

# EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA RADIACIÓN GAMMA COBALTO 60 EN EL DESARROLLO Y SUPERVIVENCIA DE PLANTAS *IN VITRO* DE VIOLETA AFRICANA (*Saintpaulia ionatha*).

Jadán, Mónica; Debut Alexis; Niveló Katherine

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

El cultivo *in vitro* permite la reproducción masiva de plantas en un medio nutritivo con condiciones controladas. Esta técnica, combinada con técnicas nucleares que aprovechan la energía del núcleo atómico ofrece la herramienta ideal para generar ventajas genéticas competitivas de una especie. *Saintpaulia ionatha* es una especie ornamental con potencial regenerativo y capacidad de adaptación. La presente investigación está dirigida a conocer los efectos de la radiación gamma del  $^{60}\text{Co}$  en el desarrollo y supervivencia de plantas *in vitro* de *Saintpaulia ionatha*. Se irradiaron explantes con dosis desde 0 a 100 Gy *in vitro* y se evaluaron el índice de supervivencia, número de hojas y producción de brotes. La  $DL_{50}$  para los explantes fue de 53 Gy, el número de hojas y producción de brotes es estimulado con dosis de 10 Gy. Los explantes con dosis desde 0 a 30 Gy fueron aclimatados en un sustrato compuesto por tierra negra, turba y cascajo en una proporción de 2:1:1 y se evaluaron; supervivencia, número de hojas y tamaño de la roseta durante 6 semanas. La supervivencia de explantes disminuye con 30 Gy mostrando una supervivencia de 64%. Los ensayos realizados en preparación de muestras para cortes ultrafinos, indicaron una alta susceptibilidad del tejido.

**Palabras clave:** mutagénesis, *in vitro*, cobalto 60, aclimatación, radiosensibilidad.

## INTRODUCCIÓN

La ciencia a lo largo de la historia ha propuesto distintas maneras para generar nuevas variedades vegetales en menor tiempo siendo el uso de tecnología nuclear en combinación con técnicas de cultivo *in vitro* una de ellas (Cornide, M. 2001). Hoy en día las mejoras genéticas no solo permiten mejorar la calidad de los cultivos, sino que además ofrece ventajas competitivas para su éxito en un mercado floricultor tan variado. La obtención de nuevos linajes de flores ornamentales es un ejemplo de mejoramiento genético que tiene como fin otorgar a la flor características diferentes que potencien su comercialización en un

mundo cada vez más exigente y competitivo (Cornide, M. 2001).

El cultivo *in vitro* es una técnica innovadora que permite la reproducción masiva de plantas a partir de cualquier porción pequeña de las mismas en un medio nutritivo con condiciones controladas, brindando una ventaja frente al cultivo convencional por su rápida capacidad de regenerar plantas nuevas a partir de cualquier segmento, asegurando que sus características sean idénticas a las de la planta madre.

Las técnicas nucleares por su parte aprovechan la energía producto de la fisión nuclear para utilizarla en distintos fines como la generación de

electricidad, para diagnóstico médico, aplicaciones en la agricultura y en la industria. La utilización de técnicas nucleares en el campo de la agricultura es de importancias primordial para el mundo en desarrollo por su capacidad de generar variabilidad. (Cornide, M. 2001).

La combinación entre las técnicas nucleares y de cultivo *in vitro*, ofrecen la herramienta ideal para que las ventajas genéticas competitivas de una especie puedan ser inducidas, de una manera eficiente, lo que es más conveniente comparado con un tratamiento in vivo, ya que existe una alta posibilidad de que las células mutadas expresen la mutación en el fenotipo, asegurando que la variante seleccionada pueda ser mantenida en cuantos ejemplares sean necesarios. Además que el cultivo *in vitro* permite la separación de quimeras, la capacidad de producir grandes poblaciones en poco tiempo y la posibilidad de obtener clones de un solo brote (Rubí M., 1995). El propósito de la presente investigación es Evaluar los efectos de la radiación gamma cobalto 60 en el desarrollo y supervivencia de plantas *in vitro* de Violeta Africana (*Saintpaulia ionatha*).

Finalmente, el uso de herramientas como la microscopia electrónica es una puerta al entendimiento del comportamiento celular, aunque se conoce que los efectos de los rayos gamma generan mutaciones al azar,

y muchas de ellas pueden identificarse por su influencia en el fenotipo del individuo no se conoce a ciencia cierta el efecto de estas mutaciones en la estructura celular (Puchooa, D. 2005).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se micropropagó plántulas de *Saintpaulia ionatha* seleccionadas hasta asegurar homogeneidad y asepsia del cultivo. El medio de cultivo que se utilizó fue MS, suplementado con 0,2 mg/l de kinetina; 2 mg/l de AIA y 16 mg/ de tiamina.

Los explantes fueron sometidas a 10 dosis de radiaciones gamma: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 Gy, utilizando el irradiador J.L Shepherd modelo 109, con su respectivo control (0 Gy).

Se evaluó crecimiento longitudinal, el número de brotes el número de hojas y el porcentaje de sobrevivencia de cada plántula sometida a radiación, a los 7, 14, 21, 28 y 35 días después de haber recibido sus respectivas dosis.

Se transfirió los explantes con supervivencia mayor al 60% a un medio para enraizamiento MS enriquecido con 0,1 mg/l de Tiamina, 0,5 mg/ml de ácido nicotínico; 0,5 mg/l de piridoxina; 0,2 mg/l de BAP; 0,3 mg/l de AIB; 100 mg/l de mioinositol; 300 mg/l de carbón activado y 25 g/l de sacarosa.

Finalmente los explantes fueron transferidos a un sustrato de aclimatación compuesto por compuesto por: tierra negra, cascajo y turba en una proporción 2:1:1, respectivamente para esta fase se valoró las variables *porcentaje de supervivencia, tamaño de la roseta, y número de hojas*, de las plántulas aclimatadas

Los datos de supervivencia obtenidos en la fase *in vitro* y de campo fueron linealizados para establecer la curva de sobrevivencia (DL50). Las variables evaluadas *in vitro* y en campo fueron sujetas a un análisis estadístico no paramétrico, de Kruskal Wallis con un nivel de probabilidad  $p=0.05$ .

### ***Cortes ultrafinos para microscopía electrónica***

Se realizó cortes frescos del material vegetal irradiado (Q) y de tejidos vegetales que no han sido irradiados (B); se sumergieron en una solución de glutaraldehído al 2% en una PBS durante 16 horas, seguida de etapa de post fijación con tetra óxido de osmio (TOO), al 1% en solución con PBS durante 60 min, (Del Hierro 2013). A continuación se realizó la deshidratación del material vegetal con diluciones seriadas de etanol,

Las muestras deshidratadas fueron suspendidas en una solución 1:1 de acetonitrilo: etanol, luego se sumergió la muestra en acetonitrilo al 100%, y llevadas a una infiltración con

acetonitrilo: resina en una proporción 2:1; 1:1 y 2:1. Finalmente se embebió las muestras en resina al 100% para ser llevada a la fase de polimerización.

La infiltración graduada se hizo con una resina epoxi de dureza mediana, compuesta por 44.15% de EPON, 35,32% de DDSA, 17,7% de MNA y 2.83% de BDMA

Los cortes ultrafinos fueron realizados por un ultramicrotomo, se programó en la consola electrónica del ultra microtomo: la ventana superior e inferior de corte, la velocidad de corte de 1.0 mm/s y el espesor de 50 a 100 nm. Se fijó el corte a los soportes y se tiñó con acetato de uranilo al 1% y citrato de plomo al 2%.

## **RESULTADOS**

Se evidenció que la supervivencia de las plantulas declinó a medida que aumentaban las dosis de radiación. La gráfica 1 indica una drástica disminución de mortalidad a partir de 40 Gy. Se observa también la disminución gradual en el porcentaje de supervivencia a medida que la dosis de radiación aumenta hasta no presentar supervivencia a 90 y 100 Gy.

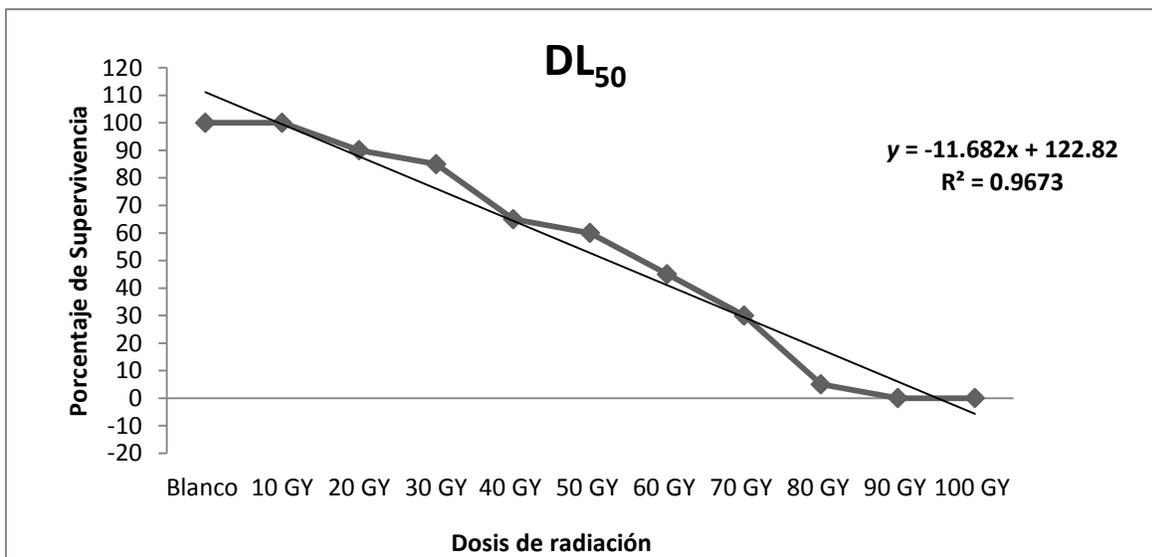
La curva de ajuste en base a la ecuación de regresión mostró una alta correlación entre la mortalidad de plantas y la dosis de radiaciones gamma aplicada, entre más aumenta la dosis, menor es el porcentaje de

supervivencia, el coeficiente de determinación para esta relación ( $R^2$ ) fue de 0.9673

coeficiente de multiplicación, y la influencia de la dosis de radiación sobre el mismo.

Se evaluó también la tasa de

Se valoró el crecimiento longitudinal



**Gráfico 1.-** Curva de radiosensibilidad de cultivo *in vitro* de *Saintpaulia ionatha* expuesta a radiación gamma Co60

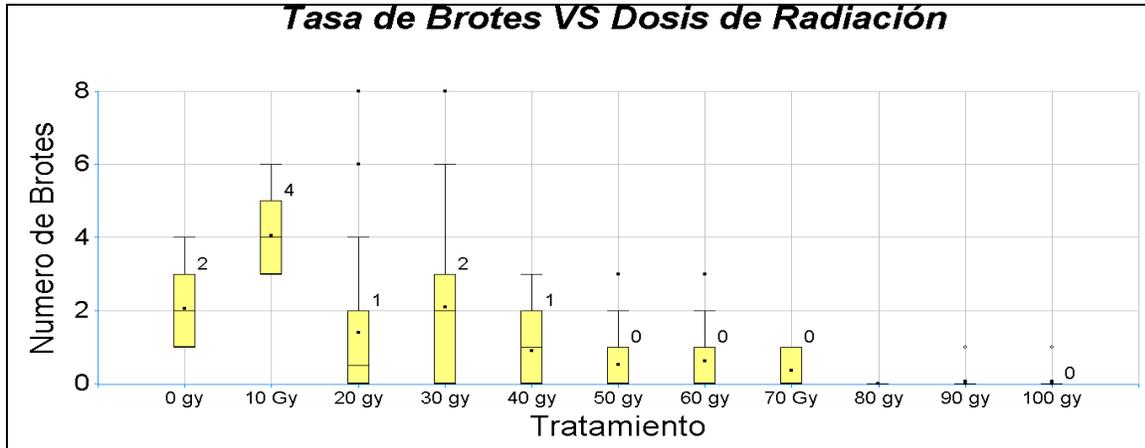
producción de brotes, o coeficiente de multiplicación durante 5 semanas, y se observó que es dependiente de los tratamientos de irradiación.

Los datos obtenidos fueron distribuidos en un diagrama de cajas que brinda la información sobre los valores mínimos y máximos en la distribución de los datos, e indica la existencia de valores atípicos, refiriéndose a aquellos que dieron como resultado valores muy alejados al resto de datos, lo que sugiere un comportamiento único de ciertos individuos de población frente a los efectos de la radiación. En el gráfico 2 se presentan las medianas para el

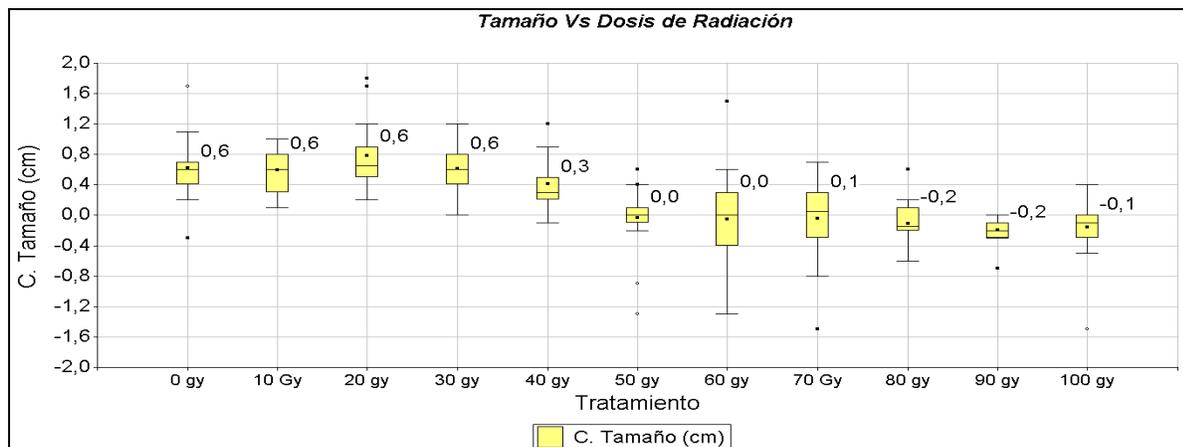
de los explantes *in vitro* los resultados reflejaron que a medida que aumenta la radiación el crecimiento longitudinal se ve afectado. La gráfica 3 representa en su diagrama de cajas las diferencias entre las medianas del crecimiento apical, medido en centímetros, para cada explante. Se puede observar la presencia de comportamientos atípicos para esta variable en las dosis de 0, 20, 40, 50, 60, y 80 Gy, estos comportamientos representan resistencia de ciertos individuos de la población a los efectos de la radiación. Se puede identificar también un crecimiento homogéneo entre las dosis de 0 a 30 Gy, y un

decrecimiento a partir de 40 Gy hasta registrar valores negativos a partir de

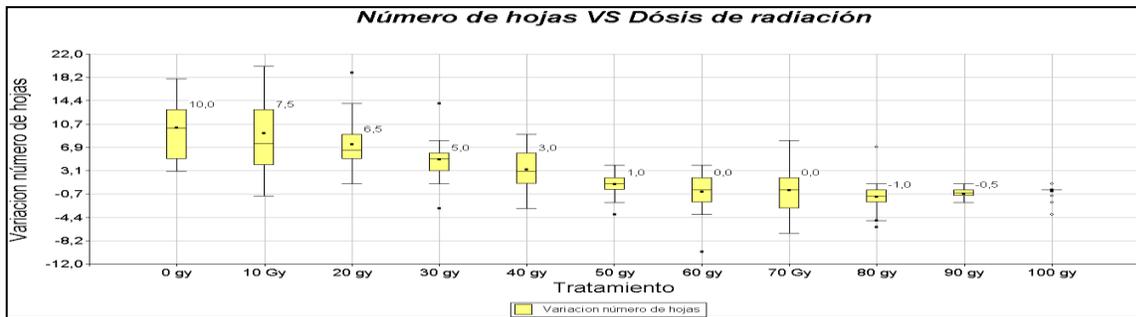
las dosis de 80 Gy.



**Gráfico 1.-** Diagrama de cajas representando la distribución de datos para el índice de brotes en cada dosis de irradiación aplicada sobre el cultivo *in vitro* de *Saintpaulia ionatha* evaluadas 5 semanas después de la irradiación.



**Gráfico 3.-** Diagrama de cajas para el crecimiento longitudinal de explantes *in vitro* de *Saintpaulia ionatha* para varias dosis de radiación gamma  $^{60}\text{Co}$  evaluadas 5 semanas después de la irradiación



**Grafico 4.-** Diagrama de cajas para el Número de hojas de *explantos in vitro* de *Saintpaulia ionatha* para varias dosis de radiación gamma  $^{60}\text{Co}$

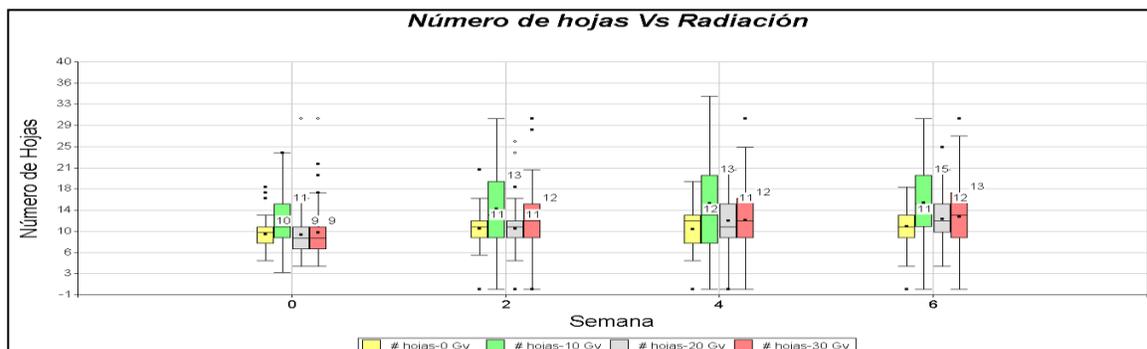
El número de hojas también fue evaluado; el gráfico 4 registra la distribución del variable *número de hojas* para las distintas dosis de radiación. Se puede identificar como a medida que la dosis de radiación aumenta el número de hojas disminuye, y pese a que 0 Gy registró el mayor número de hojas en su mediana, la dosis de 10 Gy tiene un máximo con un valor más alto que el resto de tratamientos, indicando que sus individuos registraron mayor número de hojas que el resto de tratamientos.

*Durante la adaptación en campo se evaluaron durante 45 días las*

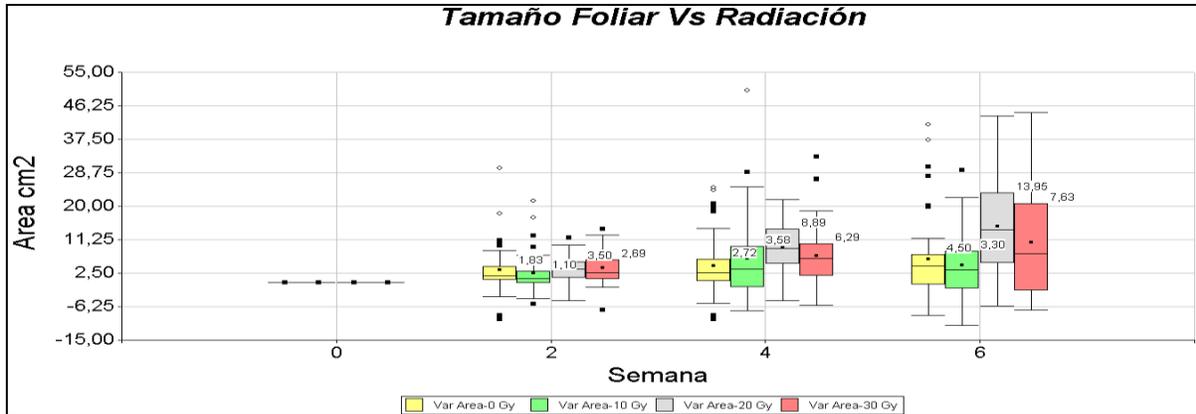
*variables supervivencia, número de hojas, y tamaño de la roseta.*

La tabla 6 enlista los índices de supervivencia para cada dosis durante la fase de aclimatación. Se registró un índice de 0.88 de supervivencia para los explantes que no han recibido dosis de radiación alguna (0 Gy), mientras que el menor índice de supervivencia se da con la dosis de 30 Gy registrando un índice de 0.64.

El número de hojas, alcanzó su índice máximo a la dosis de 10 Gy. La grafica 5 muestra el comportamiento de los explantes irradiados para cada dosis de radiación documentado cada 15 días

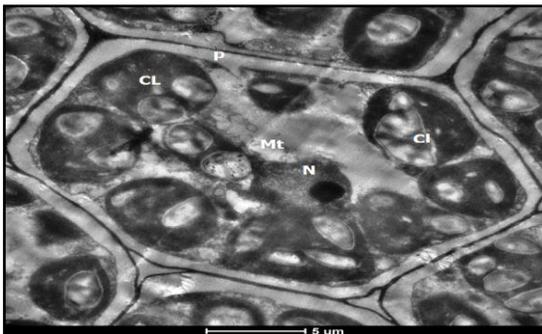


**Gráfico 2.-** Diagrama de cajas representando la distribución de los datos obtenidos cada quince días para el número de hojas de los explantes aclimatados previamente irradiados *in vitro* con las dosis de 0, 10, 20 y 30 Gy evaluado cada 15 días.



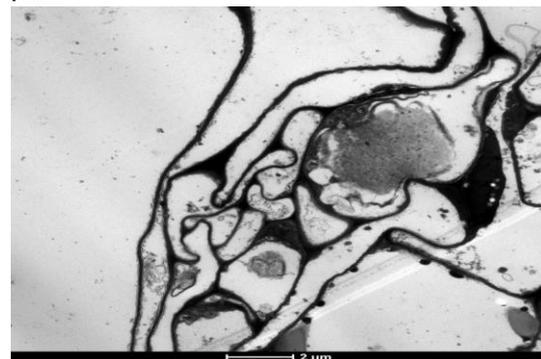
**Gráfico 3.-** Diagrama de Cajas representando la distribución de los datos obtenidos cada quince días para el tamaño de roseta de los explantes aclimatados previamente irradiados *in vitro* con las dosis de 0, 10, 20 y 30 Gy evaluada cada 15 días

El tamaño de la roseta indica el área helicoidal de los explantes, que es directamente influenciada por el área foliar de las hojas que conforman la planta. Esta variable fue evaluada durante 6 semanas, y el análisis exploratorio que se pudo obtener de los datos tomados, registraron la media más alta, 13,95 cm<sup>2</sup>, para la dosis de 20 Gy, tal como lo indica la gráfica 6, el diagrama de cajas señala el proceso de crecimiento de la planta cada quince días para cada dosis de irradiación recibida.



**Figura 1.-** Célula vegetal de una sección de hoja de *Saintpaulia ionantha* sin tratamientos de radiación con gran acumulación de cloroplastos (CL), con presencia de mitocondrias (Mt), un núcleo prominente (N) y pared celular bien definida (P). Bar= 5 µm.

En las figura 1 se puede distinguir los componentes celulares de la muestra blanco 1 (B1), las organelas celulares en la muestra en la figura son; N: núcleo; P: pared celular; CL: cloroplastos; Mt: mitocondrias. El espesor de los cortes es de 90 nm. La célula mantiene su estructura celular intacta con gran presencia de plastos.



**Figura 2.-** Corte de 170 nm de la muestra Q1. El corte indica una deformación celular se reconoce la pared celular. (P) y el Núcleo (N). Bar: 2 µm

La figura 2 indica un corte ultra fino de 170 nm de Q1, donde se observó lo mismo que con cortes de 1000 nm, células deformes algunas de ellas fusionadas, sin embargo se puede

distinguir la pared Celular (P) y el núcleo (N).

## DISCUSIÓN

Se ha reportado durante muchos años que la exposición de especies vegetales a la radiación gamma produce alteraciones capaces de generar mutantes morfológicos fisiológicos y bioquímicos. Muchas de las alteraciones confieren características únicas a los individuos expuestos. Algunas de estas alteraciones pueden ser fatales, pero se ha reportado también que podrían ser beneficiosas; como en el caso de crisantemos, (*Dendranthema grandiflora*) donde la radiación ha generado nuevos colores de flor con dosis de 10 Gy (Othola-Gómez, *et al.*, 2001), o la aceleración en la germinación de *Jatropha curcas* con dosis de 425-430 Gy (Songsri, *et al.* 2011), entre otras.

Estudios anteriores en violeta Africana, (Wongpiyasatid, *et al.*, 2007) reportaron que la dosis  $DI_{50}$  es de 56 Gy sobre esquejes de hojas irradiados con dosis entre 0 a 100 Gy en campo, estos resultados son similares a los reportados en la presente investigación.  $DI_{50}$  para una población de *Saintpaulia ionatha in vitro* fue de 53 Gy, es importante resaltar además que en los dos estudios no se reportó supervivencia a dosis mayores de 80 Gy.

El coeficiente de multiplicación es un parámetro que permite tener noción

del efecto de la radiación a nivel bioquímico la producción de brotes. Está directamente relacionada a la sinergia de dos reguladores hormonales, citoquininas y auxinas, la acción conjunta de estas fitohormonas permiten el origen de diversos fenómenos.

Investigaciones dedicadas a conseguir una alta producción de brotes en la propagación de *Saintpaulia ionatha* han reportado coeficientes de multiplicación promedios de hasta 15 brotes por explante en un medio MS enriquecido con 1.0 mg L<sup>-1</sup> de AIA y 2.0 mg L<sup>-1</sup> Zetina (Norhayati, *et al.*, 2008). El medio utilizado en el presente estudio fue un medio MS suplementado con 0,2 mg L<sup>-1</sup> de Kinetina; 2 mg L<sup>-1</sup> de AIA, cuya tasa de brotes para explantes sin irradiar (Blanco) es de cuatro por explante, resaltando así la importancia de los reguladores hormonales en la producción de Brotes.

El grafico 5 indica el decrecimiento de la tasa de brotes a medida que aumentan las dosis de radiación. Gordon (1957) explica las posibles causas de este fenómeno en su publicación sobre los efectos de la radiación ionizante en plantas. Se ha evidenciado una disminución en la producción de fitohormonas endógenas en plantas sometidas a radiación, dando como efecto secundario la disminución de brotes, raíces, o crecimiento lo cual es

congruente con lo expuesto en la presente investigación donde a partir de la dosis de 20 Gy se identifica una disminución para el número de brotes

El crecimiento de las plantas está determinado por la actividad de células meristemáticas, ubicadas en los ápices de tallos y raíces las mismas que en respuesta a estímulos químicos expresan división y elongación celular. El índice de crecimiento de explantes de Violeta Africana mostró diferencias casi imperceptibles durante el proceso de evaluación de los efectos de la radiación gamma.

En la gráfica 3 se puede distinguir medias aritméticas homogéneas, junto con una distribución simétrica para las dosis de 0, 10, 20 y 30 Gy, sugiriendo así que estas dosis de radiación no ejercen ningún efecto sobre la elongación celular responsable del crecimiento. El decrecimiento a partir de 40 Gy mostrado en la gráfica 3 está directamente relacionado con la radiosensibilidad de los explantes.

El proceso de cultivo *in vitro* inicia con la introducción de explantes a condiciones controladas y termina con la regeneración de plántulas completas capaces de sobrevivir en campo, es decir con la aclimatación; la última etapa es la más crítica del proceso, ya que las condiciones fisiológicas de las plantas son diferentes a la de plantas multiplicadas en campo, por ejemplo,

la alta humedad que hay en las condiciones *in vitro* provocando un escaso desarrollo de cutícula que trae como consecuencia, una transpiración extra cuticular el momento de llevar los explantes a campo.

Existen otras alteraciones involucradas como el daño sobre estomas que incide en daños para el intercambio gaseoso de la planta, sin mencionar que se vuelven seres heterótrofos, ya que su medio de cultivo provee de todo los nutrientes necesarios.

La tabla 1 indica como los índices de sobrevivencia disminuyen conforme aumentan las dosis de radiación, No obstante las dosis de 0, 10 y 20 Gy se encuentran dentro de los valores esperados, con sobrevivencias sobre el 80%. La dosis de 30 Gy por otra parte presenta un porcentaje de sobrevivencia menor a lo esperado, sugiriendo la presencia aberraciones bioquímicas o morfológicas que solo pueden ser identificadas en esta fase de crecimiento, que podrán ser mejor explicadas analizando el número de hojas así como el tamaño de la roseta.

La dosis de 10 Gy presenta un mayor número de hojas desde la primera semana de aclimatación manteniéndose hasta el final de las observaciones; este resultado es similar al comportamiento de las plantas *in vitro* donde la media más alta de brotes y el mayor número de

hojas se registró para dosis de 10 Gy. Indicando que dosis bajas de radiación estimulan división celular y la producción de hojas y área foliar.

La muestra B1 indica además (fig 3.2) gran presencia de plastos en su interior con un alto contenido de granos de almidón, este fenómeno es consistente con lo descrito por *Maïke & Alfermann* (2002) quien menciona que se ha observado para varios cultivos que las fuentes de azúcares y fuentes de carbono en general, provistas por el medio, es absorbido por los tejidos para sintetizar polisacáridos y en especial formación de almidones como fuente de reserva en la estructura celular.

Las diferencias en las respuestas de las células de B1 y Q1 pueden ser explicadas en base a las alteraciones fisiológicas que sufren las células en su crecimiento *in vitro* y que pueden ser potenciadas por efectos de la radiación como se ha observado en el proceso de preparación de estas muestras

## CONCLUSIONES

El estudio de radiosensibilidad realizado en explantes *in vitro* de *Saintpaulia ionatha* revela que la dosis para la cual la supervivencia fue del 50% (DL<sub>50</sub>) es de 53 Gy y asegura que no hay supervivencia con dosis superiores a 80 Gy después de 30 días de recibir irradiación gamma Co<sup>60</sup>.

La dosis de 10 Gy estimula la división celular incrementando la producción de brotes y el número de hojas en explantes *in vitro* y en campo. La disminución de producción de hojas y brotes se da a partir de las dosis de 40 Gy.

El porcentaje de supervivencia de explantes de *Saintpaulia ionatha* aclimatados es de 88%. La dosis de 30 Gy disminuye la supervivencia de explantes en su fase de aclimatación presentando apenas 64% de supervivencia

El tejido vegetal cultivado *in vitro* sufre alteraciones fisiológicas, que son intensificadas por la irradiación, confiriendo potenciales osmóticos variados al tejido traducidos en daño celular en presencia de soluciones fijadoras hipertónicas, razón por la cual no permitieron realizar cortes ultrafinos del tejido vegetal.

## BIBLIOGRAFÍA

Ahloowalia, B. (1998). In vitro techniques and mutagenesis for the improvement of vegetatively propagated plants. En B. Ahloowalia, *Somaclonal variation and induced mutations crop improvement* (págs. 293-302). Jain MS Brar DS Ahloowalia BS(eds).

Albretchen, S. (1974). Testing methods for seed-transmitted viruses: principles and protocols. En M. Hayat, *Principles and techniques of scanning electron microscopy*. (págs.

226-273). Wallingford: CABI publishing.

Alcérreca, M. (2001). America Latina, Situación Actual y plantas de irradiación en Mexico . *Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares*, 5-15.

Anchalee, J. (2011). Morphological Change Due to Effects of Acute Gamma Ra on Wishbone Flower (*Torenia fourmieri*) in vitro. *International Transaction Journal of Engineering, Management, & Applied Sciences & Technologies*, 246-254.

Bajaguz A, T. A. (2003). The chemical Characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *NCBI*, 1027-1046.

Beyer, E., Morgan, P., & Yang, S. (1990). Ethylene. En M. Wilkins, *Advance Plant Physiology* (págs. 111-126). London: Pitman Publishing .

Bloom, W. (1997). Histological Changes following radiation exposure. *Radiology*, 344-347.

Cassells, A., & A., P. (1984). Production and growth analysis of plants from leaf cuttings, and from tissue culture of disks from mature leaves of young axenic leaves of African Violet (*Saintpaulia ionatha*). *Scintia Horticulturae*, 361-369.

Castillo, A. (2008, 03). *inia.org.uy*. Recuperado el 02 25, 2013, de [http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad\\_382.pdf](http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf)

Clarke, G. (1998). *Plants in peril*, 24 notes on lowland African Violet

(*Saintpaulia*) in the wild. MA 02148, USA: Bentham-Moxon Trust.

Cornide, M. (2001). La Genética vegetal, el mejoramiento y La sociedad. *Cultivos tropicales*, 22(3), 72-83.

Creelman, R., & Mullet, J. (1997). BIOSYNTHESIS AND ACTION OF JASMONATES IN PLANTS. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, 355-381.

Dana, B., Lerne, R., & Michael, N. (2001). *African Violet care*. West Lafayette, IN: Purdue University cooperative extension service.

Donini. P., A., & Sonnio. (1998). Induced Mutation in Plant Breeding. Current Status and future outlook. En S. (. Jain, *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement* (págs. 255-291). Dordrecht: Kluwer Academic Publisher.

Espinoza A., S. J. (2007). Multiplicación in vitro de Violeta Africa (*Saintpaulia ionatha*) . *Revista Electronica Granma Ciencia*, 50-57.

Espinoza, A., Mejía, J., & Rodriguez, M. J. (2005). *Manual de producción de plantas de nochebuena y ornato*. Chapingo : colección MC.

Espinoza-Reyes, A., Silva-Pupo, J., Gonzalez-Panenque, O., Fajardo-Rosabal, L., & Perez-Perez, .. S. (2007). Multiplicación in vitro de violeta Africana *Saintpaulia ionatha*. *Revista electronica Granma Ciencia*, 11(2), 45-51.

Estrada J., P. M. (2011). Efecto de rayos gamma  $^{60}\text{Co}$  en Nardo (*Polianthes Tubersa L.*). *Revista Mexicana de ciencias Agrícolas*(3), 445-458.

Garcia, F., Fernandez, M., Castell, R., & Valls, A. (1989). *Radiaciones Ionizantes*. Madrid: Comision de Salud Pubica de España.

González, M., Fuentes, J., & Cortez, S. (2005). "Delia", NUEVA VARIEDAD DE VIOLETA AFRICANA (*Saintpaulia ionatha*) PARTIR DE TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS Y NUCLEARES. *Cultivos Trópicas*, 50-62.

Gordon, S. (1957). The Effects of Ionizing Radiation on Plants: Biochemical and Physiological Aspects. *Chicago Journals*, 3-14.

Gordon, S. (1994). Ocurrence, formation and inactivation of auxins. . *Annus*, 341-378.

Gunckel, J. (1957). The Effects of Ionizing Radiation on Plants: Morphological Effects. *Chicago Journals*, 46-56.

Gunckel, J. (1997). The effect of Ionizing Radiation on plants: morphological effects. *The Quartely review of biology*, 32(1), 46-56.

Hajibagheri, N. (1999). *Electron Microscope Protocols and methods*. Totowa: Human press .