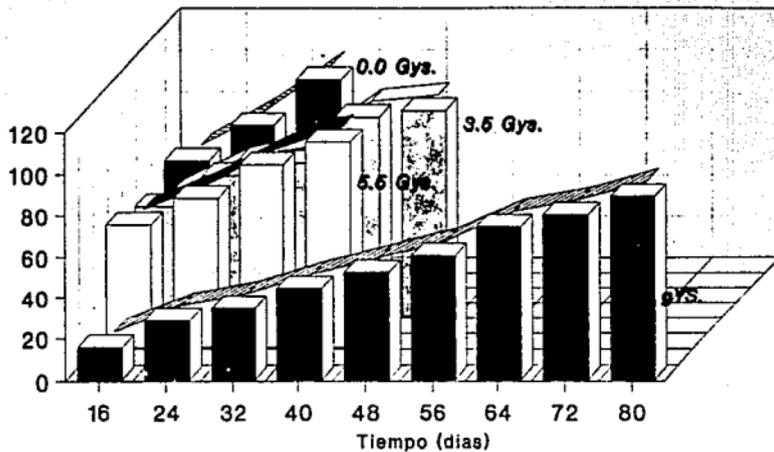
Estado Fisiológico Maduro

PORCENTAJE DE MORFOGENESIS

Lote	No. de Org.	Dosis (Gys)	No. de merist.	Porcentaje de Desarrollo / días									
				16	24	32	40	48	56	64	72	80	
A	10	0.0	60	61	78	100							
B	10	3.5	60	54	69	75	97	100					
C	10	5.0	60	60	73	89	100						
D	10	7.5	60	15	28	34	44	52	60	74	80	89	

Gráfica 7 *Porcentaje de Morfogénesis*
 Exp. III.1 Edo. Floración

Promedio
 meristema
 activado



■ Lote "D" □ Lote "C" ▨ Lote "B" ■ Lote "A"

Experimento III.1. Determinación de las Dosis óptimas In vitro

Tabla 8.

Estado Fisiológico Maduro.

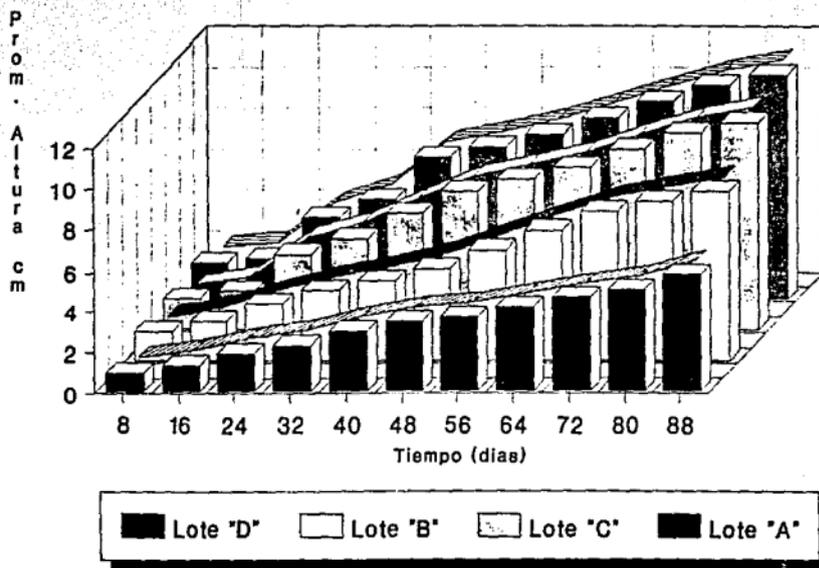
PROMEDIO DE ALTURA

Lote	Dosis (Gys.)	PROMEDIO DE ALTURA CM/DIAS										
		8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88
A	0.0	1.9	2.10	4.0	4.9	7.0	7.5	8.1	8.9	9.7	10.5	11.0
B	3.5	1.4	1.90	2.8	3.5	4.0	4.6	5.5	6.4	7.3	7.8	8.3
C	5.5	1.60	2.00	3.8	4.5	5.7	6.8	7.4	8.0	8.9	9.7	10.2
D	7.5	0.9	1.26	1.82	2.2	2.90	3.38	3.6	4.1	4.6	5.0	5.8

Gráfica 8.

Promedio de Alturas

Exp. III.1 Floración



Experimento III.2. Determinación de las Dosis óptimas In Vitro

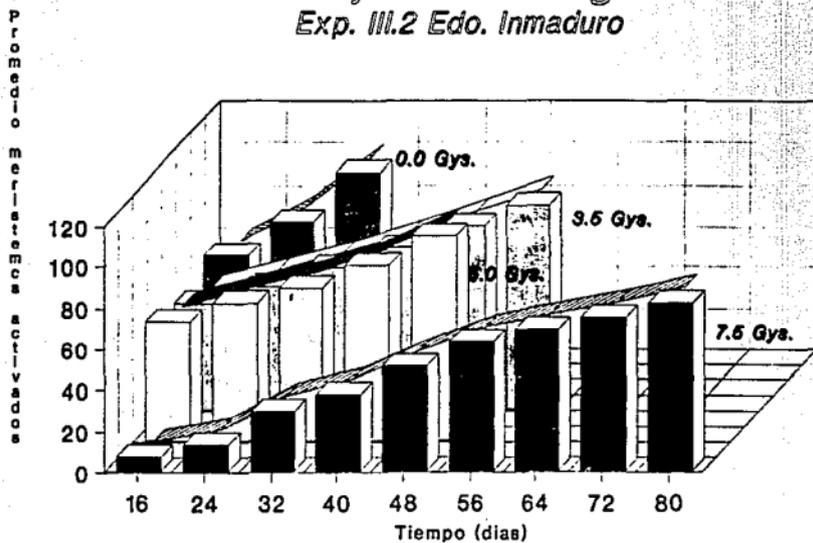
Tabla 9.

Estado Fisiológico Inmaduro.

PORCENTAJE DE HORFOGENESIS

Lote	No. de Org.	Dosis (Gys)	No. de merist.	Porcentaje de Desarrollo / días										
				16	24	32	40	48	56	64	72	80		
1	10	0.0	60	60	77	100								
2	10	3.5	60	52	60	69	79	90	100					
3	10	5.0	60	58	67	74	85	100						
4	10	7.5	60	7	13	29	37	51	63	69	75	82		

Gráfica 9. *Porcentaje de Morfogénesis*
 Exp. III.2 Edo. Inmaduro



Lote 4
 Lote 3
 Lote 2
 Lote 1

Experimento III.2. Determinación de las Dosis óptimas

Tabla 10.

Estado Fisiológico Inmaduro.

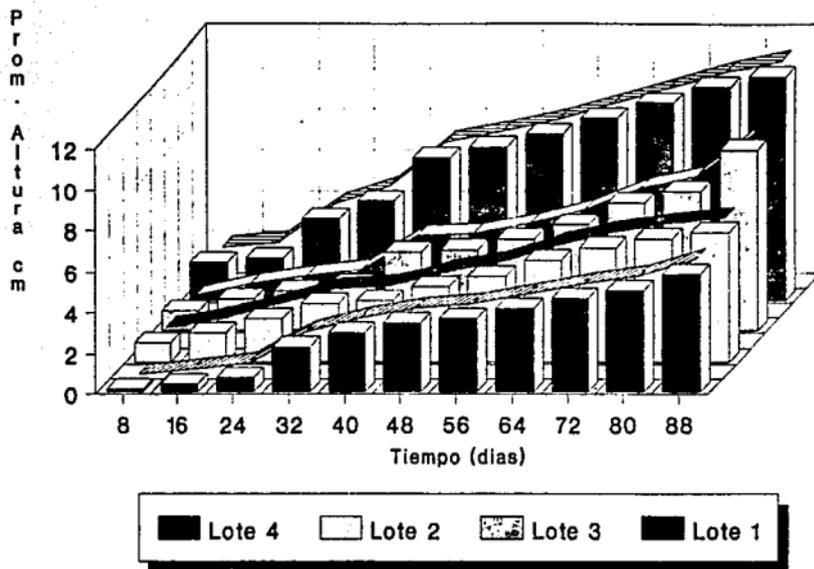
PROMEDIO DE ALTURAS

Lote	Dosis (Gys.)	PROMEDIO DE ALTURA CM/DIAS										
		8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88
1	0.0	1.9	2.10	4.0	4.9	7.0	7.5	8.1	8.9	9.7	10.5	11.0
2	3.5	0.91	1.4	2.1	2.86	3.0	3.7	4.2	5.0	5.6	6.0	6.3
3	5.0	1.0	1.6	2.0	2.3	2.9	4.0	4.5	5.2	6.3	7.2	8.9
4	7.5	0.14	0.4	0.72	1.0	1.3	1.4	1.7	1.7	1.9	2.0	2.2

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Gráfica 10.

Promedio de alturas
Exp. III.2 Estado Inmaduro



Exp. III.1 vs. III.2. Determinación de las Dosis óptimas In vitro

Tabla 11.

COMPARACION ENTRE ESTADOS FISIOLÓGICOS
PORCENTAJE DE MORFOGENESIS

Lote	No. de Org.	Dosis (Gys)	No. de merist.	Porcentaje de Desarrollo / días									
				16	24	32	40	48	56	64	72	80	
A	10	0.0	60	61	78	100							
1	10	0.0	60	60	77	100							
B	10	3.5	60	54	69	75	97	100					
2	10	3.5	60	52	60	69	79	90	100				
C	10	5.0	60	60	73	89	100						
3	10	5.0	60	58	67	74	85	100					
D	10	7.5	60	15	28	34	44	52	60	74	80	89	
4	10	7.5	60	7	13	29	37	51	63	69	75	82	

Exp. III.1 vs. III.2. Determinación de las Dosis óptimas In vitro

Tabla 12.

COMPARACION ENTRE ESTADOS FISIOLÓGICOS

PROMEDIO DE ALTURAS

Lote	PROMEDIO DE ALTURA CM/DIAS										
	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88
A	1.9	2.10	4.0	4.9	7.0	7.5	8.1	8.9	9.7	10.5	11.0
1	1.9	2.10	4.0	4.9	7.0	7.5	8.1	8.9	9.7	10.5	11.0
B	1.4	1.90	2.8	3.5	4.0	4.6	5.5	6.4	7.3	7.8	8.3
2	0.91	1.4	2.1	2.86	3.0	3.7	4.2	5.0	5.6	6.0	6.3
C	1.60	2.00	3.8	4.5	5.7	6.8	7.4	8.0	8.9	9.7	10.2
3	1.0	1.6	2.0	2.3	2.9	4.0	4.5	5.2	6.3	6.9	8.9
D	0.9	1.26	1.82	2.2	2.9	3.38	3.6	4.1	4.6	5.0	5.8
4	0.14	0.4	0.72	1.0	1.3	1.4	1.7	1.7	1.9	2.0	2.2

Exp. III.1. Determinación de las Dosis óptimas In vitro

Tabla 13.

Estado Fisiológico Maduro.

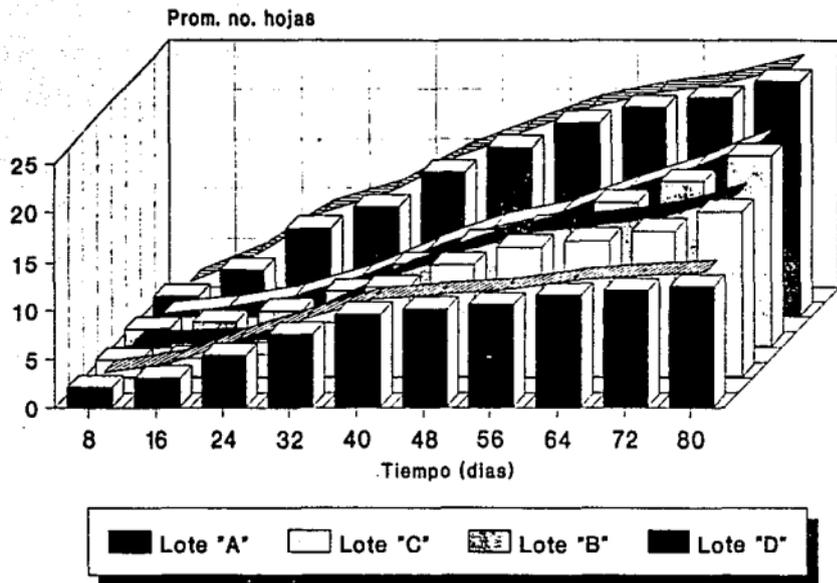
PROMEDIO DE HOJAS DESARROLLADAS

Lote	Dosis (Gys)	Número de hojas / días									
		8	16	24	32	40	48	56	64	72	80
A	0.0	2.0	3.0	5.3	7.4	9.4	10.0	10.5	11.5	12.0	12.4
B	3.5	1.7	2.4	3.6	5.7	8.5	10.7	12.1	14.6	16.8	19.4
C	5.0	1.7	1.9	2.3	5.5	9.2	11.6	13.4	14.0	14.9	16.8
D	7.5	2.0	4.8	8.9	11.0	14.6	17.1	19.5	21.0	22.0	23.8

Promedio de Hojas Desarrolladas

Exp. III.1 Floración

Gráfica 13.



Exp. III.2. Determinación de las Dosis óptimas In vitro

Tabla 14.

Estado Fisiológico Maduro.

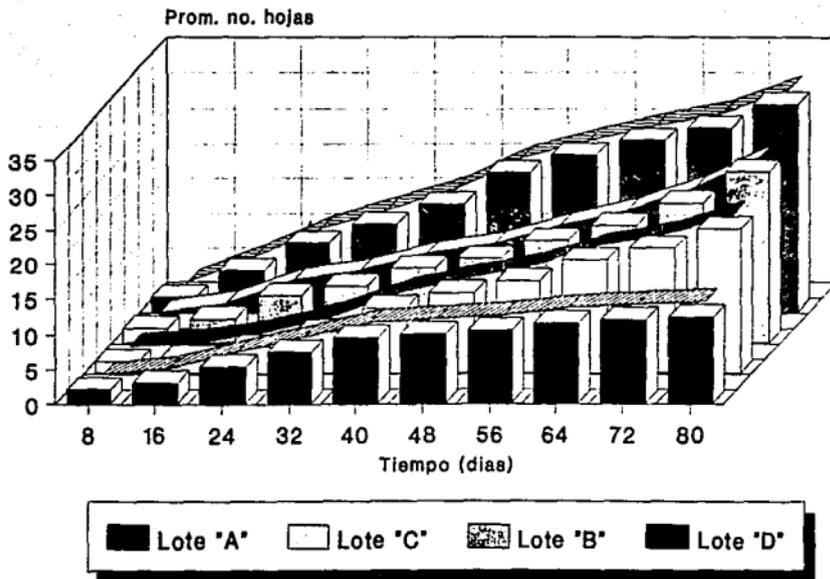
PROMEDIO DE HOJAS DESARROLLADAS

Lote	Dosis (Gys)	Número de hojas / días									
		8	16	24	32	40	48	56	64	72	80
1	0.0	2.0	3.0	5.3	7.4	9.4	10.0	10.5	11.5	12.0	12.4
2	3.5	2.1	3.4	6.6	7.9	10.5	11.9	14.6	16.8	20.0	24.5
3	5.0	1.7	2.4	3.8	6.0	9.2	11.3	13.0	16.0	17.8	20.7
4	7.5	2.0	5.8	9.9	12.6	15.4	19.9	22.5	24.7	26.5	29.8

Promedio del Numero de Hojas

Experimento III.2 Inmaduro

Gráfica 14



Exp. III.1. vs. III.2. Determinación de las Dosis óptimas In vitro

Tabla 15.

COMPARACION ENTRE ESTADOS FISIOLÓGICOS

PROMEDIO DEL NUMERO DE HOJAS

Lote	Dosis (Gys)	Número de hojas / días									
		8	16	24	32	40	48	56	64	72	80
A	0.0	2.0	3.0	5.3	7.4	9.4	10.0	10.5	11.5	12.0	12.4
1	0.0	2.0	3.0	5.3	7.4	9.4	10.0	10.5	11.5	12.0	12.4
B	3.5	1.7	2.4	3.6	5.7	8.5	10.7	12.1	14.6	16.8	19.4
2	3.5	2.1	3.4	6.6	7.9	10.5	11.9	14.6	16.8	20.0	24.5
C	5.0	1.7	1.9	2.3	5.5	9.2	11.6	13.4	14.0	14.9	16.8
3	5.0	1.7	2.4	3.8	6.0	9.2	11.3	13.0	16.0	17.8	20.7
D	7.5	2.0	4.8	8.9	11.0	14.6	17.1	19.5	21.0	22.0	23.8
4	7.5	2.0	5.8	9.9	12.6	15.4	19.9	22.5	24.7	26.5	29.8

Experimento III.1 Determinación de las Dosis óptimas In vitro

Estado fisiológico maduro

CUADRO NUMERO 3.

MODIFICACIONES AL FENOTIPO

Organo o sistema alterado	Dosis en Gys.		
	2.5	5.0	7.5
<u>HOJAS:</u>			
- INCREMENTO EN EL NUMERO EN LA BASE DEL TALLO	**	**	**
- DISMINUCION EN EL TAMAÑO	*	*	**
- FORMACION DE PEQUEÑAS DEPRESIONES EN EL HAZ	**	*	**
- TENDENCIA A UN CRECIMIENTO ENROSCADO	**		**
<u>SISTEMA RADICULAR:</u>			
- CARENCIA TOTAL O PARCIAL	**	**	**

Nota:

- ** Presente por lo menos en el 70% de individuos y/o presente a lo largo del desarrollo.
- * Presente en el 50% de individuos y/o presente en algunos períodos.

Experimento III.2 Determinación de las Dosis idóneas In vitro

Estado fisiológico Inmaduro

CUADRO NUMERO 4.

MODIFICACIONES AL FENOTIPO

Organo o sistema alterado	Dosis en Gys.		
	1.5	5.0	7.5
HOJAS:			
- INCREMENTO EN EL NUMERO EN LA BASE DEL TALLO	**	**	**
- DISMINUCION EN EL TAMAÑO	**	*	**
- FORMACION DE PEQUEÑAS DEPRESIONES EN EL HAZ	**	*	**
- TENDENCIA A UN CRECIMIENTO ENROSCADO	**		**
- TENDENCIA A UN CRECIMIENTO EN FORMA DE ROSETA		*	
SISTEMA RADICULAR:			
- CARENCIA TOTAL O PARCIAL	**	**	**
TALLO			
DISMINUCION EN EL DIAMETRO			**
OTROS:			
- TENDENCIA A LA ACTIVACION DE MERISTEMOS ADVENTICIOS			**
- TENDENCIA A LA FORMACION DE MULTIMERISTEMOS.			**

Nota: significancia similar al cuadro anterior.

Exp. III.3. Aplicación de las dosis óptimas en estado
fisiológico inmaduro

Los resultados reportados en el experimento III.3 se obtuvieron entre 140 y 180 días después del tratamiento. En este experimento se pudieron confirmar las tendencias observadas en el experimento III.2.:

- Disminución en el Porcentaje de Morfogénesis y en el Porcentaje de Altura.
- Aumento en el número de hojas

Asímismo fué posible calcular el Porcentaje de Floración (tabla no. 17), donde se presenta una disminución considerable respecto al testigo, destacando una vez más las respuestas presentadas por los meristemas irradiados a 7.5 Gys.

Respecto a los cambios al fenotipo (Cuadro 5), las tendencias de activación de los meristemas adventicios se continuó en todos aquellos irradiados a 7.5 Gys. y sembrados junto con sus dos primordios foliares produciendo 3 ó 4 plántulas en cada tubo (fotografía no. 4). Dichas plántulas presentaron numerosas "minihojas", sobre todo en la base del tallo, enroscadas y con gran cantidad de depresiones en el haz (fotografía no. 5). El tallo de estas plántulas presento un adelgazamiento con un diámetro promedio de 0.5 cm. al cabo de 15 semanas de desarrollo.

La formación de multimeristemas se observó entre la 5a. y 6a. semana de desarrollo produciendo un aglutinamiento primero de pequeñas "yemitas" y posteriormente de "minihojas" en el tubo de ensaye (fig. no. 4, fotografía 6), por lo que cada multiformación fué subcultivada en recipientes más amplios (fig. 5).

Estas formaciones provocaron el desarrollo de aproximadamente 15 pequeños individuos por cada meristema irradiado, presentando un aspecto de "miniselva", es decir un crecimiento 1:15 en lugar de 1:1 como el testigo (fig. no. 6, fotografía no. 7).

Al cabo de 10 semanas se observó la tendencia a la formación de callo el cual, se manifestó a las 15 semanas como una masa grande y compacta de color verde en lugar de un sistema radicular (fig.no. 7, fotografía 8). Debido a ésto las plántulas no lograron ambientarse por lo que fué necesario determinar un nuevo medio nutritivo para la inducción de sistema radicular.

Exp. III.3 Aplicación de las dosis óptimas

tabla 16.

Estado fisiológico Inmaduro.

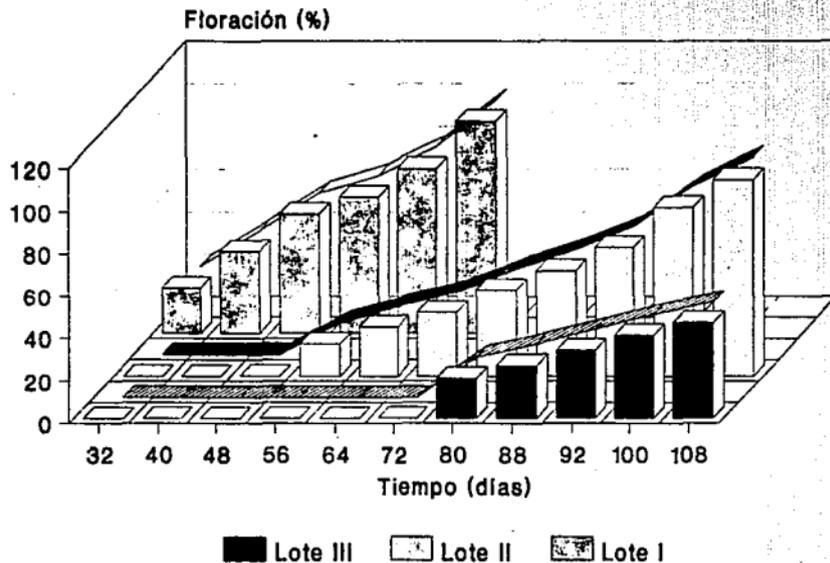
Porcentaje de floración

Lotes	Dosis en Gys.	Porcentaje de floración en días										
		32	40	48	56	64	72	80	88	92	100	108
I	0.0	22	39	57	65	78	100					
II	3.5	-	-	-	15	23	30	41	50	61	80	93
III	7.5		-	-	-	-	-	19	25	32	39	45

Porcentaje de Floración

Exp. III.3

Gráfica 16.



Exp. III.3 Aplicación de las dosis óptimas

CUADRO NO. 5.

Estado fisiológico Inmaduro.

MODIFICACIONES AL FENOTIPO

HOJAS
INCREMENTO EN EL NUMERO, UBICADAS PRINCIPALMENTE EN LA BASE DEL TALLO DISMINUCION EN EL TAMAÑO PRESENCIA DE PEQUEÑAS DEPRESIONES CRECIMIENTO ENROSCADO
TALLO:
DISMINUCION EN EL DIAMETRO (0.5 CM.)
SISTEMA RADICULAR:
AUSENCIA TOTAL, PRESENCIA DE UN CALLO COMPACTO Y GRANDE
OTROS:
ACTIVACION DE LOS MERISTEMOS ADVENTICIOS - FORMACION DE 3-4 INDIVIDUOS POR MERISTEMO FORMACION DE MULTIMERISTEMOS - ÓBTENCION DE 15 INDIVIDUOS POR MERISTEMO

Experimento III.4. Determinación del medio nutritivo para inducir raíz en las plantas irradiadas a 7.5 Gys.

Como se observa en la tabla no. 17 cinco medios nutritivos fueron elaborados resultando el denominado como "5" el óptimo para el desarrollo de raíz en las plántulas irradiadas, ya que, como se muestra en la gráfica no. 18 en este medio se induce un sistema radicular en el 79% de los individuos, aunque débil y escaso, después de 12 semanas de efectuado el trasvasado (fotografía no. 9).

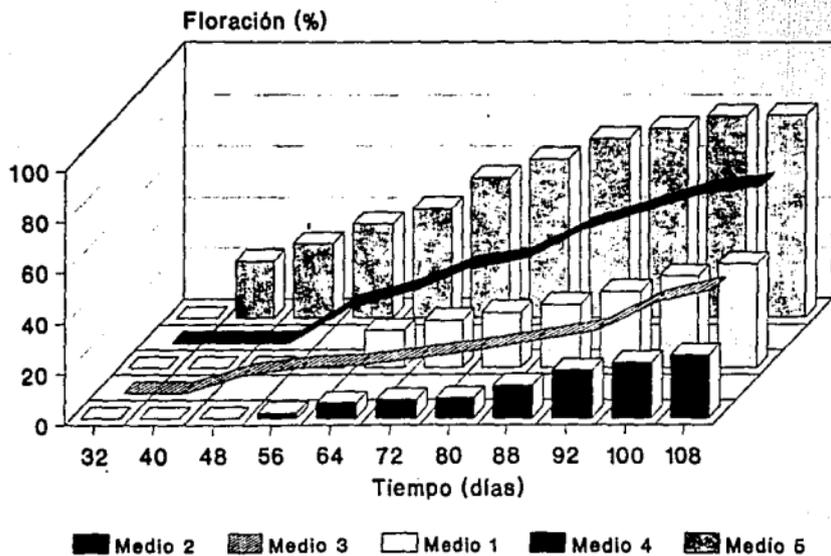
Sin embargo las plántulas con raíz presentaron una alteración en el estado cuatro (ambientación) originada posiblemente a alguna alteración en su sistema metabólico y a la alta contaminación del sustrato con hongos y bacterias, lo que impidió que esta ambientación tuviera éxito después de 225 días.

Debido a estos cambios se decidió, fuera del protocolo de esta tesis, realizar una resiembra de los minimeristemas obtenidos al irradiar a 7.5 Gys.

Porcentaje de Sistema Radicular inducido

Gráfica 17

Exp. III.4



Exp. III.4 Determinación del medio nutritivo óptimo
para el desarrollo de sistema radicular para meristemas
irradiados in vitro a 7.5 Gys.

tabla 17.

Porcentaje de sistema radical inducido

Medio No.	Porcentaje de individuos con raíz en días										
	32	40	48	56	64	72	80	88	92	100	108
1					15	19	22	25.11	30	36	41
2	-	-	-	2	6	7.3	8.0	13	19	22	25
3			7	10	11	14	17	21	25	36	41
4	-			14	20	29	33	45	52	59	62
5		22	29	37	43	55	62	70	74	79	79.5

Experimento III.5 Resiembra de los minimeristemas
obtenidos de plántulas irradiadas a 7.5 Gys.

Los datos obtenidos en el experimento III.5 revelaron resultados no esperados no obstante significativos, ya que no se presentó alteración ni en : el desarrollo, el crecimiento, las hojas y el sistema radicular.

Sin embargo una decoloración en las hojas apareció en un 80% de los individuos, produciendo plántulas con hojas variegadas (fotografía no. 10).

Así mismo se desarrolló un sistema radicular, aunque débil y poco numeroso, permitiendo la adaptación de dichas plántulas a tierra (fotografía 11).

Por otra parte se observó en un 53% de las plántulas flores con pétalos de perímetro color morado (fotografía 12).

Debido a alteraciones en relación a los factores extrínsecos durante la ambientación de las plántulas, éstas no lograron la adaptación ya que por una parte un 65% de estas fueron invadidas por hongos y el resto pereció debido a una secuencia de oscilaciones bruscas de temperatura.

Exp. IV.1. Determinación de la Dosis Letal 50 "in vivo"

Los resultados obtenidos en este experimento revelan que al irradiar "in vivo" las plantas en estado inmaduro en un rango de 1.0 a 15 Gys., hasta 9.0 Gys. mantuvieron su desarrollo al 100% , a 10 Gys. presentaron un 16.6 % de sobrevivencia y a 15 Gys. se advierte una tasa de sobrevivencia del 49% (tabla 18, gráfica 18).

Por otra parte al término de 30 días post-tratamiento, no se observaron cambios en el fenotipo de dichas plantas.

Experimento IV.1. Determinación de la dosis
letal 50 "in vivo"

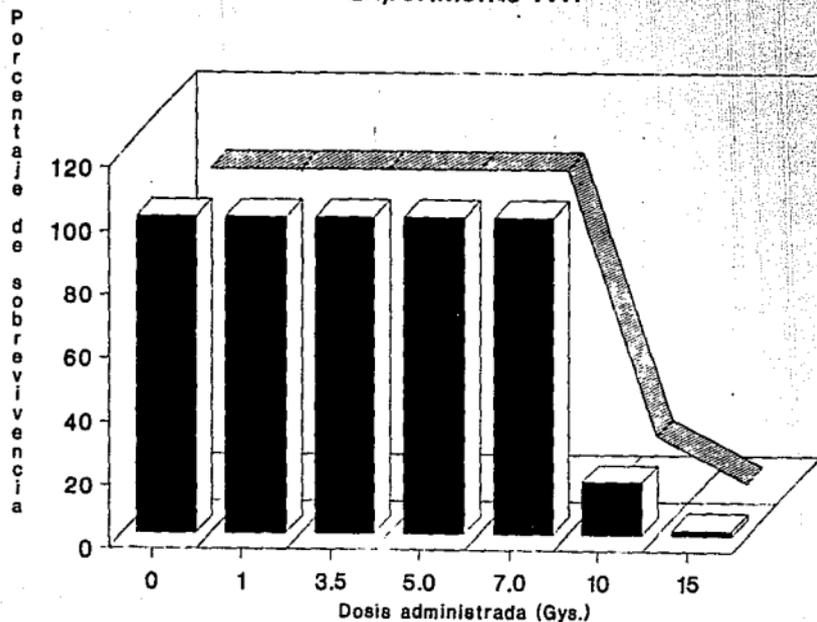
Tabla no. 18

LD so IN VIVO

Lote	No. de Organismos	Dosis (Gys)	Número de Sobrevivientes	Porcentaje de Supervivencia
I'	3	0.0	3	100
II'	3	1.0	3	100
III'	3	3.5	3	100
IV	3	5.0	3	100
V	3	7.0	3	100
VI	3	10.0	.5	16.6
VII	3	15.0	1.47	49.

Gráfica 18.

Dosis Letal 50 In Vivo
Experimento IV.1



Exp. IV.2 Determinación de las posibles dosis óptimas.

Las plantas irradiados a 0.0 3.5 Gys. no presentaron alteraciones significativas en cuanto a su desarrollo sin embargo, en las plantas irradiadas a 7.5 Gys. se observa un ligero descenso en la etapa de crecimiento en las primeras semanas pero se ve restablecido a la 5a. semana, como se muestra en la tabla no 19.

En cuanto al fenotipo de las plantas no se observaron modificaciones a dosis de 3.5 y 5.0 Gys. sin embargo se observaron pequeñas ondulaciones en las hojas de las plantas irradiadas a 7.5 Gys. (fotografía no. 13).

Es necesario mencionar que a dosis de 5.0 y 7.5 Gys. se observó que aparentemente las plantas presentaron mayor resistencia al frio.

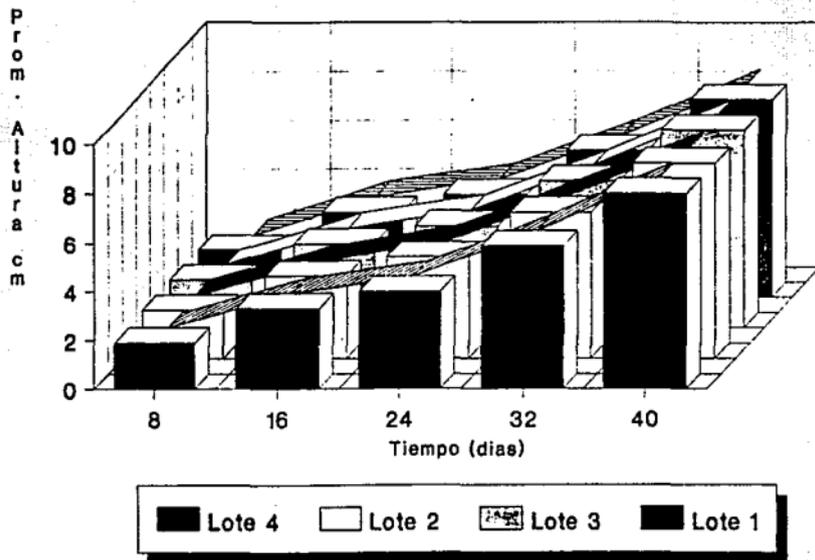
Experimento IV.2. Determinación de las posibles dosis óptimas

Tabla no. 19

PROMEDIO DE ALTURAS OBTENIDAS EN LAS
PLANTAS IRRADIADAS -IN VIVO..

Lote	Dosis (Gys)	Promedio de altura (cm. /días)				
		8	16	24	32	40
1	0.0	2	3.5	4.2	6.0	8.1
2	3.5	2	3.4	4.2	6.0	8.0
3	5.0	2	3.5	4.2	6.0	8.1
4	7.5	1.9	3.3	4.0	5.9	8.0

Gráfica 19. *Promedio de alturas In Vivo*
Exp. IV.2



DISCUSION

Exp. I.I.

Determinación del Medio Nutritivo Optimo para el desarrollo de los meristemos de *Petunia hybrida*

Las respuestas encontradas en el desarrollo de los implantes en los medios nutritivos pueden atribuirse, en gran medida a la concentración de sales minerales utilizadas en la preparación de cada uno de ellos ya que los medios preparados con las sales descritas por Nitch (medio "N" y "n") se caracterizan por tener una baja concentración de las mismas y de carecer de Ioduro de Potasio y manganeso (19). Estos parámetros pudieron también influir en la clorosis presentada en las plántulas ya que estos elementos intervienen en la absorción de luz para efectuar la fotosíntesis, según lo descrito por Devlin (26).

Por otro lado podemos decir que las fitohormonas Benzil Amino Purina (BAP) y Acido Naftalen Acético (ANA) en concentraciones de 1×10^{-5} y 1×10^{-7} adicionadas a la proporción de sales, vitaminas, fierro, sulfatos, etc. descritos en el medio ..L.. son las adecuadas para el desarrollo apropiado de los meristemos de *Petunia hybrida* Hort., ya que los implantes presentan un desarrollo, crecimiento y morfogénesis normal sin necesidad de adicionar alguna otra fitohormona o realizar un subcultivo posterior para producir la inducción de un sistema radicular o estado de floración. Lo anterior respalda lo reportado por Cruz (63) y Economou (64) quienes mencionan que dichas fitohormonas son las apropiadas para el desarrollo de *Petunia hybrida* y que la concentración de cada una de ellas será específica para el tipo de explante utilizado.

Así mismo se determina que la adición de Acido Giberélico 3

(AG₃) no provoca un incremento en la activación de los meristemas de dicha especie, ya que el medio "L" carece de ella; lo que nos lleva a pensar que los meristemas sintetizan dicha fitohormona de una manera " natural " bajo los parámetros utilizados en el desarrollo de los meristemas en el medio "L".

Exp II.1. y II.2.

Determinación de la Dosis Letal 50 (DL50) In Vitro:

Estados Fisiológicos de madurez e inmaduro.

De acuerdo a los datos encontrados podemos decir que la dosis letal 50 adecuada para la irradiación de plántulas de Petunia hybrida se encuentran entre 1.0 y 9.0 Gys. disminuyendo ligeramente hasta 8.0 Gys. para plántulas en estado fisiológico inmaduro. Estos rangos son considerablemente pequeños que los aplicados a plantas completas In Vivo, o semillas (entre 100 y 800 Gys.) debido a que como menciona Devreux (65) los meristemas presentan una mayor radiosensibilidad originada seguramente en la acelerada actividad de estos tejidos, provocando con ello una mayor concentración de moléculas como las bases constituyentes de DNA que, como se menciona en diferentes reportes (55, 56 y 66) facilitan una mayor producción de ionización, provocando una alteración en el material irradiado. Aunado a esto el campo de irradiación se reduce In Vitro, permitiendo con ello elevar la probabilidad de expresión de las posibles células mutadas durante la selección diplóntica.

Exp III.1. y III.2.

Determinación de las dosis óptimas "in vitro"
Estado maduro e inmaduro.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los experimentos III.1 aplicación de las dosis en etapa de floración o maduro y III.2 inmaduro, se puede asumir que este último es el estado radiosensible óptimo para inducir cambios somáticos y tal vez genéticos en las plántulas de Petunia hybrida, lo que concuerda con lo sugerido por Cruz (56) quien menciona a los estados juveniles como óptimos para efectuar estudios mutagénicos. El grado de radiosensibilidad parece ser característico de cada especie y de cada estado fisiológico en el que se trabaje, lo que podría deberse a diversos factores tanto externos como internos en los que el material vegetal se desarrolla. Externos como el tipo de radiación administrada, el microambiente (como temperatura, humedad, pH, etc.) predominantes durante y post-tratamiento. Los factores internos es decir, inherentes a la planta, como la cantidad de material genético o la concentración de sustancias, como las fitohormonas, incrementan la posibilidad de que la ionización se efectúe (55), produciendo una alteración en el material genético la que podría manifestarse inmediatamente o en las subsecuentes generaciones.

Por otra parte los efectos observados demuestran que en las dosis mas bajas se producen un mayor número de cambios que en la dosis intermedia, es decir de 5.0 Gys., aún en estado fisiológico inmaduro. Por tal motivo se seleccionó como las dosis óptimas para ambos estados fisiológicos: 3.5 y 7.5 Gys. Según Cornú en 1970 la frecuencia de mutantes somáticos en Petunia hybrida "in vivo" es directamente proporcional a la dosis aplicada; lo anterior no concuerda con los resultados preliminares encontrados por Guzmán en 1991 (67); quien menciona haber encontrado un número de cambios similares a dosis extremas: o muy altas (10.0

Gys.) o muy bajas (0.04 Gys.); ni tampoco con los resultados encontrados en los experimentos III.1 y III.2 de este trabajo. Así mismo se puede observar que el rango de dosis utilizado es muy pequeño comparado con los empleados para otras plantas de ornato lo que facilita su aplicación y repetición por una parte y por la otra permite la búsqueda de respuestas en dosis nunca suministradas a ningún explante o estado fisiológico de Petunia hybrida.

Las tendencias de activación de los meristemas, nos condujo a la elaboración del experimento III.3 y IV.2 omitiendo por el momento alguna explicación hipotética del origen de todos los cambios somáticos presentados por las plántulas obtenidas.

Experimento III.3

Irradiación de la dosis óptima en estado fisiológico Inmaduro.

En busca de la determinación de los parámetros que son afectados por los diferentes tratamientos, se desecharon los factores extrínsecos involucrados durante y post - tratamiento ya que ninguno de los testigos presentaron cambios siquiera cercanos a los observados en alguna dosis.

Los resultados observados en este experimento revelan que los cambios obtenidos pudieron ser producto de alteraciones hormonales provocadas por la interacción de los rayos gamma con las células, mismas que afectaron el fenotipo de las plántulas.

Por otro lado el desarrollo de una planta representa los diferentes eventos durante el ciclo de vida; éstos se encuentran ligados, ya que por una parte si no se efectúa el primero el segundo no se realiza y por la otra, ambos necesitan de soluciones similares en ciertas etapas, por lo tanto esta discusión se presenta agrupando los eventos "similares" para facilitar su explicación.

Disminución en el porcentaje de desarrollo y altura.

Se ha mencionado que la irradiación gamma para *Petunia hybrida* no produce alteraciones en cuanto a su desarrollo (68 y 69). Sin embargo nuestros resultados revelaron lo contrario, lo que concuerda con lo obtenido en estudios realizados con *Nicotiana* (70), *Strelitzia* (71) y *Weigella* (72) tratadas con diferentes dosis de radiación gamma. Dicha respuesta se puede deber a las dosis empleadas en el presente estudio, que comparadas con las utilizadas en trabajos anteriores resultan

insignificantes. Lo anterior es contradictorio a la idea que se tiene sobre que " el grado de respuesta es inversamente proporcional a la dosis suministrada " sin embargo debemos recordar que:

1o. La irradiación *in vitro* permite enfocar el tratamiento a una zona específica del organismo (73),

2o. El meristemo, en este caso la zona enfocada, tiene la propiedad de "absorber" los cambios y expresarlos casi inmediatamente debido a su carácter totipotente (Malgara, 1988).

Por otro lado, cualquier explante sembrado *in vitro* necesita, una vez que se ha ambientado a su medio artificial, alimentarse para poder realizar la división celular o mitosis; puede pensarse que el ciclo de vida de las células meristemáticas se haya retardado por la radiación en la etapa de síntesis de proteínas, idea que concuerda con los estudios realizados por Nybom (74), quien menciona que las radiaciones gamma tienen una alta penetrabilidad, lo que permite ionizar elementos como bases y proteínas del DNA y alterar con ello, cualquier etapa del ciclo celular.

Los resultados obtenidos en la disminución del porcentaje de crecimiento reafirman las observaciones realizadas por varios autores (75 y 76) los cuales mencionan que una respuesta ..común.. en los organismos vegetales irradiados a cierta dosis (variando de acuerdo a la especie con la que se trabaje), es la alteración en cuanto a su talla. Lo anterior nos hace suponer que es la síntesis de sustancias implicadas en el crecimiento como el AG₃ uno de los procesos alterados al irradiar las petunias *in vitro*, provocando con ello la producción de plántulas "enanás", después de 6 meses de realizado el tratamiento. Parece ser que tal efecto recae en un gen único que regula la síntesis de dicha

fitohormona (25), el cual al ser inactivado por algún parámetro externo o interno se ve inhibido y puede reactivarse al adicionar AG₃ en "grandes" cantidades. Lo anterior se confirmó ya que las plántulas obtenidas a dosis de 7.5 Gys. se trataron con aspersiones de AG₃ al 0.10% recuperando su altura normal después de 2 semanas.

Cambios en la morfología de las hojas y ausencia de sistema radicular

Las auxinas intervienen en la estimulación del alargamiento celular, en la plasticidad de la pared celular y en la formación y morfología del sistema radicular. Además la interacción de diversas fitohormonas permite la producción de otros órganos como las hojas. Su concentración es específica en cada zona de la planta, sea alargamiento del tallo, de la hoja, división de las células meristemáticas o producción de raíz. A pesar de que no todos los procesos anteriores han sido confirmados, podemos asumir que la producción, síntesis o absorción del AIA (auxina natural presente en altas concentraciones en los meristemas) fueron alteradas por los rayos gamma en las plántulas irradiadas; en los primeros días de desarrollo ésta pudo ser parcialmente inactivada lo que conjugado con la ausencia de ácido giberélico, retardó la división celular y por lo tanto el crecimiento de las plántulas.

Es posible que, el AIA se reactivó en los meristemas y promovió con ello, un alargamiento celular desordenado, lo que dió origen a la producción de hojas con características diferentes a las paternas, en cuanto a su forma y plasticidad, hojas pequeñas con pedúnculo delgado, hojas anchas y encorvadas, estas alteraciones se han observados en plantas de chícharo tratadas con altas concentraciones de AIA (77), así como en plántulas de avena (78).

Por último se ha mencionado que durante el proceso de rizogénesis es necesario una baja concentración de AIA, en relación con la requerida para activar la división en los meristemas, ésto nos conduce a pensar que el AIA se incrementó en dicha etapa lo que provocó, no una aceleración de este proceso sino por el contrario una inhibición total de rizogénesis originándose por otro lado una división anárquica y desmesurada de células, formando una masa informe, lo que en cultivo de tejidos recibe el nombre de callo. Lo mencionado por diversos autores respaldan esta hipótesis puesto que cuando en sus cultivos la concentración de Auxinas es muy alta se encuentra tendencia hacia la formación de callo (79 y 80).

Reactivación de los meristemas adventicios y formación de multimeristemas.

Gambor en 1975, recomendó que para el éxito del cultivo de tejidos vegetales, el medio nutritivo debe contener una proporción alta de citocininas en comparación con las concentración de auxinas, ya que ésto inducirá a morfogénesis de cualquier explante (81). Sin embargo, Rosas y Quiróz (82) han reportado la obtención de plántulas completas y sanas en ausencia de éstas.

Los estudios sobre fisiología vegetal han revelado que efectivamente las citocininas inducen la división celular y que se encuentran en altas cantidades en las células de gran actividad como los meristemas (83).

Parece ser que los meristemas al ser inoculados en determinados medios nutritivos, pueden activar por sí mismos la síntesis de las fitohormonas en un equilibrio óptimo; sin embargo cuando no se produce la activación es necesario la aplicación externa de estas sustancias para que se inicie la morfogénesis meristemática.

Se asume que en los meristemas irradiados a 7.5 Gys. aumenta la concentración de citoquininas, sin embargo no se debe en modo alguno a un incremento en su síntesis sino por el contrario, como se ha mencionado anteriormente, a la baja concentración de auxinas. Esto concuerda con los estudios realizados por Rao (84) acerca del control hormonal sobre el desarrollo de los tallos, raíces y hojas en los explantes de algunas especies de Petunia, a diversas concentraciones de AIA, BAP, ANA. Cuando existe una gran cantidad de benzil amino purina en comparación con las concentraciones de AIA se induce la actividad de los meristemas adventicios.

Por otra parte Sharma (85) apoya que la formación de multimeristemas se induce por altas concentraciones de citoquininas en medios suplementados con BAP.

Experimento III.4

Determinación del medio nutritivo para inducir raíz en las plantas irradiadas a 7.5 Gys.

Estos resultados confirman la hipótesis donde se supone que una de las fitohormonas implicadas en las modificaciones de la hoja así como en la carencia de un sistema radicular es el Acido indolacético. El medio 5 provocó una inducción de raíz en un porcentaje elevado en las plántulas tratadas, sin embargo la constitución de dicha estructura no era del todo favorable. Recordemos que las auxinas como todas las fitohormonas se requieren en proporciones específicas, dependiendo de la zona vegetal involucrada y que de acuerdo a la proporción en que se encuentren modifican, impiden, aceleran o alteran la producción y estado fisiológico del sistema. Tal vez la concentración de AIA utilizado en el medio nutritivo "5" sea la correcta para inducir rizogénesis en estas plántulas, sin embargo podría ser posible la determinación de un nuevo medio que induzca mayor porcentaje de raíz mas fuerte y numerosa que la encontrada en este experimento.

Dentro de las alteraciones observadas por algunas especies vegetales irradiadas, se han presentado ciertas respuestas negativas, como la disminución en el grado de adaptabilidad de las plantas al medio ambiente, caso contrario a lo observado con otras especies que incrementan su vigor como la papa (Solanum tuberosum) (86) y el toloache (Datura stramonium) (87).

Esto nos hace pensar que tal vez la alteración en la resistencia de los organismos se ve afectada no sólo por la falta de un sistema radicular adecuado, sino también por modificaciones genéticas no manifestadas en esta generación ya que, de acuerdo a lo mencionado en el Manual Mutations Breedings (88) cuando el

plastidom, herencia extranuclear, es alterado por algún mutágeno el vigor de la planta puede verse modificado positiva o negativamente.

Experimento III.5 Resiembra de los minimeristemas
obtenidos de plántulas irradiadas a 7.5 Gys.

Este experimento se realizó en virtud de la dificultad que presentaron las plántulas resultantes de la irradiación a 7.5 Gys. durante la el estado IV, es decir la ambientación, por una parte. Por la otra a lo que el investigador Basilio Donini, mencionó durante el Seminario sobre el uso de las radiaciones gamma (49), "las alteraciones somáticas o genéticas provocadas por la aplicación de un mutágeno pueden o no ser expresadas en la primera o segunda generación". Por consiguiente el objetivo de este punto consistió en destacar las alteraciones que pudieran presentarse en la segunda generación.

Los resultados nos hacen suponer que en esta segunda generación. los meristemas recuperaron el equilibrio hormonal puesto que las etapas del desarrollo como morfogénesis, crecimiento y floración se presentaron normalmente.

Las deficiencias clorofílicas en los meristemas irradiados a 7.5 Gys. y resembrados, pudieron deberse a alteraciones en el material genético extranuclear, plasmón o el plastidom. Como se mencionó anteriormente parece ser que estas unidades genéticas influyen en los cloroplastos. Es interesante observar que Cornú encontró estos mismos cambios pero en un porcentaje menor al encontrado en el presente trabajo, cuando irradió semillas de Petunia a latas dosis de rayos gamma (4-6 Krad).

Así mismo las alteraciones en la coloración de los pétalos de las plántulas, pueden ser el resultado de la expresión de quimeras periclinales, en este caso las células periféricas del meristemo, las que presentan alteración en su material genético pero por ser tan sólo un grupo reducido , la selección provoca limitación en

su expresión al realizarse la selección diplóntica. Broertjes ha encontrado resultados similares en semillas irradiadas crisantemo a dosis extremadamente elevadas (10,000 Krad) (89).

IV.1. Determinación de la LD50 "in vivo"

La dosis letal 50 es específica para cada especie y estado fisiológico con el que se trabaje. Nuestros resultados revelan que la dosis letal "in vivo" para plantas de Petunia hybrida es muy similar a la determinada para las plántulas "in vitro" en estado fisiológico maduro.

Esto posiblemente se debe a que las plantas se mantuvieron en el mismo sustrato en el que fueron irradiadas. Recordemos que la radiación provoca ionización lo que implica la liberación de un sinnúmero de moléculas que pudieron provocar la desecación de la tierra en las plantas "in vivo".

Por otro lado las respuestas obtenidas a 15 Gys. son objeto de atención ya que a pesar de obtener una baja tasa de sobrevivencia esta es mayor que la obtenida a dosis de 10 Gys. Como se mencionó anteriormente esto se ha observado en otros experimentos donde las dosis extremas presentan mayores beneficios en ciertas especies animales y vegetales (90).

No se ha encontrado explicación alguna a este fenómeno pero podríamos hacer una extrapolación con los resultados similares que se han encontrado en bacterias y moscas irradiadas (90, 91) donde el sistema de defensa reacciona de acuerdo al tiempo que se tarde en administrarse el mutágeno, es decir un tratamiento crónico ó agudo.

Experimento IV.2 Determinación de las posibles dosis óptimas "in vivo".

Las ondulaciones en las hojas de las plantas irradiadas "in vivo", suponemos que fueron originadas como una respuesta a la alteración del medio ambiente en cuanto a la concentración de partículas "ajenas", producidas por la radiación y no a una alteración química o genética, ya que estos cambios desaparecen poco tiempo después del tratamiento. Estas respuestas se han observado en plantas desarrolladas en medios contaminados por diversos elementos cuando se realiza biomonitorio ambiental con ellas (93).

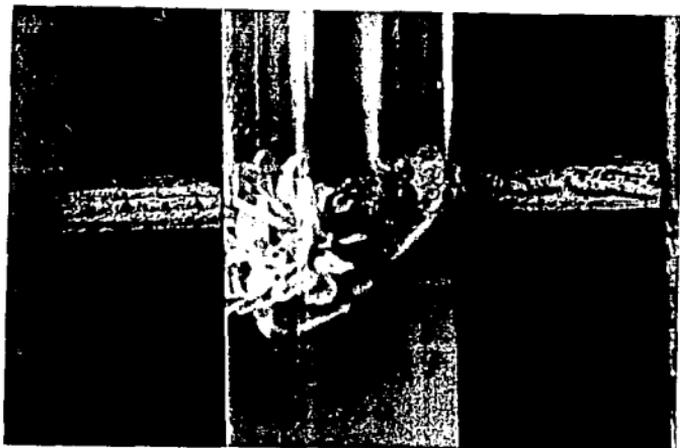
En relación a la tendencia observada por las plantas a la resistencia al frío, no es posible asegurar que la dosis de 7.5 Gys. incrementa dicha resistencia ya que para demostrarlo es necesario realizar experimentos dirigidos hacia este punto.

Los resultados obtenidos en este experimento permiten confirmar que la irradiación "in vitro" produce un mayor número de cambios que los observados "in vivo"; lo anterior se asume ya que las pequeñas alteraciones "sufridas" por el material tratado "in vitro", no son tan numerosas ni tan pronunciadas como las observadas "in vitro".



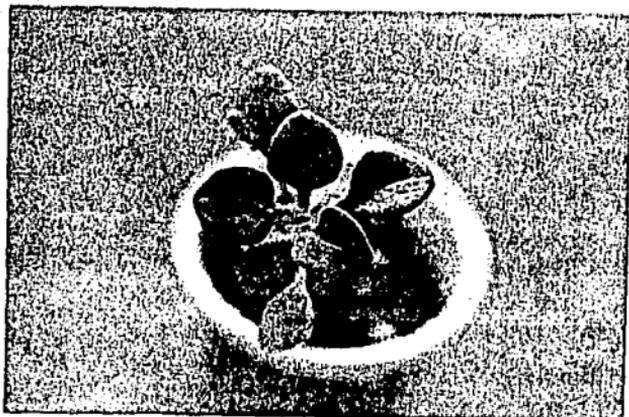
Fotografía 1

Petunias obtenidas en medio "L" pasadas a tierra.



Fotografía 2

Formación de meristemas adventicios desarrollados en los meristemas irradiados al 7.5 G. y s. Una hoja y el meristemo se necrosan y ambos se tornan cafés.



Fotografía 4

Plántula
obtenida de
meristemas
adventicios.



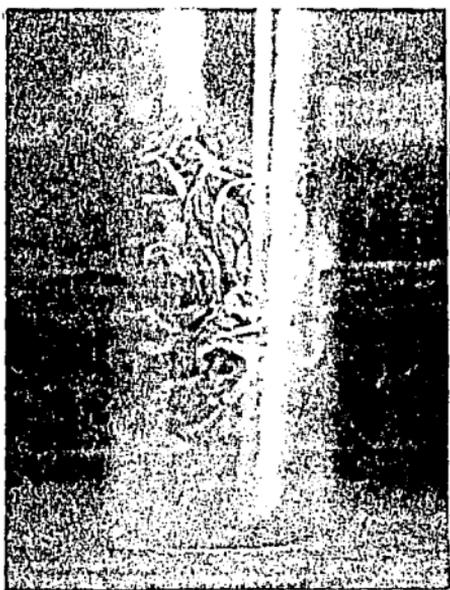
Fotografía 3
Formación de multimeristemas "mini hojas"



Fotografía 5
Hojas enroscadas y con
depressiones, al inicio del
desarrollo.



Fotografía 7
Formación de miniselva.
Una vez en el frasco
amplio.



Fotografía 6
Minihojas aglutinadas en el tubo de ensaye



Fotografía 8
Formación de "Callo". Después de 15
semanas post-tratamiento se observa una
masa verde en la base de las plántulas.



Fotografía 9
Plántula con sistema radical inducido
en el medio "5"



Fotografía 9a
Misma plántula transplantada y ambientada.



Fotografía 10

Hojas variegadas

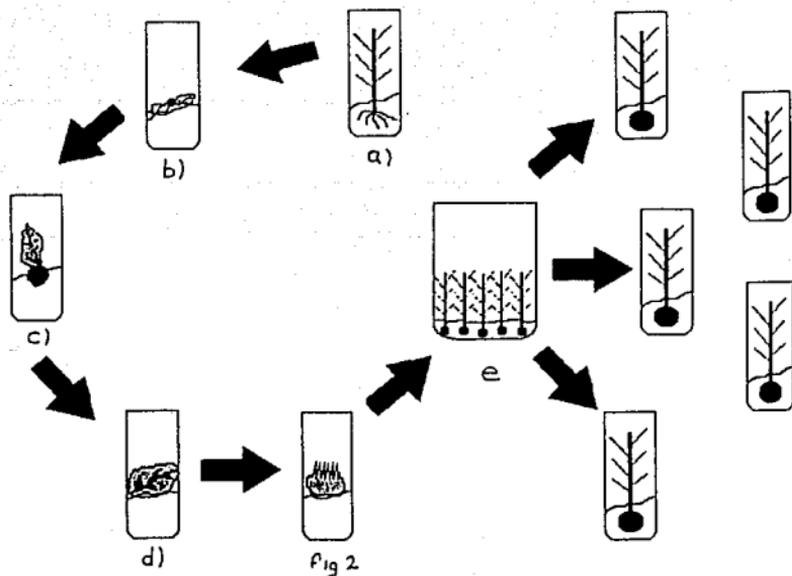


Fotografía 11

Plántula con hojas variegadas
y sistema radical.

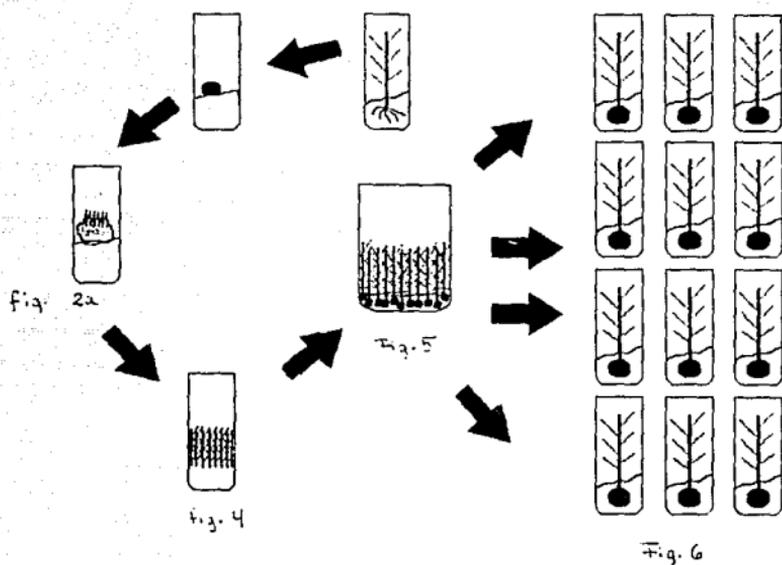


Fotografía 13
Planta "in vivo"
irradiada con
pequeñas depresiones
en las hojas.



**FORMACION DE PLANTULAS POR MEDIO
DE MERISTEMOS ADVENTICIOS**

- | | |
|--|---|
| a) PLANTULA NORMAL | d) APARECEN LOS MERISTEMOS
ADVENTICIOS |
| b) SIEMBRA DEL MERISTEMO CON
SUS PRIMORDIOS | e) FORMACION APROXIMADA DE
5 PLANTULAS CON CALLO |
| c) NECROSIS DE UNA HOJA Y EN
MERISTEMO | |



FORMACION DE PLANTULAS POR
MEDIO DE MULTIMERISTEMOS

- a) PLANTULA NORMAL
- b) SIEMBRA DE MERISTEMO SOLO

CONCLUSIONES.

-Se observó que para el desarrollo "in vitro" de los meristemos de Petunia hybrida es necesario el balance adecuado de dos fitohormonas: benzilamino purina ($a \times 10^{-5}$) y el Acido naftalen acético (1×10^{-7}) adicionadas al medio básico de Mys. Las mejores temperaturas son de 23 a 24 °C y fotoperíodos de día largo.

El estado fisiológico inmaduro, desarrollado "in vitro", presenta una LD₅₀ entre 1 y 8 Gys. mientras que en el estado maduro tiene un ligero incremento de 1.0 Gys. En el primer caso se observa mayor radiosensibilidad por lo que se considera el idóneo para la realización de estudios de mutagénesis.

-Las dosis óptimas para inducir mutaciones "in vitro" en Petunia hybrida son 3.5 y 7.5 Gys. destacando la segunda en ambos estados fisiológicos.

- La irradiación a 7.5 Gys. en la primera generación inhibe la síntesis de ácido giberélico provocada por la alteración de un gen único originando la producción de plántulas "enanas"; esto se concluye en virtud de que al asperjar ácido giberélico se recupera la altura normal de las plántulas. Así mismo se produce un retardo en la síntesis de proteínas, hecho que impide la división celular y por lo tanto el desarrollo; se demora la producción de auxinas lo que provoca por un lado, una alteración en la plasticidad de las hojas dando como resultado un crecimiento enroscado y por el otro se desencadena una división celular desordenada durante la rizogénesis la que da lugar a la producción de un callo en lugar de raíz.

-La diferente concentración de auxinas, por la inhibición de síntesis o absorción de ésta, la baja concentración de giberelinas y la alta de citoquininas, conlleva a la formación de multimeristemos, en el momento de la morfogénesis así mismo se

activa la formación de meristemas adventicios. Estos dos acontecimientos permiten alterar la producción de 1:1 (un organismo un meristemo); obteniendo un desarrollo 1:4 y 1:15 respectivamente.

En la segunda generación se pudo observar lo siguiente:

Obtención de plántulas con hojas variegadas debido a una modificación de tipo epigenético,

Producción de plántulas con pétalos con periferia morada originada por la producción de quimeras.

En cuanto a la irradiación "in vivo" se determinó como LD₅₀ para el estado fisiológico inmaduro un rango entre 1 y 7.5 Gys. Por otro lado, no fue posible determinar dosis óptimas "in vivo" al no producirse cambios evidentes a pesar de haber aplicado las mismas dosis utilizadas "in vitro".

Por consiguiente se demuestra que la irradiación "in vitro" de meristemas permite obtener cambios significativos a bajas dosis y en corto tiempo en comparación con la irradiación "in vivo" ya que es posible realizar un número considerable de tratamientos y seleccionar los clones con características favorables sin invertir para tal efecto, una gran labor espacio y tiempo.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aristóteles. 1990. Metafísica. Austral 16a. ed. 24-38.
- 2.- Steward, F. C.; Shantz, M.O. 1968 The growth-promoting substances from the environment of the embryo. I. The criteria and Measurement of groth-promoting activity and responses induced. American Journal of Botany 43: 45-58.
- 3.- Landjerond. 1976. Knop's solution. Precis de Microscopieé electronic.
- 4.- Butenko,R.G. 1964. The history the development methods for cultivating excided plant tissue. Plant tissue culture and plant morphogenesis. Univ. Mic. Int. 2-9
- 5.- Hussey, G. 1978. The application of tissue culture to the vegetative propagation of plants. Prog. Oxf. 65: 185-208 .
- 6.- Muir, W. H.; Hildebrandt, A.; Riker, A. J. 1957. The preparations. isolation. and growth in culture of single cells from higher plants. American Journal of Botany 45 (8): 589-597
- 7.- Steward, F.C.; Mapes, C, and Mears, R. 1958. Growth and organized development of culture cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. American Journal of Botany. 45 (10): 705-708 .
- 8.- White,, P.,R. 1934. Potentially unlimited growth of exciced the tomato roots tips in a liquid medium. Plant Physiol. 9: 585-600
- 9.- White,, P.,R. 1943a. Handbook of plant tissue culture. Ed. Academic Press. 50-62.

- 10.- Gautheret, M.R.J. 1964. Remarques sur la transformation tumorale des tissus de tabac provoqué par l'acide indolyl-acétique. Bull. Soc. Franc. de Physiologie végétale. 10: 36-43
- 11.-Morel, G. and Martin 1964. La culture in vitro du meristeme apical. Reveu de cytologie al de biologie vegetale. Tomo XXVII: 307-314.
- 12.- Kanichi Mori. 1971. Production of virus-free plants by means of meristem culture. JARQ 6 (1): 1-7
- 13.- Murashige, T. - Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia plantarum. 15: 473-497
- 14.- Cruz, G. M.T. 1973.Respuestas de crecimiento del cultivo de tejidos del meristemo radicular de "Zea mays" a diversas sustancias químicas. Revista de la Soc. Mex. de Historia Natural. Tomo XXXIV: 35-42
- 15.- Conger, B. V. 1987. Cloning Agricultural plants "in vitro" techniques CRC. PRES. 1-35
- 16.- Margara, J. L. 1988. Multiplicación Vegetativa y Cultivo in vitro . Ed. Mundi-prensa 10-23.
- 17.- Morel, G. Weltomore, R. 1951. Fern callus tissue culture American Journal of plant tissue 38:141-143.
- 18.- Gamborg, O., L. and Wetter L.R. 1975. Establishment of nitrogen fixing association between "Rhizobium" and soybean tissue culture: Appendix I. Plant tissue culture methods. 90.
- 19.- Nitsch, J.P.; Nitsch, C. 1969. Haplod plants from pollen grains. Science. 163: 85-87.

- 20.- Butenko, R.G. 1964. The history the development methods for cultivating excised plant tissue. Plant tissue culture and plant morphogenesis. Univ. Mic. Int. 30-32
- 21.- Conger, B. V. 1987. Cloning plants ..in vitro.. : ..callos.. techniques CRC. PRES. 46-52.
- 22.- Pennazio, S., Appiano, A. et al. 1976. Thiamine requeriment of potato meristem tips cultured ..in vitro.. Phisiol. Veg. 14 (1): 121-131
- 23.- Wenczel, G. 1980. Recent advances in applied tissue culture of potato, rape and rye. Plant cell cultures. Eds. Ciferri. Holanda. 56-70.
- 24.- Caplin, S.M.; Steward, F.C. 1952. Investigations on the Growth and Metabolism of Plant Cells. I. Evidence for Growth inhibitore in certain mature tissue. Annals of Botany, N.S. XVI (64): 197-213.
- 25.- Bidwell, R.G.S. 1979. Fisiología Vegetal. Ed. AGT EDITOR, S.A. 599-626
- 26.- Devlin, R. M. 1975. Fisiología Vegetal. Ed. Omega. 378-394.
- 27.- Hurtado, M. y Merino, M., E. 1975. Cultivo de tejidos vegetales. Ed. Trillas. 49-52.
- 28.- Steward, F.C. 1961. Growth Held at purdue. Univ. Ed. MX Zarrow basic book published. 453-490.
- 29.- Hadley, R. E. and Summerfield, R.J. 1985. Effect of temperature and photoperiod on flowering in cheek peas ..Cicer arttinum L.. Annals of Botany Company 55: 881-892

30.- Caplin, S.M.; Steward, F.C. 1952. Investigations on the Growth and Metabolism of Plant Cells. II. variables affecting the Growth of Tissue Explants and the Development of a Quantitative Method using Carrot Root. In: Annals of Botany, N.S. XVI (62): 220-234

31.- Said, H., Khalil, M.S. at el. 1963. The influence of photoperiods on the growth, alkaloid biosynthesis and Nitrogen metabolism of *Datura stramonium* L. J. Pharm. Sci. V. A.R. IV: 183-195.

32.- Scott, R.P. 1990. Phase change and regulation of shoot morphogenesis in plants. Sciences 250: 923-959

33.- Hadley, R. E.; Summerfield, R.J. 1985. Effects of temperature and photoperiod on flowering in chickpeas (*Cicer arietinum* L.) Annals of Botany Company 55: 881-892.

34.- Neary, G., J. 1964. Dependence on Oxygen and temperature of the sensitivity of broad bean roots to gamma radiation. Nature 180 (4579): 248-249.

35.- D'amatto, F. 1964. Endopolyploidy as factor in plant tissue development. Cariologia 17 (1): 41-52.

36.- Steward, F.C; Caplin, S.M. 1952. Investigations on the Growth and Metabolism of Plant Cells. III Evidence for growth inhibitors in certain mature tissue. Annals of Botany. XVII: 615-625.

37.- Darwin, C. 1900. The effect of cross and self fertilization in the plant kingdom. 2a ed. London.

38.- Paris, C.; Haney, W.J. 1980. Genetic studies in *Petunia* L. Nine Genes for flowers color. American Soc. for Horticultural Science. 72: 462-472 .

- 39.- Cornu, A. and Maizonnier, D. 1983. The genetic of Petunia. Plant Breeding Reviews. 11-57.
- 40.- Bianchi, F. et al. 1978. Regulation of gene action in Petunia hybrida: Unstable alleles of gene for colour. The Appl. Genet. 53: 157-167.
- 41.- Rick, C. M. 1943. Cyto-genetic consequences of X-ray treatment of pollen in Petunia. Botanical gazette. 104: 528-540.
- 42.- Cruz, G., M., T. 1990. Petunia. Informe técnico ININ. 6p.
- 43.- Maizonnier, D. 1973. Comportement meiotiques et descendeances des plantes haploides de Petunia. IAEA. 503 (29): 205-219.
- 44.- Sink, K.C. 1975. Inheritance of three genes for morphological caracteres in Petunia hybrida in crosses with four Petunia species. Can J. Genet. Cytol. 17: 57-74.
- 45.- Marthaler, H. 1936. Morphologie der chromosomen des Zellkernes von Petunia Z. indiki. Absgamm. u. Vereblehre. 72: 258-266.
- 46.- Maizonnier, D. 1971. Utilisation des plant haploides pour l'analyse du caryogramme de Petunia hybrida Hort. Ann. Amelior Plantes. 21: 257-264.
- 47.- Goodenough, U. 1981. Genética. Ed. Omega. España. 134-150.
- 48.- International Atomic Energy Agency. 1977. Types of mutations. Induced mutations agains Plant diseased. Viena, Italy 107-123.
- 49.- Donini, B. 1992. Comunicación personal: Curso sobre el uso de Radiaciones Ionizantes. Univ. de Guanajuato, México.

- 50.- Lesley, D. 1992. Apuntes : Seminario sobre Radiaciones ionizantes. Univ. de Guanajuato, México.
- 51.- Köhler, F. et al. 1989. Enhancement of transformation rates in higher plants by low-dose irradiation: Are DNA repair systems involved in the incorporation of exogenous DNA into the plant genome? . Plant Molecular Biology 12: 189-199.
- 52.-Devreux, M.; Laneri, U. 1974. Anther Culture Haploid plant isogenic line and Breeding Reserch in *Nicotiana tabacum* L.. IAEA-PL 503 (15): 101-107.
- 53.- Auerbach, C. 1976. Mutation Reserch. Problems, Results and perspectives. Chapman and Hall. 2-5.
- 54.- Aurebach, C. 1945. Chemical mutagenesis. Biol. Rev. 24: 355-391.
- 55.- Vogel, E., W. 1990. Curse: Genotoxic Chemical an introduction into basic principles of genetic toxicology. E.U.A. 8-36.
- 56.- Nivard, M. 1991. Tesis Doctoral: Genetic and molecular analysis of alkilation-induced damage in *Drosophila melanogaster*. Amsterdam. 1-23.
- 57.- Casseret, A.P. 1968. Radiation Biology. Prentice-Hall ed. E.U.A. 7-27.
- 58.- Glasstone, S. y Sesonske, A. 1978. Ingenieria de reactores nucleares. Ed. Ibero, S. A. España. 32-92.
- 59.- International Atomic Energy Agency. 1977. Physical Mutagens. Induced mutations agains Plant diseased. Viena, Italy. 7-49.

60.- Azorin, N., J. 1990. Luminescence Dosimetry. Theory and Applications. Ediciones técnico Cientificas. 71-82.

61.- Broertjes, C. 1988. Induced mutations and breeding methods in vegetatively propagated plants. IAEA. 121 (18): 325-328.

62.- Nybom, N.-Koch, A. 1964. Induced mutations and breeding methods in vegetatively propagated plants. The use of induced mutations in plant breeding 5: 664-678.

63.- Cruz, G. M.T. Micropropagación in vitro de ..Petunia.. Informe técnico. ININ

64.- Economou, A. and Read, P. E. 1982. Effect of NAA on shoot production "in vitro" from BA-pretreated Petunia leaf explants. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 107 (3); 504-506.

65.- Devreux, M. E.; Magnuen, E. and Dalschaert, X. 1986. Cellules vegetales in vitro et radiations ionizantes. Nuclear techniques and in vitro culture for plant improvement. 93-102.

66.- Sparrow, A. and Schwemmer, L. 1963. Relationship between nuclear volumes chromosome numbers and relative radiosensitivities Science 141: 163-166.

67.- Guzmán, J. 1992. Informe técnico ININ.

68.- Fujii, T. 1961. Mutation induced by radiation in vegetatively propagated plant with special reference of colour. Gamma Field Syp. 1: 51-59.

69.- Cornu, A. and Maizonnier, D. 1979. Enhanced non-disjunction and recombination as consequences of gamma-induced deficiencies in *Petunia hybrida*. Mutation Research 61: 57-63.

70.- Raquin, C.; Cornu, A; Maizonnier, Pelletier y Vedel. 1989. Nucleus substitution between *Petunia* species using gamma ray-induced androgenesis. Theor. Appl. Genet. 78:337-341

71.- Ziv, M. and Halavy, A., V. 1983. Control oxidative browning and *In vitro* propagation of *Strelitzia reginae*. Hortscience. 18 (4): 434-436.

72.-Duron, M.; Decourtye, L. 1986. Effets biologiques des rayons gamma appliques a des plantes de *Weigella* cv. *Bristol Ruby* cultivées *in vitro*. IAEA 282 (4): 103-111.

73.- Maliga, P. et. al. 1981. Induced mutations in advancing *in vitro* culture techniques. Induced mutation a tool in plant research. Proc. Symp. Vienna. 339-352.

74.- Nybom, N. and Koch, A. 1964. Induced mutations and breeding methods in vegetatively propagated plants. The use of induced mutations in plant breeding supplement to radiation botany. 5: 663-678.

75.- Nilan, R.A.; Kleinhpfs, A. 1969. Structural and biochemical concepts of mutations in flowering plant. IAEA. 121 (55): 35-49.

76.- Broertjes, C. 1988. Induced-mutant techniques in breeding asexually propagated plant. Mutation breeding. Roma, Italia. 159-166.

- 77.- Bonner, D., M. and col. 1939. Leaf growth hormones. I. Botan. Gaz. 101 (128): 34-56.
- 78.- Sret., H., E. 1984. Germination. The Physiology of flowering plants: Their growth and development. 3a. Ed. Bristish Library. 4-26.
- 79.- Pierik, R., L. and Steegmaus, H.M. 1976. Vegetative propagation of Anthurium scherzerianum schott through callus tissue culture. Scientia Horticulturae. 4: 291-292.
- 80.- Morel, G. and Wetmore, L., R. 1975. Fern callus tissue culture. American Journal of botany. 38: 141-143.
- 81.- Gabor, O.L. and Wetter, L., R. 1975. Plant tissue culture 15-23.
- 82.- Rosas y Quiroz. Comunicaci^n personal.
- 83.- Wetter, H., E. 1988 Auxines and Citocin. LMR. Ed. E.U.A. 35-58.
- 84.- Rao, P. S. and col. 1973. Hormonal Control of differentiation of shoots, roots and embryos in leaf stem cultures of Petunia inflata and hybrida. Physiol. plant. 28: 458-463.
- 85.- Sharma, A., K.; Mitra, G., C. 1976. In vitro culture of shoot apical meristen of Petunia hybrida for mass production of plants. Indian J. Exp. Biol. 14: 348-350 .
- 86.- Cruz, G. M. 1985. Incremento de la papa por medio de radiaciones. INFORME TECNICO ININ.

87.- Cruz, G. Ma. 1989. Irradiación del Toloache. INFORME TECNICO, ININ.

88.- OIEA. 1989. Symposium. Mutation breeding. Inglaterra. 2-12.

89.- Broertjes, C.; Haccius, Weidlich, S. 1968. Adventitious bud formation on isolated leaves and its significance for mutation breeding. Euphytica. 17: 321-344

90.- Morales, P. 1991. Comunicación personal: Congreso de Genética. Coahuila, México.

91.- Ortiz, R. V. 1992. Comunicación personal.

92.- Salceda, V. M. Congreso de Genética, Mazatlan, Sin. 1992. Comunicación personal.

93.- Cruz-González. 1992. Informe técnico ININ.