



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO EN
BIOTECNOLOGÍA**

AUTOR: NIVELO CEPEDA KATHERINE ANDREA

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

DIRECTOR: M.Sc. Mónica Jadan

CODIRECTOR: Ph.D. Alexis Debut

SANGOLQUÍ, FEBRERO 2014

CERTIFICACIÓN

M.Sc. Mónica Jadán

PhD. Alexis Debut

Certifican:

Que el trabajo titulado “**Evaluación de los efectos de la radiación gamma cobalto 60 en el desarrollo y supervivencia de plantas *in vitro* de violeta africana (*Saintpaulia ionatha*)**” realizado en su totalidad por la Srta. Katherine Andrea Niveló Cepeda, como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple con las normas establecidas por la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE.

Debido a la relevancia científica, expuesta en el presente trabajo de tesis, se recomienda su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a KATHERINE ANDREA NIVELÓ CEPEDA que lo entregue a la M.Sc. María Augusta Chávez, en su calidad de Coordinadora de la Carrera

Sangolquí, Diciembre del 2013

M.Sc. Mónica Jadán
DIRECTOR

PhD. Alexis Debut
CODIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, KATHERINE ANDREA NIVELO CEPEDA

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “**Evaluación de los efectos de la radiación gamma cobalto 60 en el desarrollo y supervivencia de plantas *in vitro* de violeta africana (*Saintpaulia ionatha*)**”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, Noviembre del 2013

Katherine Andrea Niveló Cepeda

AUTORIZACIÓN

Yo, KATHERINE ANDREA NIVELÓ CEPEDA

Autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “**Evaluación de los efectos de la radiación gamma cobalto 60 en el desarrollo y supervivencia de plantas *in vitro* de violeta africana (*Saintpaulia ionatha*)**”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, Noviembre del 2013

Katherine Andrea Niveló Cepeda

DEDICATORIA

A Dios por ser el creador de mi vida, para Él este trabajo, por ser la luz de mi vida.

A mis padres por su dedicación en educarme y apoyarme en cada una de las etapas de mi vida

A mi hermano, Andrés, mi mejor amigo.

Kathy Niveló Cepeda

AGRADECIMIENTO

Quiero Agradecer en primer Lugar a Dios, por ser el creador de mi vida, y darme la oportunidad y la bendición de culminar con mi carrera.

En segundo lugar agradezco a mis padres, motores de mi vida, quienes con su ejemplo han inspirado el sentido de superación en mí; a mi madre, modelo de lucha y perseverancia, quién me ha enseñado a no dar el brazo a torcer y luchar por lo que se quiere. Por las regañadas, las habladas pero sobre todo por el abrazo oportuno y el amor infinito gracias mami. A mi padre, el amigo y confidente que con su ejemplo me ha exigido a jamás dejar mis estudios de lado y me inspira a buscar ser una gran profesional, por consentirme, escucharme y apoyarme en todo, gracias papi.

Le agradezco a mi hermanito Andrés, mi pequeño consentido quien estuvo siempre con migo en las noches de largo estudio, y me recibió en las frías madrugadas. Por todo tu cariño, amistad, y complicidad te agradezco ñaño eres y serás el mejor amigo del mundo.

A mis segundos padres Yoli y Ernesto quienes siempre me ha acogido en su hogar, y han sido mi apoyo, gracias por dame la oportunidad de aprender otro idioma que abierto muchas puertas en mi vida. Titi gracias por ser mi amiga y mi concejera y por toda la dulzura de tus consejos, te quiero mucho.

A mi directora, mentora, y amiga, M.Sc. Mónica Jadán, por haberme recibido en el mejor laboratorios de la ESPE, el laboratorio de Cultivo de Tejidos vegetales, donde tuve la suerte de encontrarme con grandes amigos que en conjunto hicieron una hermosa familia, y

me enseñaron mucho de su experiencia, a toda mi familia de cultivo, gracias por todo, todo todo....

A Dr. Alexis Debut, por su guía durante este proceso de tesis, sus enseñanzas y exigencias.

A la carrera de Biotecnología, y a todos su cuerpo docentes que impartieron en mí no solo conocimiento sino valores que contribuyeron a mi crecimiento personal, gracias por todas las enseñanzas dentro y fuera de las aulas.

A mis amigos, gracias por tantas alegrías, por reír y llorar con migo, son un gran regalo de Dios.

Katherine Niveló C

CONTENIDO

CERTIFICACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	iii
AUTORIZACIÓN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
LISTADO DE TABLAS	xii
LISTADO DE GRÁFICOS	xiii
LISTADO DE FIGURAS	xiv
LISTADO DE ANEXOS	xviii
RESUMEN	xix
ABSTRACT	xx
Capítulo 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	1
1.2 JUSTIFICACIÓN DE PROBLEMA	3
1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	5
1.3.1 Objetivo general del proyecto	5
1.3.2 Objetivos Específicos.....	5
1.4 MARCO TEÓRICO.....	6

1.4.1	Descripción Botánica	6
1.4.2	Cultivo de <i>Saintpaulia ionatha</i>	9
1.4.3	Descripción histológica de hojas y peciolo de <i>Saintpaulia ionatha</i>	13
1.4.4	Cultivo <i>in vitro</i>	15
1.4.5	Mejoramiento Genético	24
1.4.6	Inducción de mutaciones.....	25
1.4.6.1	<i>Mutágenos químicos</i>	26
1.4.6.2	<i>Mutágenos físicos</i>	27
1.4.7	Radioactividad.....	28
1.4.8	Microscopia Electrónica.....	41
Capítulo 2: METODOLOGÍA		44
2.1	Selección del material vegetal	44
2.2	Cálculo de la tasa de dosis del irradiador.....	45
2.3	Dosis letal media.....	46
2.4	Evaluación de efectos de dosis de radiación no letales en el ciclo de reproducción <i>in vitro</i> de Violeta Africana.....	50
2.4.1.	Micro propagación.....	51
2.4.2	Enraizamiento.....	51
2.4.3	Aclimatación	52

2.5	Cortes ultra finos para observar la estructura vegetal con microscopio electrónico de transmisión.....	57
CAPÍTULO 3: RESULTADOS		64
3.1	Determinación de la dosis letal media sobre una población de <i>Saintpaulia ionatha in vitro</i>	64
3.2	Efectos de la radiación sobre el coeficiente de multiplicación <i>in vitro</i>	66
3.3	Efecto de la radiación sobre el crecimiento longitudinal <i>in vitro</i>	68
3.4	Efecto de la radiación sobre el número de hojas <i>in vitro</i>	71
3.5	Aclimatación	73
3.6	Efectos de la radiación sobre el número de hojas en fase de aclimatación.....	75
3.7	Efectos de la radiación sobre el tamaño de roseta en la fase de aclimatación	77
3.8	Microscopía electrónica.....	79
Capítulo 4: DISCUSIÓN		90
4.1	Determinación de la dosis letal media sobre una población de <i>Saintpaulia ionatha in vitro</i>	90
4.2	Efectos de la radiación sobre el coeficiente de multiplicación <i>in vitro</i>	91
4.3	Efecto de la radiación sobre el crecimiento longitudinal <i>in vitro</i>	94
4.4	Efecto de la radiación sobre el número de hojas <i>in vitro</i>	96
4.5	Aclimatación	98
4.6	Efectos de la radiación sobre el número de hojas en fase de aclimatación.....	100

4.7.- Efectos de la radiación sobre el tamaño de roseta en la fase de aclimatación	101
4.8 Microscopía electrónica.....	102
Capítulo 6: RECOMENDACIONES	111
BIBLIOGRAFÍA	113
ANEXOS	¡Error! Marcador no definido.

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.- Factores de cualidad de acuerdo al tipo de radiación, para el cálculo de la dosis equivalente. (Rodríguez, 1978).	40
Tabla 2.- Porcentajes de supervivencia de explantes <i>in vitro</i> de <i>Saintpaulia ionatha</i> después de 5 semanas de evaluación.	64
Tabla 3- Prueba de contrastes Kruskal Wallis para la variable <i>Número de Brotes</i> en las distintas dosis de radiación evaluada a las 5 semanas después de la irradiación.....	68
Tabla 4 - Prueba de contrastes Kruskal Wallis para la variable <i>Crecimiento Apical</i> en las distintas dosis de radiación.....	70
Tabla 5- Prueba de contrastes Kruskal Wallis para el variable <i>número de hojas</i> en las distintas dosis de radiación <i>in vitro</i> evaluadas 5 semanas después de la irradiación.....	73
Tabla 6.- Índices de supervivencia en la fase de aclimatación de explantes irradiados <i>in vitro</i> con dosis de 0, 10, 20 y 30 Gy.	74
Tabla 7.- Prueba de contrastes Kruskal Wallis para el variable <i>número de hojas</i> de los explantes aclimatados previamente irradiados <i>in vitro</i> con las dosis de 0, 10, 20 y 30 Gy, evaluados cada 15 días.....	77
Tabla 8.- Prueba de contrastes Kruskal Wallis para el tamaño de la roseta de los explantes aclimatados previamente irradiados <i>in vitro</i> con las dosis de 0, 10, 20 y 30 Gy evaluada cada 15 días	79

LISTADO DE GRÁFICOS

Gráfico 1.- Curva de radiosensibilidad de cultivo <i>in vitro</i> de <i>Saintpaulia ionatha</i> expuesta a radiación gamma Co60.....	65
Gráfico 2.- Diagrama de cajas representando la distribución de datos para el índice de brotes en cada dosis de irradiación aplicada sobre el cultivo <i>in vitro</i> de <i>Saintpaulia ionatha</i> evaluadas 5 semanas después de la irradiación.....	66
Gráfico 3.- Diagrama de cajas para el crecimiento longitudinal de explantes <i>in vitro</i> de <i>Saintpaulia ionatha</i> para varias dosis de radiación gamma ^{60}Co evaluadas 5 semanas después de la irradiación.....	69
Gráfico 4.- Diagrama de cajas para el Número de hojas de <i>explantes in vitro</i> de <i>Saintpaulia ionatha</i> para varias dosis de radiación gamma ^{60}Co	72
Gráfico 5.- Porcentajes de supervivencia en la fase de aclimatación de plantulas de <i>Saintpaulia ionatha</i> irradiadas <i>in vitro</i>	75
Gráfico 6.- Diagrama de cajas representando la distribución de los datos obtenidos cada quince días para el número de hojas de los explantes aclimatados previamente irradiados <i>in vitro</i> con las dosis de 0, 10, 20 y 30 Gy evaluado cada 15 días.....	76
Gráfico 7.- Diagrama de Cajas representando la distribución de los datos obtenidos cada quince días para el tamaño de roseta de los explantes aclimatados previamente irradiados <i>in vitro</i> con las dosis de 0, 10, 20 y 30 Gy evaluada cada 15 días.....	78

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.- Dibujos de las partes que conforman la flor de <i>Saintpaulia ionatha</i> . Tomado y editado de (Randall & Vasquez, 1994).....	7
Figura 2.- Ficha Botánica de <i>Saintpaulia ionatha</i> (Clarke, 1998).....	8
Figura 3 Corte transversal del peciolo, indicando formación de raíces y de hebras formadoras de hojas (Naylor & Jhonson, 1937).....	13
Figura 4. Explantes de Violeta Africana, material vegetal preparado para ser irradiado	45
Figura 5.- Irradiador de 60Co J.L. Shepherd modelo 109.....	46
Figura 6.- Técnica utilizada para medir el crecimiento longitudinal de los explantes	48
Figura 7.- Técnica utilizada para medir el crecimiento longitudinal de los explantes	49
Figura 8.- Porciones robustas, consideradas como nuevos brotes	49
Figura 9.- Plántulas irradiados de Violeta Africana, en medio para enraizar.....	52
Figura 10.- Preparación de sustrato para aclimatación de <i>Saintpaulia ionatha</i> . A) Tamizado de Tierra negra B) Tamizado de Turba C) tamizado de cascajo D) mixtura final del sustrato requerido para la aclimatación.....	53
Figura 11.- A) Primera semana en la aclimatación de Violeta africana, uso de frasco de vidrio invertido B) día 8-28 en la aclimatación de Violeta Africana, uso de bolsa plástica.....	54

Figura 12.- Uso de Software para mediciones digitales de diametro A) Programa infinity analyze, usado durante el análisis B) Medición de fotografías de explantes de Violeta africana con el Paquete Infinity Analyze.....	55
Figura 13.- Número de hojas durante la fase de aclimatación de Violeta Africana	55
Figura 14.- A) Violeta Africana con el sistema vascular no viable, Necrosis avanzada del tejido vegetal a los 21 días B) Violeta Africana vigorosa a los 21 días de aclimatación	56
Figura 15.- Muestras vegetales utilizadas para realizar cortes ultrafinos. A) Violeta Africana <i>in vitro</i> irradiada con 30 Gy B) Violeta Africana <i>in vitro</i> irradiada con 30 Gy C) Violeta Africana <i>in vitro</i> sin haber sido expuestas a radiaciones. D) Violeta irradiada con 20 Gy	58
Figura 16.- Resina epoxi con muestra vegetal infiltrada	59
Figura 17.- A) Proceso de elaboración de cuchillas de vidrio B) cuchillas de vidrio para cortes de secciones finas.....	60
Figura 18.- Proceso de revestimiento de soportes de cobre con oro.....	61
Figura 19.- Proceso para realizar cortes ultra finos a) Tallado de la punta de la resina en forma de un trapecio, visto a través de microtomo b) cortes ultra finos con espesor de 70 nm vistos a través de microtomo, el color dorado de los cortes indica.....	62
Figura 20.- Tinción doble negativa. a) Cortes ultra finos sostenidos en un mesh sumergidos en acetato de uranillo. b) Lavados con agua destilada, para la remoción de exceso de los químicos d) Tinción con citrato de plomo.....	63
Figura 21.- Hojas de explantes <i>in vitro</i> A) muestra de hoja después de haber recibido una dosis de 30 Gy, muestra Q1 B) muestra B1, hoja de explantes que no han recibido radiación <i>in vitro</i>	80

- Figura 22.-** Célula vegetal de una sección de hoja de *Saintpaulia ionatha* 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 μ m..... 81
- Figura 23.-** Citoesqueleto de célula vegetal de una sección de hoja de *Saintpaulia ionatha* sin tratamientos de radiación con presencia de cloroplastos (Cl) y mitocondrias (Mt), un núcleo prominente (N). Bar= 2 μ m 81
- Figura 24.-** Cortes de 1000 nm de sección de hojas. Ensayo A A) Q1 magnificación 100x B) B1 con magnificación 40X C) B1 una magnificación de 100x..... 82
- Figura 25.-**Ensayo B. Cortes de 1000 nm de sección de Hojas para A) Q1 vistas con un aumento 100x B) B1 vistas con aumento 100x..... 83
- Figura 26.-** Ensayo C con resina suave cortes de 1000 nm de sección de Hojas A) Q1 vistas con un aumento 100x B) B1 vistas con aumento 100x. 84
- Figura 27.-** Ensayo D con resina media, cortes de 1000 nm de sección de Hojas A) Q1 vistas con un aumento 100x B) B1 vistas con aumento 100x. 85
- Figura 28.-** Ensayo E con resina dura, cortes de 1000 nm de sección de Hojas A) Q1 vistas con un aumento 100x B) B1 vistas con aumento 100x. 85
- Figura 29.-** Ensayo F que reúne los tratamientos realizados con fijación por un tiempo de 96 horas con Glutaraldehído, los cortes tienen un espesor de 1000 nm A) sección de Q1 vistas con un aumento 100x tratamiento Acetonitrilo como agente de transición B) Sección de B1 vistas con aumento 100x tratamiento con acetoniitrilo como agente de transición C) sección de Q1 vista con un aumento 100x tratamiento con Oxido de Propileno como agente de transición D) Sección

de B1 vistas con aumento 100x tratamiento con oxido de propileno como agente de transición	86
Figura 30.- Corte de 170 nm de la muestra Q1. El corte indica una deformación celular se reconoce la pared celular. (P) y el Nucleo (N). Bar: 2 um	87
Figura 31.- Ensayo G que reúne los tratamientos realizados con fijación con Glutaraldehido 3%, en buffer cacodilato 0.2 M lo cortes tienen un espesor de 1000 nm A) sección de Q1 vistas con un aumento 100x tratamiento acetonitrilo como agente de transición B) Sección de B1 vistas con aumento 100x. Tratamiento con acetonitrilo como agente de transición C) sección de Q1 vista con un aumento 100x tratamiento con oxido de propileno como agente de transición D) Sección de B1 vistas con aumento 100x tratamiento con Oxido de propileno como agente de transición.	88
Figura 32.- Ensayo F reúne los tratamientos realizados con fijación con Glutaraldehido 2.5%, en buffer PBS 0.1 M durante 2 horas los cortes tienen un espesor de 1000 nm A) sección de Q1 vistas con un aumento 100x B) Sección de B1 vistas con aumento 100x. C) sección de Q1 vista con un aumento 100x.....	89

LISTADO DE ANEXOS

A1.- Certificados de irradiación de plántulas de *Saintpaulia ionatha* ¡Error! Marcador no definido.

B1.- Tabulación de datos del estudio de radiosensibilidad de *Saintpaulia ionatha in vitro*
irradiadas con dosis de 0-100 Gy ¡Error! Marcador no definido.

B2.- Tabulación de datos del estudio de radiosensibilidad de *Saintpaulia ionatha*
en campo irradiadas con dosis de 0-30 Gy ¡Error! Marcador no definido.

RESUMEN

El cultivo *in vitro* es una técnica innovadora, 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 dirigida hacia sistemas biológicos ofrece la herramienta ideal para generar ventajas genéticas competitivas de una especie. *Saintpaulia ionatha* es una especie ornamental ampliamente cultivada por su excelente potencial regenerativo y capacidad de adaptación. El uso de radiación sobre cultivos ornamentales es bastante aplicado por la alta probabilidad de generar variedades diferenciadas en su fenotipo. La presente investigación está dirigida a conocer los efectos de la radiación gamma del ^{60}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

ABSTRACT

The *in vitro* culture is an innovative technique, allows mass reproduction of plants from any small portion in a nutrient medium with controlled conditions. These techniques, combined with nuclear techniques that exploit the energy from the atomic nucleus directed toward biological systems provide the perfect genetic tool to generate competitive advantages efficiently. The African violet (*Saintpaulia ionatha*) is ornamental specie widely cultivated for its excellent regenerative potential and adaptability to interior spaces. The use of radiation on ornamentals is applied for the fairly high probability of generating differentiated phenotype varieties. This research aims to understand the effects of the gamma isotope ^{60}Co radiation in the development and survival of *in vitro* African violet (*Saintpaulia ionatha*) plants. *In vitro* explants were irradiated with doses ranging from 0 to 100 Gy and survival rate, number of leaves and shoot production were evaluated. The LD50 for the explants was 53 Gy, the number of leaves and shoot production is stimulated with a dose of 10 Gy. Explants with doses from 0 to 30 Gy were acclimated in a substrate composed of black soil, peat and gravel in a ratio of 2:1:1 after planting; survival, number of sheets and size of the rosette were evaluated for 6 weeks. Survival explants 0 Gy is 88 % and severely diminishes with 30 Gy dose showing a 64 % survival. Trials in preparing samples for ultrathin sections indicated a high susceptibility to damage by irradiated tissue to fixing solutions.

Key Words: mutagenesis, *in vitro*, cobalt 60, acclimatation, radiosensib

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN

1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Pese a que la tecnología de DNA recombinante se ha convertido en el eje del mejoramiento genético en la actualidad, siendo la transgénesis la mejor opción para quienes buscan nuevas variedades con características específicas, el Ecuador, es considerado un país libre de transgénicos ya que su constitución en su artículo 401 menciona que: “Se declara al Ecuador un país libre de cultivos y semillas transgénicas. Excepcionalmente, y sólo en caso de interés nacional debidamente fundamentado por la Presidencia de la República y aprobado por la Asamblea Nacional, se podrán introducir semillas y cultivos genéticamente modificados”. Lo que reduce los programas de mejoramiento genético de especies vegetales al entrecruzamiento, y mutagénesis.

La mutagénesis, junto con el mejoramiento clásico puede generar nuevas variedades de las plantas. Las mutaciones pueden ser inducidas por mutágenos físicos o químicos que se pueden aplicar a todas las especies de plantas y animales. Los mutágenos químicos incluyen una gran variedad de reactivos que se clasifican en análogos de bases, agentes que reaccionan con el DNA y agentes intercalantes, el resultado de cualquiera de estos, tienen el mismo fin; daño al DNA. Los mutágenos físicos consisten en radiaciones no ionizantes

(rayos UV) o ionizantes (rayos x, gamma, alfa, beta y neutrones rápidos y lentos) (Puchooa, 2005). El desarrollo de la tecnología de irradiación en el país empieza en 1981 liderada por el Departamento de Ciencias Nucleares de la Escuela Politécnica Nacional, y sus investigaciones han sido reducidas a estudios fitosanitarios. (Alcérreca, 2009).

El efecto de la mutación en plantas ornamentales es muy visible, por lo que la selección para cambio en el color de la flor, sin necesidad de análisis comprobatorios. La generación de nuevas variedades con radiaciones gamma de 60CO está bien establecido, existen distintos cultivos tratados con esta técnica como en *Jatropha curcas* (Songsri, P. 2011), Nardo (*Polianthes tuberosa*) (Estrada J., 2011); Anturios (*Anthurium andreamum*), (Puchooa, 2005), entre otras. Donde los resultados alcanzados han otorgado al producto ventajas competitivas muy importantes, como la aceleración de germinación, obtención de nuevos colores de flor, inducción a mejor crecimiento.

La Violeta Africana fue descubierta en 1892 en el este de África, por el Barón Walter von Saint Paul, el género fue nombrado en su honor, pertenece a la familia de las *Gesneriaceae*, siendo la especie más común la *Saintpaulia ionatha*. Este género está formado por seis especies de plantas herbáceas procedentes de África tropical, siendo esta la especie más cultivada (Espinoza-Reyes *et al*, 2007).

1.2 JUSTIFICACIÓN DE PROBLEMA

En la actualidad las plantas ornamentales son muy cotizadas en el mercado mundial, aportando buenos ingresos a los países productores y exportadores (Espinoza A., 2007). El mejoramiento clásico, como se le conoce al cruzamiento entre especies, es un proceso continuo, acumulativo, competitivo y lento. Se necesitan entre 5 a 10 años para lograr nuevas variedades, según la especie, es por esto que la ciencia a lo largo de la historia ha propuesto distintas maneras para generar nuevas variedades 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).

Finalmente, el uso de herramientas como la microscopía 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).

1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.3.1 Objetivo general del proyecto

Evaluar los efectos de la radiación gamma cobalto 60 en el desarrollo y supervivencia de plantas *in vitro* de Violeta Africana (*Saintpaulia ionatha*).

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Aplicar la tecnología de radiaciones gamma ^{60}Co para el tratamiento de explantes *in vitro* de Violeta Africana (*Saintpaulia ionatha*) con el uso del irradiador J.L. Shepherd modelo 109, que pertenece al laboratorio de mutaciones genéticas del ministerio de Electricidad y Energía renovable
2. Determinar la dosis letal media para una población *in vitro* de violeta Africana (*Saintpaulia ionatha*)
3. Comparar 11 tratamientos de radiación, evaluando el número de hojas, de brotes, tamaño y supervivencia de los mismos.

4. Aclimatar, y evaluar el efecto de las radiaciones gamma ^{60}CO en la supervivencia y desarrollo de las plántulas ex vitro.
5. Describir la morfología foliar de violeta africana (*Saintpaulia ionatha*) sometidas a radiación ^{60}CO mediante cortes ultra finos por microscopia electrónica en el laboratorio de microscopia de la Escuela Politécnica de las Fuerzas Armadas ESPE.

1.4 MARCO TEÓRICO

1.4.1 Descripción Botánica

Saintpaulia ionatha es una planta herbácea perenne, baja y compacta, pubescente, de tallo ausente muy corto, miembros del género *Saintpaulia* son caracterizadas por pedúnculos que provienen de la corola o de las yemas axilares de las hojas a lo largo del tallo. Los pedúnculos sostienen entre 2-10 o más flores. Las hojas, pedúnculos, y peciolos son usualmente cubiertos con pelos. Las flores de *Saintpaulia* son azules, azul violeta, bicolor o blanco, con apariencia zigomorfas y bilabiadas con 5 lóbulos redondos. Las anteras son unidas en las puntas y están una frente a la otra y el polen no está disperso aleatoriamente, por el contrario se encuentra confinado en sus anteras.

Los estambres, por su parte, están representados por dos a tres papilas en el tubo de la corola. Un anillo de color anaranjado o amarillo rodea la base

superior del ovario, que encuentra inserto ligeramente a un lado del centro de la corola. El estilo y estigma usualmente tienen el mismo color de los pétalos, el estigma es pequeño, terminal y generalmente tiene una depresión, como se ilustra en la figura 1 (Henny & Chen, 2012).

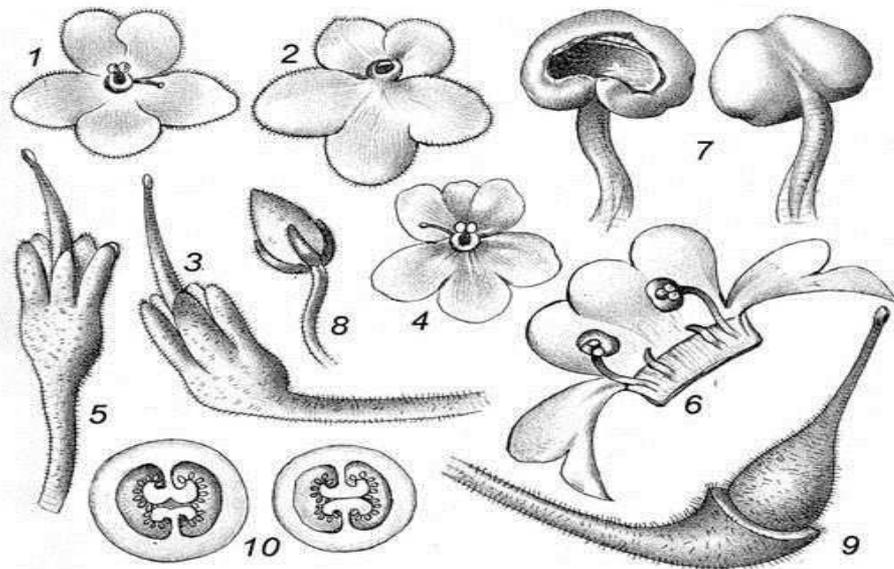


Fig. 1: Corolla, vista frontal
 Fig. 2: Corolla vista dorsal
 Fig. 3: cáliz de figura 1 y 2
 Fig. 4: Corolla
 Fig. 5: cáliz perspectiva agrandada
 Fig. 6: corolla, corte longitudinal
 Fig. 7: Estambres, vista dorsal y frontal
 Fig. 8: Fruto inmaduro
 Fig. 9: Fruto inmaduro con visto sin cáliz
 Fig. 10: Corte transversal de fruto

Figura 1.- Dibujos de las partes que conforman la flor de *Saintpaulia ionantha*. Tomado y editado de

Fuente: (Randall & Vásquez, 1994).

Esta especie ha dado origen a través de los años a una gran cantidad de variedades y formas, algunas enanas o colgantes con flores sencillas,

semidobles o dobles, así como diversas formas de hoja. Para florecer necesitan como mínimo catorce horas de luz diarias, siendo este requisito más importante aún que la intensidad lumínica (Clarke, G. 1998). Muy pocos cultivos de violeta provienen de semillas, la mayoría proviene de propagación por estacas y cultivo *in vitro*. (Henny & Chen, 2012).



Figura 2.- Ficha Botánica de *Saintpaulia ionantha*

Fuente: (Clarke, 1998)

1.4.2 Cultivo de *Saintpaulia ionatha*

Las violetas africanas se cultivan como plantas de maceta, tienen una buena adaptación a diferentes condiciones ambientales, sin embargo requieren de 16 horas luz, con una intensidad entre 8000 y 10000 y un porcentaje de humedad entre 50 y 70%, para asegurar su crecimiento y floración (Dana, *et al*, 2001).

La temperatura ideal para *Saintpaulia ionatha* es alrededor de 16 °C por la noche y entre 20-25 ° C durante el día. El crecimiento de la planta se detiene a temperaturas bajas menores a 4° C y el proceso de recuperación de latencias es lento, en contra parte son susceptibles a deteriorases con temperaturas altas (sobre 30°C). El suelo debe mantenerse húmedo todo el tiempo, con una humedad relativa que no supere el 70%, asegurando que el follaje se mantenga seco, gotas de agua sobre las hojas causan decoloración en las hojas o manchas (Henny & Chen, 2012).

La intensidad lumínica es otro factor a tomar en cuenta en la producción y propagación de Violetas, se recomienda entre 8000-10000 Lx. La intensidad lumínica influencia en la apariencia foliar de *Saintpaulia*. Plantas que presentan hojas verde oscuras con peciolo largos requieren más luz, mientras que variedades con follaje verde claro, necesitara reducir su nivel de luz. Las plantas que reciben mucha luz tienden a marchitarse produciendo hojas débiles,

peciolos cortos y follaje blanqueado. El exceso de luz, incluso por poco tiempo, puede quemar flores y hojas (Henny & Chen, 2012).

Cassells, A & Plunkett, A. (1984) describieron el ciclo de crecimiento de violetas Africanas a partir de su propagación por esquejes de hojas en campo, el proceso implica que entre las cinco a seis primeras semanas de siembra se generan las raíces, a partir de las siguientes 17 semanas se generan la cantidad de hojas suficientes para ser trasplantada a un nuevo sustrato, y en las siguientes 27 semanas podrá ocurrir su floración, este fenómeno depende únicamente de que la planta y tenga las adecuadas condiciones de riego, luz, nutrientes, temperatura y humedad. A partir de la primera floración, con el cuidado adecuado la planta es capaz de mantener sus inflorescencias a lo largo del año, sin necesidad de una época específica, siempre y cuando se cuente con los requerimientos de luz, temperatura y nutrientes (Dana, *et al*, 2001).

Uno de los mayores problemas asociados al cultivo de violetas es la susceptibilidad de las raíces y la corona de la planta por exceso de humedad que permiten el crecimiento del hongo *Pythium ultimum*. La corona y raíz de estas plantas infectadas se tornan verde oscuro con una textura suave, generando hojas marchitas. (The American Phytopathological Society, 1999).

La Brotitis es otra enfermedad que se ha reportado con gran frecuencia en el cultivo de Violeta Africana se caracteriza por la presencia de un moho polvoriento de color gris que puede afectar a toda la planta, suele morir la parte afectada. Se debe en general a excesos de humedad en el sustrato. Alta

humedad, poca iluminación, poca circulación de aire contribuye a la aparición de esta enfermedad. Las esporas del patógeno son esparcidas por contacto directo entre hojas. Acompañando la infección generalmente aparecen daño por nematodos, controlando la plaga ayuda también a la enfermedad, aun así no se puede descartar el uso de fungicidas foliares (The American Phytopathological Society, 1999).

Existe también la posibilidad de que haya daños a la altura del peciolo, este se reconoce por la coloración café-anaranjado, o como un color de oxidado, alrededor de las zonas donde el peciolo este con contacto con el borde de la maceta o con el suelo. Esto es agravado por la acumulación de fertilizantes o sales en el sustrato, o en el borde de la maceta, es posible prevenir este efecto cubriendo el borde de la maceta con aluminio, o con riego intermitente (Espinoza, *et al*, 2005).

Otro daño en la fisiología de la planta puede ser un repente aparición de anillos amarillos o blancos, que ocasionalmente aparecen sobre las hojas, debido a un estrés por un cambio de temperatura extrema, esto puede ser cuando se ha dado riego con agua más fría a la temperatura ambiente. Esta condición es conocida como clorosis y puede ser evitada regando cuidadosamente las plantas, con agua ligeramente más caliente que el ambiente (Soto & Vega, 2011).

Las violetas que han sido infectadas por nematodos que atacan a segmentos nodales de la raíz tienen una apariencia débil, y la formación de

protuberancia en la raíz o en hojas. Oídio es una enfermedad fúngica que se caracteriza por el brote de una sustancia grisácea clara, de consistencia polvorienta que crece a lo largo de los tallos y peciolos. Las consecuencias es la disminución en la vida de las flores y no permite el crecimiento de la violeta. Oídio crece a temperaturas bajas, alta humedad, y aire estancado. La mejor cura es la circulación de aire (Soto & Vega, 2011).

Una plaga predominante en estos cultivos también es la presencia de Mosca Blanca que son pequeños insectos voladores de color blanco, casi transparentes, absorben las partes tiernas de las plantas y la debilitan. Suelen situarse en grupos en el envés de las hojas (The American Phytopathological Society, 1999).

La cochinilla algodonosa por su parte se reconoce por las hojas con el envés cubierto de pequeños insectos algodonosos, blancos y blandos, que desprenden melaza y se protegen con una capa de cera. También pueden situarse a lo largo de los tallos de la planta. Los pulgones y las cochinillas se pueden eliminar fácilmente con productos fungicidas e insecticidas específicos (The American Phytopathological Society, 1999).

1.4.3 Descripción histológica de hojas y peciolo de *Saintpaulia ionatha*

La violeta Africana, ha sido blanco de diferentes estudios pues ha despertado especial interés por la facilidad con la que puede regenerar plantas a partir de una sección de peciolo o hoja (Naylor & Jhonson, 1937).

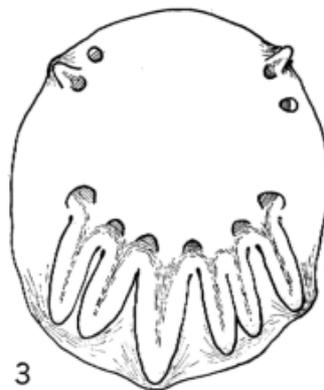


Figura 3 Corte transversal del peciolo, indicando formación de raíces y de hebras formadoras de hojas (Naylor & Jhonson, 1937).

En un corte transversal de peciolo se puede observar que está compuesto de células parenquimatosas a través de las cuales existen hebras de tejido vascular que se extiende entre el haz vascular del peciolo y una hoja, a partir del cual se generan nuevas hojas, estas hebras se encuentran dispuestas en forma de media luna, con las puntas dirigidas hacia la superficie superior del peciolo. Las puntas de las hebras se encuentran muy cerca de la superficie y son mucho más pequeñas que las otras (Naylor & Jhonson, 1937).

Las células del xilema con pared celular delgada son abundantes, especialmente en las hebras vasculares más largas, y son encontradas siempre dentro del margen de la media luna y hacia la parte superior del peciolo. El floema no es altamente diferenciado, contiene algunas células parenquimatosas y otras células pequeñas difíciles de identificar. Células con pared celular delgada se encuentran en pequeños grupos distribuidos entre las hebras vasculares de hojas, entre estas se puede distinguir células alargadas de pared celular delgada, en las cuales el origen de la nueva planta tiene lugar. La presencia de este tejido en hojas y la distribución de los elementos vasculares en los peciolos es un campo largo de estudio (Naylor & Jhonson, 1937).

La epidermis de la lámina de la hoja de *Saintpaulia* se distingue por células grandes, con enormes vacuolas, con una delgada capa de citoplasma periférico y un núcleo prominente, debajo de esta encontramos una capa de tejido empalizado, reducido a una pequeña capa de células con forma de cono, que están alternadas con abundantes cloroplastos; es interesante señalar que en las zonas jaspeadas de la zona laminar de las hojas las células empalizadas son encontradas más pequeñas en tamaño y con menos cloroplastos que en las zonas verdes (Naylor & Jhonson, 1937)

Pequeñas hebras vasculares, son vistas directamente debajo de la capa de tejido empalizado. Internamente está compuesto por células parenquimáticas, con forma irregular, distribuidas sin un orden específico, y con unos cuantos cloroplastos dispersos.

1.4.4 Cultivo *in vitro*

El cultivo de tejidos *in vitro* es una definición genérica que incluye el cultivo de protoplastos, de células, de tejidos, de órganos y de plantas. Estos diferentes tipos de cultivo tienen como factor común, el crecimiento en condiciones estériles, en un medio nutritivo, generalmente gelificado, y en condiciones ambientales controladas (temperatura, humedad y luz), y óptimas (Pérez, 1998).

El cultivo *in vitro* constituye un conjunto de técnicas cuyas aplicaciones son muy utilizadas en la actualidad, gracias a lo cual se ha podido obtener distintos tipos de cultivos partiendo de cualquier tipo de explante (una sección de la planta madre o donadora) en un medio nutritivo artificial y con condiciones controladas imitando, en lo posible, las condiciones originales del campo (Roca & Mroginski, 1993).

El cultivo de tejidos es de mucha utilidad en la micro propagación, permite la multiplicación masiva de una especie de interés, o de un individuo específico cuyas características sean de utilidad mantener, importante también para el saneamiento y conservación de nuevas variedades especialmente aquellas susceptibles a determinadas patologías. Las plantas con estas características, libres de patógenos, adquieren un alto valor comercial, y son requeridas por agricultores a pesar de su costo (Pérez, 1998).

Otra ventaja desde el punto de vista comercial es que la micropropagación es una técnica de clonaje con la cual se necesita poco espacio y se puede obtener plantas durante todo el año. Desde el punto de vista fisiológico los explantes adquieren un aumento en la producción de brotes laterales y de la tasa de mutilación; hojas pequeñas, entrenudos más cortos y tallos más finos; una alta capacidad para enraizar y de formar raíces adventicias; y una buena recuperación del vigor en el crecimiento (Pérez, 1998).

Dentro del proceso de cultivo de tejidos, podemos diferenciar varias etapas, que abarcan el ciclo completo de la multiplicación de plantas *in vitro*; La mayoría de especies vegetales cumplen plenamente con el esquema, sin embargo de acuerdo a las características de la planta pueden sufrir adaptaciones o simplificaciones. La primera etapa, también conocida como fase 0 es la selección de la planta madre, donde se elige la planta donadora de explantes, que por lo general es escogida por ser una planta élite, o con características de interés, con el fin de obtener cultivos asépticos es recomendable mantener durante algún tiempo a la planta donadora en un ambiente controlado, con un grado nutricional monitoreado para permitir así un crecimiento vigoroso y libre de patógenos (Castillo, 2008).

En seguida tenemos la etapa de desinfección, o fase 1, en la que la porción de la planta que se va utilizar pasa por un proceso de desinfección que permite eliminar los contaminantes más comunes como son bacterias, hongos, insectos y rastros de tierra, para luego ser introducido al ciclo del cultivo *in vitro*

en una segunda fase conocida como establecimiento, donde se busca la sobrevivencia, regeneración y crecimiento del explante en un medio de cultivo estéril adecuado, si el explante sobrevive y su índice de contaminación es inferior al 10% se procede a la multiplicación de brotes, en esta tercera fase se espera que las porciones de plantas introducidas generen brotes, axilares o adventicios, con varias hojas, para ser cultivados en un nuevo medio, permitiendo así generar el número de plántulas requeridas, con las mismas características de la planta madre (Henny & Chen, 2012).

Cunado las plantas hayan alcanzado un tamaño aproximado de 2 cm se lleva a una cuarta fase donde se busca un medio de cultivo adecuado que le permita generar raíces con el fin de obtener plantas completas que sean capaz de captar sus propios nutrientes y que al finalizar la quinta y última fase, de aclimatación, sean capaz de sobrevivir en el campo (Castillo, 2008).

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que este proceso de adaptación es crítico para el éxito de cualquier ensayo. En la fase de aclimatación, las plantas sufren cambios de diferente tipo que permitirán la adaptación para vivir en condiciones naturales, se debe considerar que las plántulas *in vitro* están adaptadas a ambientes con humedad relativa muy elevada, y generalmente tienen estomas que son completamente funcionales, haciendo más difícil que la planta se adapte fácilmente a bruscos descensos de humedad (Castillo, 2008). Se debe tomar en cuenta que hay una gran cantidad de tejidos que no crecen en medios

únicamente con sales minerales y vitaminas ya que únicamente crecerán cuando se les suministre alguna sustancia reguladora de crecimiento como las auxinas, citoquininas, giberelinas y sustancias similares.

1.4.4.1 Medio de Cultivo

Cuando una porción de la planta ha sido aislado, con fines de su regeneración, no puede recibir por sí solo los nutrientes u hormonas de la planta, por lo que se debe proveer al explante las sustancias necesarias para que pueda crecer *in vitro* (Roca & Mroginski, 1993).

La composición del medio nutriente, dependerá de lo que se quiera lograr con el explante, como puede ser obtener un tejido no diferenciado (callo), crecer yemas y raíces, u obtener embriones somáticos para producir semillas artificiales. Para crecer, las células requieren una variedad de nutrimentos orgánicos e inorgánicos; estos requerimientos se demuestran fácilmente en órganos y tejidos extirpados de plantas superiores e inferiores (Roca & Mroginski, 1993).

Los medios comúnmente son suplementados con hormonas, cuando se desea un crecimiento o una diferenciación celular. El medio base contiene macro nutrientes (H, O, P, K, N, S, Ca y Mg) y micro nutrientes (B, Zn, Mn, Cu, Mo, Fe, Cl), sales, una fuente externa de carbón como la sacarosa, y una o dos

vitaminas, en especial tiamina. La selección y modificación de un medio de cultivo apropiado ha sido simplificado gracias a los esfuerzos de Philp R., White, K.V. Thimann, Flke Scoog, Carlos O. Miller, Toshio, Murashige, y sus estudiantes y colegas. La formulación de sales en el medio conocido como MS (Murashige y Skoog), publicado en 1962, representa uno de los mayores logros, facilitando grandes avances a la agricultura y a la biología (Roca & Mroginski, 1993).

Las auxinas comprenden una gran familia de sustancias que tienen en común la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular; sin embargo, se ha encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular en el cultivo de tejidos; como ejemplos representativos tenemos: AIA (Ácido indolacético), AIB (Ácido indolbutírico), 2,4-D (Acido 2,4 diclorofenoxiacético), entre otros (Roca, W. & Mroginski, L., 1993).

Las citoquininas comprende el conjunto de sustancias que promueven la división y la diferenciación celular, entre los más utilizados tenemos: BAP (Bencilaminopurina), ZEA (Zetina), KIN (Kinetina), entre otras. Las giberelinas comprenden un grupo muy selecto de sustancia que provienen del hongo *Gibberella fujikuroi*. Estas sustancias son capaces de intervenir en el crecimiento de muchas plantas ocasionando especialmente un alargamiento celular que de otra forma no ocurriría (Roca & Mroginski 1993).

El etileno es una molécula gaseosa, presente en algunos seres vivos como las plantas, bacterias, además de musgos, helechos y otros organismos,

dentro de las especies vegetales esta molécula actúa como una hormona en el reino animal actúa como una hormona cuyos principales efectos son la expansión celular y la inducción a la floración (Beyer, *et al*, 1990).

La expansión celular genera un efecto conocido como “triple respuesta” que se da como resultado de la expansión en hojas, la expansión lateral en plántulas en germinación con inhibición de la elongación del epicotíleo y radícula y el incremento en la curvatura a nivel de la porción cotiledonar (Jordan & Casaretto, 2006).

El etileno no solo es conocido por su gran influencia en la floración, sino que a nivel comercial ha sido de gran ayuda para la sincronización del tamaño y madurez de la fruta, para lograr que las cosechas se puedan realizar en una sola recolección (Jordan & Casaretto, 2006).

El hecho de que el etileno se encuentre de forma gaseosa, facilita su transporte, incluso puede llegar a lugares mucho más distantes a el lugar donde se produjo la señal que estimulo su producción, conjuntamente ha sido de interés la forma de causar efectos con concentraciones tan bajas, comúnmente son encontradas concentraciones menores a 1 ppm. Se presume además que estaría relacionado con la acción de auxinas dado que en presencia de ésta, etileno incrementa sus efectos (Jordan & Casaretto, 2006).

El ácido abscísico por su parte es también una fitohormona que está implicada en múltiples procesos fisiológicos como regulación de crecimiento,

dormancia de semillas, germinación, senescencia, división celular, control de la apertura de estomas y respuestas a estreses ambientales como sequía, salinidad, baja temperatura, ataque por patógenos y radiación ultravioleta (Jordan & Casaretto, 2006).

En 1960 fue reportada por primera vez la hormona ABA (ácido abscísico) tras estudios realizados en dormancia de yemas y abscisión de frutos los estudios fueron realizados en algodón. (Addicott & Carns 1983; Leung & Giraudat 1998; Assmann & Shimazaki 1999). ABA controla muchos aspectos importantes del desarrollo de la planta, incluyendo la síntesis de proteínas y lípidos de almacén en semillas, la adquisición de la tolerancia de semillas a la desecación y la inhibición de la transición a germinación y crecimiento reproductivo.

En los años 70, fue descubierta una nueva hormona, extraída del polen de nabo (*Brassica napus*), al descubrir que sus extractos promovían la elongación de entrenudos en plántulas de frejol. Se estima de 40 kg polen de *B. napus* se pudieron aislar 4 mg de un compuesto cristalino activo, capaz de inducir crecimiento (Jordan & Casaretto, 2006).

La primera brasinolida identificada fue en 1979, seguida de castasterona en 1989; para el 2013 se conoce alrededor de 60 brasinoesteroides en diversas especies vegetales. Muchas de ellas han sido aisladas de brotes apicales y tejidos vegetativos activos de plantas jóvenes, y de semillas (Bajguz & Tretyrn 2003).

Sus efectos fisiológicos son variados, entre los más destacados encontramos el crecimiento, diferenciación, Morfogénesis, tolerancia a estrés biótico y abiótico y genera un aumento de la productividad en cultivos. Se cree además que es un potenciador de auxinas y citoquininas (Hoyos, *et al*, 2008).

Las poliamidas son un grupo de reguladores de bajo peso molecular, alifáticos nitrogenados con diversos efectos sobre el crecimiento, la división, y la diferenciación celular, están presentes en concentraciones más altas que el resto de hormonas. Sin embargo, se les considera también mediadores de la acción de otras hormonas (Beyer, *et al*, 1990).

Una característica importante de estas moléculas es su carácter policationico que le permite unirse a moléculas de carga negativa con mayor facilidad, siendo un buen enlace de unión con los grupos fosfatos, de ácidos nucleicos, u otros compuestos como componentes de pared celular (Hoyos, *et al*, 2008).

Su papel fisiológico ha sido cuestionado ya que no se ha logrado establecer una relación entre su producción en respuesta con algún tipo de estrés. Sin embargo gracias a técnicas moleculares se ha logrado identificar a muchas de ellas actuar en la tolerancia a sequias y a otras formas de estrés ambiental (Beyer, *et al*, 1990).

Los jasmonatos, son un grupo de moléculas de origen lipídico con una estructura molecular similar a la de las prostaglandinas en animales, el ácido

jasmónico, el principal de este grupo es, encontrado en una serie de respuestas de estrés de las plantas hacia señales como heridas, ataque por patógenos y plagas, exposiciones a sequía y ozono. (Creelman & Mullet, 1997; Farmer *et al*, 2003).

Los primeros estudios llevados acerca de los jasmonatos revelaron su efecto como inhibidores de crecimiento, y promotores de senescencia en varias de las especies vegetales, sin embargo se sabe ahora, que a más estos efectos el ácido jasmónico y sus estéreo isómeros, contribuyen también con el desarrollo de las plantas (Creelman & Mullet, 1997). Por ejemplo se presume que el ácido jasmónico (JA) contribuye a la germinación de semillas, promueven el cierre de estomas en condiciones de estrés, y la producción de etileno, por ende está involucrado en los procesos de maduración de frutos. Su ausencia en contra parte afecta al desarrollo normal del polen e inhibe la germinación del mismo (Jordan & Casaretto, 2006).

Dentro de los efectos fisiológicos más sobresalientes del ácido jasmónico (JA) y sus derivados encontramos, el desarrollo de un sistema de defensa a el ataque por agentes patógenos, en hojas de papa por ejemplo, estimula la resistencia al ataque de insectos otros efectos son muy parecidos a los del ácido abscísico (ABA), como la inhibición de germinación en semillas, la degradación de clorofila, senescencia y abscisión de hojas (Creelman & Mullet 1997).

1.4.5 Mejoramiento Genético

Considerada la gran importancia de las plantas, no sorprende que el hombre se haya preocupado desde hace miles de años por obtener tipos de plantas superiores para satisfacer sus necesidades, mediante la aplicación intuitiva de procesos de selección. Sin embargo, estos intentos se sistematizaron con el desarrollo de la genética (Cornide, 2001).

Los métodos convencionales para el mejoramiento genético han sido los cruzamiento y la selección; complementados en ocasiones con técnicas citogenéticas y de mutagénesis artificial. Sin embargo a medida que la década de los ochenta avanzó, con ella el desarrollo científico, se inició la aplicación de la ingeniería genética molecular en la mejora de especies vegetales mediante la utilización de plantas transgénicas (Novak & Brunner, 1992).

En los programas de mejoramiento de especies vegetales, se requiere un sistema que involucre herramientas complementarias al sistema de mejora convencional, buscando el aprovechamiento adecuado de la variabilidad genética que se cuenta. En este grupo de herramientas se encuentran el cultivo de tejidos *in vitro*, la inducción de mutaciones y la transformación genética (Novak & Brunner, 1992).

1.4.6 Inducción de mutaciones

Las mutaciones inducidas en especies vegetales son procedimientos utilizados desde hace más de ochenta años, que emplea mutágenos para reorganizar la composición genética sin modificar el genoma de las plantas que permitan aumentar y mejorar su rendimiento (Novak y Brunner, 1992).

El cultivo de tejidos *in vitro* permite el manejo de grandes poblaciones y la selección y clonación de las variantes seleccionadas. Además, ofrece la posibilidad de realizar en forma rápida los ciclos de propagación con el propósito de separar los sectores mutados de los no mutados del tejido tratado, y permite un control de las condiciones fitosanitarias durante todo el proceso (Predieri y Zimmerman, 2001; Ahloowalia, 1998).

Estas mutaciones no pueden ser dirigidas a un gen específico, solamente se limita al genoma preexistente, es decir que los genes que no existen no pueden ser mutados ni eliminados. Entre los mutágenos que se utilizan para esta técnica de generación de variabilidad podemos encontrar agentes físico o químico capaz de alterar o cambiar la información genética de un organismo e incrementa la frecuencia de mutaciones por encima del nivel natural (Konzak *et al.*, 1965).

1.4.6.1 Mutágenos químicos

Se conocen varios productos químicos que son mutagénicos, clasificándose según su modo de acción en (Novak y Brunner, 1992). Análogos de bases: debido a su similitud estructural los análogos de bases como el 5-Bromouracilo o la 2-Aminopurina se incorporan en el ADN que se replica en lugar de las bases correspondientes timina y adenina. Cuando uno de estos análogos de bases se incorpora en el ADN, la replicación puede ocurrir normalmente aunque ocasionalmente, ocurren errores de lectura que resultan en la incorporación de bases erróneas en la copia de ADN (Pabón, 2011).

Existen una serie de agentes químicos que reaccionan directamente sobre el ADN que no se está replicando ocasionando cambios químicos en las bases, lo que provoca un apareamiento incorrecto, a continuación se nombran algunos agentes que reaccionan con el ADN:

Ácido nitroso (HNO_2).- Desamina la adenina a hipoxantina y la citosina a uracilo. Debido a las distintas propiedades de apareamiento de los productos de des-aminación, se producen transiciones.

Hidroxilamina (NH_2OH).- Reacciona con la citosina donde el grupo amino es reemplazado por un grupo hidroxilamino. Este derivado de la citosina se aparea con adenina produciéndose transiciones GC ----> AT

Otro grupo de productos químicos que afectan al ADN que no se replica son los agentes alquilantes, que incluyen el etil metano sulfonato (EMS), metil metano sulfonato (MMS), dietil sulfato (DES), diepoxi butano (DEB), Nmetil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), N-metil-N-nitroso urea y gas mostaza. Un grupo interesante de sustancias, acridinas y bromuro de etidio, son moléculas planas que se insertan entre dos pares de bases del ADN, separándolas entre sí. Durante la replicación, esta conformación anormal puede conducir a micro inserciones o micro elecciones en el ADN (Pabón, 2011).

1.4.6.2 Mutágenos físicos

Entre los mutágenos físicos más importantes utilizados en radiobiología encontramos a los rayos X, La radiación gamma, la radiación beta, radiación UV y neutrones. El Cesio¹³⁷ y ⁶⁰CO son las principales fuentes de rayos gamma utilizados. El Cesio137 es usado en muchas instalaciones teniendo en cuenta que tiene una vida media más larga que el ⁶⁰CO (Robert & Cherry, 2001).

En cuanto a la radiación ultravioleta tiene una limitada habilidad de penetración en los tejidos por lo que el uso en experimentos biológicos está restringido al tratamiento de esporas o granos de polen (Robert & Cherry, 2001).

La radiación beta por su parte está compuesta de partículas (electrones) generadas en radioisótopos como el ^{32}P (Fosforo 32) y ^{35}S (Azufre 35). Producen un efecto similar a los rayos X o gamma, pero con más baja habilidad de penetración. Los neutrones, tienen un amplio rango de energía 0.1 a 10 eV y son obtenidos de la fisión nuclear en un reactor nuclear con ^{235}U . Los neutrones han mostrado ser muy efectivos en la inducción de mutaciones en plantas (Robert & Cherry, 2001).

1.4.7 Radioactividad

La radioactividad fue descubierta en 1895 por H. Bequerel en Paris. La existencia de nucleídos espontáneamente inestables se revela porque cuando estos nucleídos se trasforman en otros diferentes emiten partículas subatómicas dotadas de energía cinética elevada, las cuales pueden ser detectadas directa o indirectamente gracias a los efectos que producen sobre el medio circundante.

El fenómeno de las transformaciones es conocido como radioactividad (Rodríguez, 1978). Las publicaciones de Bequerel, interesaron a María Sklodowska Curie y a Pierre Curie, quienes establecieron que la radiación emitida era proporcional a la masa del elemento radioactivo presente, y

descubrió dos elementos químicos radioactivos que hoy en día los conocemos como radio y polonio (^{226}Ra , ^{210}Po) (Rodríguez, 1978).

La emisión de radiaciones ionizantes es una característica común a muchos átomos en cuyo núcleo el número de neutrones resulta escaso o excesivo, lo que les hace inestables. Esos átomos son llamados “radiactivos”. En ellos, las ligaduras nucleares se transforman en busca de configuraciones más estables, a la vez que se libera energía, asociada a la radiación emitida. Esta puede ser de cuatro tipos fundamentales: partículas alfa (α), que consisten en dos protones y dos neutrones, con capacidad limitada de penetración en la materia, pero mucha intensidad energética; partículas beta (β), que son electrones o positrones procedentes de la transformación en el núcleo, algo más penetrantes aunque menos intensas; radiación gamma (γ), que es radiación electromagnética del extremo más energético del espectro, por tanto muy penetrante; y neutrones, que al no poseer carga eléctrica también son muy penetrantes (Rodríguez, 1978). La intensidad de las transformaciones radioactivas disminuye con el tiempo según las leyes fijas (Rabin & Gonzalez, 2011).

Los señores Curie concluyeron que ningún agente físico tal como temperatura, presión, electricidad, magnetismo, etcétera, era capaz de afectar la intensidad de las transformaciones, lo que nos permite, hoy en día, entender la diferencia entre transformación química y radioactiva. La primera es una transformación interatómica y la segunda es nuclear (Rodríguez, 1978).

El tiempo requerido para la actividad de una masa cualquiera de un determinado nucleído radioactivo decaiga una fracción determinada, por ejemplo 20% de la actividad inicial, es siempre el mismo. Esto significa que cada nucleído tiene un ritmo propio, constante de transformación. Se acostumbra a adoptar la fracción $\frac{1}{2}$, es decir, la disminución a la mitad de la actividad original. El tiempo necesario para que eso ocurra se denomina periodo de semi desintegración (Rabin & Gonzalez, 2011).

La radiación produce a su paso electrones, iones y moléculas excitadas. La energía de la radiación incidente en un medio es en parte gastada en la ionización, en parte “reaparece” como parte energía cinética de iones y electrones, y en parte como energía de excitación. La repetición secundaria, de los procesos conduce a la disipación final de gran parte de la energía como calor; el resto produce cambios químicos y, en sólidos, cambios en la estructura cristalina del material (Robert & Cherry, 2001).

1.4.7.1 Efectos biológicos de la radiación.

La absorción de la radiación por la materia viva depende tanto de la calidad y cantidad del haz de radiación como de la estructura y composición del tejido absorbente. Mediante dos procesos: ionización y excitación. Aunque la excitación de átomos y moléculas, en caso de que su energía supere la de los

enlaces atómicos, puede causar cambios moleculares, el proceso de ionización resulta cualitativamente mucho más importante, puesto que necesariamente produce cambios en los átomos, al menos de forma transitoria y, en consecuencia, puede provocar alteraciones en la estructura de las moléculas a las que éstos pertenezcan (Rodríguez, 1978).

Si las moléculas afectadas están en una célula viva, la propia célula puede verse dañada, directamente si la molécula resulta crítica para la función celular, o indirectamente al provocar cambios químicos en las moléculas adyacentes, como por ejemplo mediante la formación de radicales libres. El daño celular es particularmente importante si la radiación afecta a las moléculas de ácido desoxirribonucleico, ADN o al ácido ribonucleico mensajero mRNA. Estos daños pueden llegar a impedir la supervivencia o reproducción de las células, aunque frecuentemente sean reparados por éstas. No obstante, si la reparación no es perfecta, pueden resultar células viables pero modificadas (Robert & Cherry, 2001).

Una dosis absorbida de radiación lo bastante grande para matar la célula media en división de tejido animal, 2 gray (Gy), basta para originar centenares de lesiones en sus moléculas de ADN (Ward 1988). La mayoría de estas lesiones son reparables, pero las producidas por una radiación ionizante concentrada por ejemplo, un protón o una partícula alfa, son en general menos reparables que las generadas por una radiación ionizante dispersada (por ejemplo, un rayo X o un rayo gamma) (Goodhead 1988).

“El daño del ADN que queda sin reparar o es mal reparado puede manifestarse en forma de mutaciones, cuya frecuencia parece aumentar como una función lineal de la dosis, sin umbral, en alrededor de 5-10 por locus y por Gy. El hecho de que la tasa de mutaciones parezca ser proporcional a la dosis se considera indicativo de que una sola partícula ionizante que atraviese el ADN es suficiente, en principio, para causar una mutación” (Robert & Cherry, 2001).

1.4.7.2 Efectos de radiación ionizante en las plantas

Se ha reportado que la radiación ionizante induce respuestas morfológicas anormales, que no necesariamente están relacionadas con aberraciones cromosómicas por si solas. De igual manera, algunos estudios en células vegetales indican que dosis no letales de radiación a células formadoras de callo en plena actividad de división presentan mayor resistencia a daños que células de un meristemo marginal, esta afirmación coincide con estudios reportados por Bloom (1997) quien afirma que la mitosis celular, como se conoce al ciclo de división celular, no es un factor de predisposición a daños por la radiación, se puede concluir basados en este hecho que el fenómeno de división celular entonces no es un factor determinante en cuanto a la radio sensibilidad de tejidos, todo indica que tanto la radio sensibilidad y el ritmo de crecimiento dependen netamente de las condiciones fisiológicas del organismo.

En cuanto a el tejido meristemático se hablan de dos efectos importantes en cuanto a la radio sensibilidad del mismo, la primera, basada en distintos estudios que van desde 1906 por *Tribondeu y Bergonie* quien realizó los primeros de radiosensibilidad en planta a la actualidad, los autores de investigaciones coinciden en que las células meristemáticas presentan más daño que células con una actividad celular menor y segundo se afirma que existe la posibilidad que durante el crecimiento varios sistemas interinos o componentes celulares son fácilmente modificables que en otras células (Bloom, 1997).

El patrón de desarrollo de las células meristemáticas apicales empieza con la división de células completamente uniformes en tamaño y contenido proteico, seguido por células en división con síntesis de proteínas considerable e hidratación moderada hasta llegar a elongación sin división celular con poca hidratación con un aumento notable de proteínas y nitrógeno para finalmente completar el proceso con un rápido aumento de hidratación, y carbohidratos pero una perdida completa de proteínas (Sparrow, 1989). Con tantos cambios fisiológicos durante el proceso, no es extraño encontrar distintos efectos de varias células frente a distintos niveles de ionización, en este proceso se sugiere que los efectos de dosis menores a letales se presentan como daños fisiológicos en sí, que a efectos genéticos irreversibles. Otro fenómeno que debe ser puesto a consideración es la reducción en la producción de auxinas después de la exposición a la irradiación del tejido vegetal (Gordon, 1994).

Es importante tomar en cuenta que todos los cambios visibles, o palpables son consecuencia de una secuencia de micro eventos, los fotones de la radiación ionizante son lo suficientemente poderoso para no discriminar especies moleculares con las que interactúa, dado que el citoplasma es una estructura coloidal compuesta por tres cuartos de agua, por lo que se asume que la mayor parte de energía es transferida a un sistema biológico se lo hace por medio del agua (Sparrow, 1989).

El proceso se da por la eyección de un electrón de la molécula de agua por la colisión de un fotón de alta energía, dando como resultado la formación de radical hidroxil, luego de varias colisiones el electrón es finalmente capturado para ceder un átomo de hidrógeno o radical. Los radicales sin carga (H, OH) químicamente son muy reactivos, son agentes altamente oxidantes y reductores, que rápidamente pueden romper enlaces carbono-carbono o carbono-nitrógeno (Sparrow, 1989).

En especies diploides una clara relación fue expuesta entre el promedio del volumen nuclear de células apicales meristemáticas y la toleración a la exposición crónica de radiación gamma. Entre mayor es el volumen nuclear, mayor es la sensibilidad a radiación del núcleo y por ende de toda la planta. La frecuencia de mutaciones somáticas por dosis de radiación y el tamaño nuclear están directamente relacionadas (Gunckel, 1997).

Se ha descrito algunas mutaciones somáticas en cultivos vegetales cuyo origen suponen una alteración molecular sencilla, como es el cambio de color

en los pétalos de muchas especies florales heterocigotos; en su mayoría, este tipo de mutaciones son causadas por una delección del locus dominante, en muchos aspectos este evento se asemeja a las causadas por rompimientos de cromosomas y no como mutaciones puntuales. la frecuencia de mutaciones somáticas y delecciones cromosómicas es mayor durante periodos de crecimiento lento, que en periodos de crecimiento rápido (Gunckel, 1997).

En el caso del desarrollo de estacas de flores, una respuesta interesante se ha documentado durante el desarrollo de las estacas la mayor actividad de crecimiento se da entre la segunda y cuarta semana de radiación continua, mientras otras mantuvieron un crecimiento acelerado durante tres meses, y doblaron el tamaño de las plantas normales. Lo cual indica una clara estimulación de crecimiento (Gordon, 1994).

La exposición crónica de varias planta usualmente expuestas a radiación de cobalto 60 ha producido en general la misma respuesta que aquellas expuestas a rayos x., desde luego con algunas excepciones la respuesta en común de ellas ha sido la disminución en la altura de las plantas (Sparrow, 1955).

Evidencias definitivas de los efectos de la acumulación de radiación fueron descritas en Pino y Taxo, estas especies fueron expuestas durante un periodo de 6 meses a bajas dosis de radiación, (0,05 Gy) cuya respuesta fue la expresión de efectos acumulados como severas deformidades morfológicas, una grave inhibición de crecimiento e incluso efectos letales. Existe una correlación para la dosis necesarias para generar un efecto inhibidor de

crecimiento entre una exposición aguda y una exposición crónica, entiéndase por exposición crónica la exposición continua de dosis baja, se requiere de alrededor de 13 veces de la dosis crónica, para que las dosis agudas tengan el mismo efecto (Gunckel, 1997; International Atomic Energy Agency, 2013)

1.4.8. Rayos Gamma

La radiación gamma es de naturaleza similar a la luz visible o a las ondas de radio, se diferencia de estas por su longitud de onda muy corta (10^{-11} m), por tanto, un nivel de energía más alto que la luz. Estas diferencias facilitan la penetración profunda de la radiación gamma dentro de ciertos materiales (García, *et al*, 1989).

Tienen su origen en el núcleo excitado. A menudo, tras emitir una partícula alfa o beta, el núcleo tiene todavía un exceso de energía que elimina en forma de ondas electromagnéticas de elevada frecuencia. Cuando un núcleo excitado emite esta radiación no varía ni su masa ni su número atómico, solo pierde una cantidad de energía proporcional a la frecuencia de la radiación emitida (García, *et al*, 1989).

Como todas las demás formas de radiación electromagnética, estas ondas no tienen masa ni carga, e interaccionan con la materia colisionando con las

capas electrónicas de los átomos con los que se cruzan, perdiendo lentamente su energía, por lo que pueden atravesar grandes distancias son capaces de atravesar cientos de metros en el aire, el cuerpo humano y las materias de poca densidad, así como láminas de acero de hasta 10 cm de espesor y son detenidas solamente por capas grandes de hormigón, plomo (espesores de 12 mm), o agua. Frente a su alto poder de penetración, posee menor capacidad de ionización que las partículas alfa y beta (García, *et al*, 1989).

Es producida por materiales radiactivos como el tecnecio 99 o el ^{60}Co utilizados en medicina nuclear, o en distintas investigaciones en el área de agronomía, y el cesio 137 que se usa sobre todo para la calibración de instrumentos de medición de radioactividad (Rodríguez, 1978).

1.4.7.3 Magnitudes y unidades de la radioactividad.

Las radiaciones ionizantes carecen de propiedades físicas perceptibles para los sentidos humanos, no poseen olor, sonido no son visibles ni tangibles, por lo que se piensa que no existen, o que no poseen ningún efecto biológico. Sin embargo, es posible identificar su existencia y energía por los efectos que ocasionan, por su capacidad de ionizar la materia y de ser absorbidos por la misma (IAEA, 2013).

Para caracterizar de forma cualitativa y cuantitativa la radiación y sus efectos es necesario definir un conjunto de magnitudes con sus correspondientes unidades. Los organismos encargados de esta materia cuyas recomendaciones son ampliamente aceptadas son la Oficina Internacional de Pesas y Medidas, son: la Comisión Internacional en Unidades y Medidas de la Radiación (ICRU), y la Comisión Internacional de Protección Radiológica (ICRP) (International Atomic Energy Agency, 2013).

Las principales medidas en radiobiología son la exposición, la dosis absorbida y la dosis equivalente. Las magnitudes y unidades de exposición son las encargadas de valorar la capacidad de ionización que posee un haz de radiación, sus unidades son Culombio/kilogramo (C/kg). La unidad antigua es el Roentgen definido como la exposición producida por un haz de radiación X o gamma, que es absorbida en 1 cm^3 de aire seco, en condiciones normales de presión y temperatura. Sin embargo, las unidades de radiación deben de expresarse en tasas de dosis, es decir, dosis de radiación por unidad de tiempo (Robert & Cherry, 2001).

La dosis de absorción, de cualquier tipo de radiación ionizante, pretende valorar la cantidad de radiación que es absorbida por la materia. La absorción está representada por una cesión de energía al medio, que conlleva la desaparición o pérdida de parte de su intensidad (Robert & Cherry, 2001).

La unidad antigua es el rad, extraño nombre formado por las iniciales de dosis de radiación absorbida (radiation absorbed dose). Surge por la necesidad

de crear una unidad que sirviera para cualquier tipo de radiación, y se definía como la dosis de radiación que depositaba 100 ergios de energía por cada gramo de tejido. La unidad moderna en el SI es el Gray (Gy) = $1\text{J}\cdot\text{kg}^{-1}$. La definición de esta nueva unidad es sencilla: El gray es la dosis de radiación absorbida que equivale a 100 rads. La dosis absorbida, que es la magnitud dosimétrica de más interés, resulta válida para cualquier tipo de radiación y requiere la especificación del material en el que se produce la interacción (Robert & Cherry, 2001).

La dosis letal media (DL50) es utilizada para expresar “aquella para la cual la supervivencia es del 50% de los individuos 30 días después de ser irradiados” (Rodríguez, 1978).

La radio sensibilidad del material biológico expuesto, nos permite determinar la dosis apropiada a ser utilizada, esta viene dada por la respuesta fisiológica del material, lo primero es determinar la dosis que causa el 50% de reducción del crecimiento vegetativo. La condición fisiológica de la planta, el daño físico que pueda recibir el explante por la manipulación del mismo, contribuyen a la radio sensibilidad de la especie (Predieri & Zimmerman, 2001).

Otra unidad muy considerada en la radiobiología es la dosis equivalente, esta unidad señala la magnitud de los efectos biológicos, según el tipo de radiación recibida. Esta diferencia de comportamiento ha llevado a definir una cantidad llamada factor de cualidad (Q) para cada tipo de radiación (Rodríguez, 1978).

Se ha determinado un factor de $Q = 1$ para rayos x y gamma, y para las otras radiaciones sus valores se puede conocer con detalle en la tabla1. El factor de cualidad es una medida de los efectos biológicos producidos por las distintas radiaciones, comparados con los producidos por los rayos X y gamma, para una dosis absorbida dada. La unidad en el sistema internacional es el Sievert (Sv)

Tabla 1.- Factores de cualidad de acuerdo al tipo de radiación, para el cálculo de la dosis equivalente

TIPO DE RADIACIÓN	FACTOR DE CUALIDAD, F.Q. (rems/rad)
Rayos X, y rayos γ	1
Partículas β y electrones	1
Partículas α	10-20*
Neutrones térmicos	5
Neutrones rápidos	10

*El valor depende de la energía de las partículas alfa

Fuente: Rodríguez, 1978

Finalmente, es importante conocer la actividad (A) de un radionúclido, la cual se define como el número de las transformaciones nucleares espontáneas que se suceden en el mismo en una unidad de tiempo, siendo su unidad de medida en el sistema internacional (SI) el bequerelio (Bq), que corresponde a una desintegración por segundo. La unidad en el sistema cegesimal es el Curio (Ci) que equivale a $3,7 \times 10^{10}$ Bq (Rodríguez, 1978).

1.4.8 Microscopia Electrónica

El principio de un microscopio electrónico es similar al de microscopio de luz, pero, a diferencia de este, utiliza un haz de electrones para iluminar el espécimen, esto es posible a causa de la longitud de onda de un haz de electrón, que es aproximadamente cien mil veces menor que de la longitud de onda de la luz, esta diferencia permite revelar estructuras mucho más pequeñas, como estructuras virales (Albretchsen, 1974; Hajibagheri, N. 1999).

Otra importante diferencia entre el microscopio óptico y el electrónico es el uso de lentes electromagnéticos ajustables, a diferencia de los lentes de vidrio ocupados para el microscopio óptico. La imagen dada por ME es visualizada ya sea directamente por una pantalla fluorescente, o indirectamente por un monitor, o fotografías tomadas con una cámara interna. En el campo biológico nos brinda una herramienta útil para identificar estructuras y componentes celulares, en muestras vegetales, por ejemplo, se pueden observar desde una fina capa de savia de una planta, hasta secciones ultra finas de tejido, cubierto en resinas de epoxi o material similar (Albretchsen, 1974).

Existen dos tipos de microscopios electrónicos, el microscopio electrónico de transmisión, TEM, por sus siglas en inglés (Transmission Electron Microscope), el microscopio electrónico de barrido, SEM, por sus siglas en inglés (Scanning Electron Microscope). La diferencia radica en que mientras que en el microscopio electrónico de transmisión la luz pasa a través del

espécimen y delinea su forma, en el de barrido, examina la superficie. La resolución de la imagen de un SEM es más pobre que de un TEM, sin embargo dado que la imagen generada por SEM se basa en un proceso en la superficie a diferencia del de transmisión, permite hacer buenas representaciones en tres dimensiones de las formas (Albretchsen, 1974).

Los protocolos utilizados para estudios vegetales en microscopía electrónica pueden variar notablemente en tiempo y recursos, mientras que la preparación, por ejemplo, de sabia puede ser realizada en 2 minutos, la preparación de secciones ultra-finos toma varios días, la muestra debe ser estabilizada, o llevada a un estado sólido donde se preserve la estructura de la muestra viva, con una forma que permita el paso de electrones para su adecuada observación, para este fin se han propuesto distintas fases para la preparación de la muestra conocidas como fase de fijación, deshidratación, infiltración y embebimiento. Al finalizar estas fases las secciones deben tener un grosor menor a 100 nm. Es importante señalar que sin importar el tipo de espécimen, las estructuras orgánicas, solo pueden ser vistas por un microscopio electrónico de transmisión (Albretchsen, 1974).

La fase conocida como fijación y pos fijación tiene como fin la estabilización del material biológico para detener la actividad celular sin alterar la estructura interna y externa de la muestra. Seguida de una fase de deshidratación cuyo objetivo es la sustitución graduada del agua presente en la muestra por un solvente compatible con la resina, como alcohol o acetona. Finalmente para el

embebimiento se necesita la infusión del material biológico con un soporte duro, que luego nos permita hacer los cortes ultra finos para observar su estructura (Hajibagheri, N. 1999)

El material para ser procesado puede ser, suspensiones celulares, partículas, cultivos, o tejido derivados de órganos. Para el microscopio electrónico las ultra estructuras deben ser conservadas lo más parecido a su estado *in vivo* posibles. Esto se puede obtener ya sea por una fijación química como por una criofijación; los aldehídos que forman enlaces con las proteínas son los óptimos para la fijación química, el glutaraldehído, es un dialdehído que preserva bien la ultra estructura, pero penetra más lento que los monoaldehídos como es el caso del paraformaldehído. Cuando la preservación es de pedazos de materia, el glutaraldehído es recomendado, sin embargo es recomendable usar una mezcla de los dos aldehídos para la fijación de tejidos más grandes (Hajibagheri, N. 1999).

La fijación secundaria o pos-fijación es obtenida con tetra óxido de osmio que reacciona con lípidos no saturados, que brinda adicionalmente una tinción a los fosfolípidos de a las membranas celulares. Este proceso es seguido de la deshidratación que se logra con una serie ascendente de diluciones de alcohol, atravesando diluciones con solventes que permita la fase de infiltración de la resina (Kuhó, 200

Capítulo 2: METODOLOGÍA

2.1 Selección del material vegetal

Como material vegetal se utilizó plántulas *in vitro*, de Violeta Africana obtenidas de las investigaciones del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, de la carrera de Ingeniería en Biotecnología, de la Escuela Politécnica de las Fuerzas Armadas.

Fueron seleccionadas plántulas vigorosas de hasta 1 cm de alto, se micropropagó los ejemplares hasta asegurar homogeneidad en los individuos y la asepsia del cultivo (Fig.2.1.1) El medio de cultivo que se utilizó para la multiplicación *in vitro* de violetas fue un medio sólido desarrollado por Murashige y Skoog (1962), suplementado con 0,2 mg/l de kinetina; 2 mg/l de AIA y 16 mg/ de tiamina, esterilizado en autoclave a 121 °C y 15 PSI por 30 minutos (Pierik, 1990). Los frascos permanecieron a una temperatura de 25 ± 1 °C y entre 50 y 60% de humedad relativa con un control total de asepsia.



Figura 4. Explantes de Violeta Africana, material vegetal preparado para ser irradiado

2.2 Cálculo de la tasa de dosis del irradiador

Para conocer la tasa de dosis al momento de la irradiación, se hizo el cálculo basado en la última calibración del equipo, el 22 de Octubre de 2007 en el Informe Final de la Misión; "Evaluación de las condiciones del Irradiador J.L. Shepherd and Associates Inc. Modelo 109-68 No. 3003 de la CEEA y su calibración", donde la tasa de dosis para esa fecha fue de 14.42 Gy/min. Para el cálculo se utilizó la siguiente expresión:

$$D_{1,t} = D_{0,t} * e^{-\frac{\ln(2)}{T_{1/2}} * t}$$

Donde, $D_{1,t}$ = tasa de dosis al momento de la irradiación, $D_{0,t}$ = tasa de dosis inicial, para este caso en específico se utilizará: 14.42 Gy/min, $T_{1/2}$ = tiempo de vida media, (^{60}Co : 5.271 años) y t = tiempo transcurrido desde $D_{0,t}$ hasta $D_{1,t}$

(Rodriguez, 1978)

2.3 Dosis letal media

Los explantes de Violeta Africana 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 (Fig. 5), con su respectivo control (0 Gy).



Figura 5 : Irradiador de ^{60}Co J.L. Shepherd modelo 109

Inmediatamente después del proceso de irradiación, los explantes fueron subcultivados en un nuevo medio de micropropagación detallado con anterioridad (Pabon, 2011). Se sembró un explante por frasco, que represento la unidad experimental durante el ensayo

Se evaluaron, 220 explantes de violeta africana (20 por cada dosis) se midió el crecimiento longitudinal, el número de brotes de cada explante, 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.

Para controlar el crecimiento longitudinal del explante, con ayuda de un calibrador se midió el crecimiento vertical semanalmente durante 28 días, tal como se indica en la figura 6



Figura 6.- Técnica utilizada para medir el crecimiento longitudinal de los explantes

Para el conteo de hojas, se tomó en cuenta solo aquellas que conformen el explante original, las nuevas hojas generadas pertenecientes a los brotes adventicios no se tomaron en cuenta (Fig. 7)

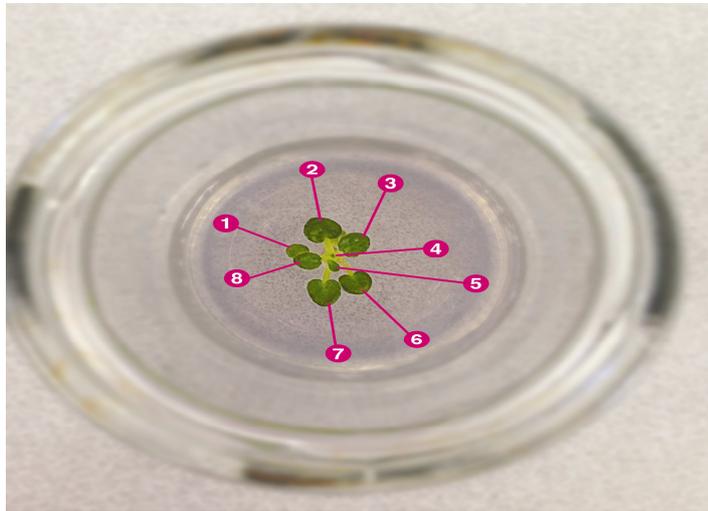


Figura 7.- Técnica utilizada para medir el crecimiento longitudinal de los explantes
La taza de brotes se midió semanalmente, contando las porciones vegetales lo suficientemente robustas para regenerar una nueva planta (Fig.8)

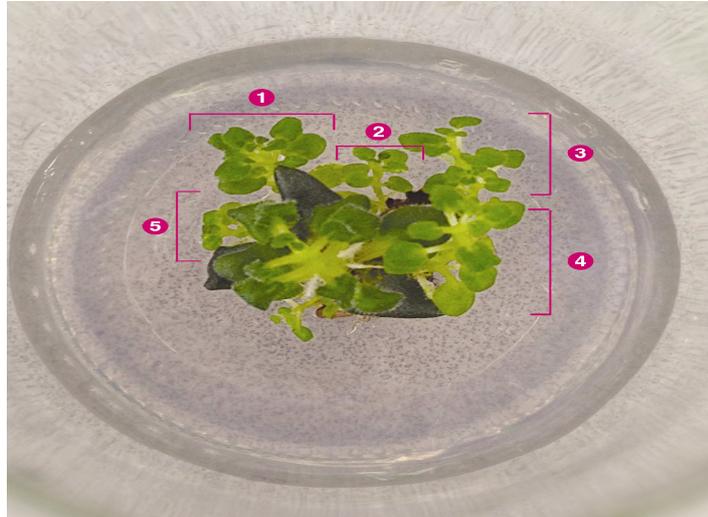


Figura 8.- Porciones robustas, consideradas como nuevos brotes

Al cabo de 35 días se contabilizó el número de explantes sobrevivientes para cada dosis, con el fin de establecer una curva de sobrevivencia (DL50) y

extrapolar la dosis a la que el 50% de los individuos no sobreviven. Los datos fueron linealizados mediante una regresión lineal.

Simultáneamente fueron cuantificadas bajo un diseño estadístico completamente aleatorizado las variables: *número de hojas*, *número de brotes* y *crecimiento longitudinal*. Para determinar el mejor tratamiento, que asegure, la viabilidad, el crecimiento y la reproductividad de los explantes. Los datos obtenidos fueron sujetos a un análisis estadístico no paramétrico, para lo cual se utilizó la prueba estadística de Krustal Wallis con un nivel de probabilidad $p=0.05$ evaluando cada una de las variables de respuesta por separado.

2.4 Evaluación de efectos de dosis de radiación no letales en el ciclo de reproducción *in vitro* de *Violeta Africana*

Una vez establecida la curva de dosis letal, se irradió 20 explantes, de aproximadamente 1 cm de alto, con cada dosis que permitió una supervivencia entre 70 y 100% incluyendo un blanco (0 Gy) (ver resultados, tabla 2).

2.4.1. Micro propagación

Los explantes irradiados fueron sembrados en medio para multiplicación de violeta, detallado al inicio de este apartado. Los brotes generados a partir de las plántulas irradiadas fueron separados y subcultivadas en el mismo medio de multiplicación hasta alcanzar una población de 50 nuevos individuos (M1V1) para cada dosis de radiación.

2.4.2 Enraizamiento

Luego de 60 días de haber permanecido los explantes del subcultivo M1V1 en medio de multiplicación, se transfirió los explantes a un medio para enraizar, para esta fase se utilizó un medio sólido desarrollado por Murashige y Skoog (1962), 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; esterilizado en autoclave a 121 °C y 15 PSI por 30 minutos (*Pierik, 1990*). Se mantuvo los frascos a una temperatura de 25 ± 1 °C y entre 50 y 60% de humedad relativa.

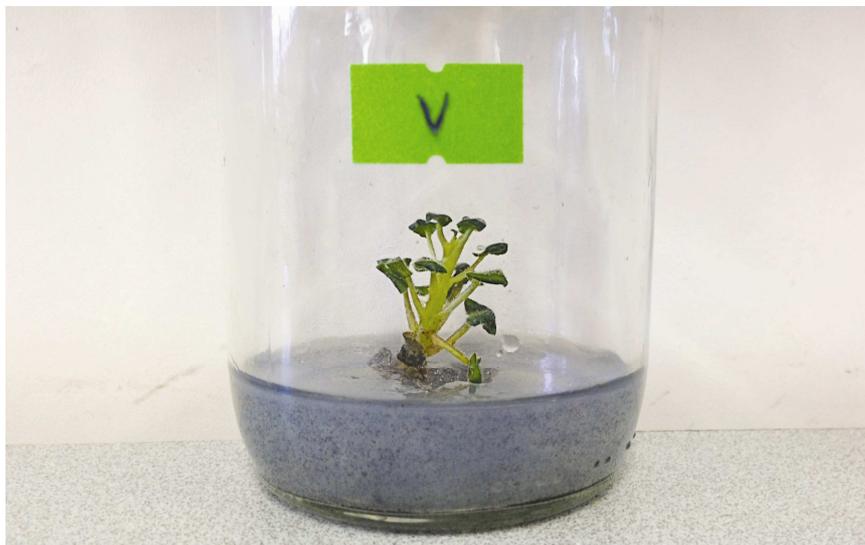


Figura 9.- Plántulas irradiados de *Saintpaulia ionatha*, en medio MS enriquecido con 0,1 0,1 mg/l de Tiamina, 0,5 mg/ml de ácido nicotínico; 0,5 mg/l de piridoxina; 0,2 mg/l de BAP; 0,3 mg/l de AIB; 100 mg/l de mioinositol; 300 mg/l de carbón activado y 25 g/l de sacarosa;

En esta fase de cultivo *in vitro* se llevó un control continuo de los subcultivos, y se aisló quimeras, que fueron llevadas a un nuevo medio para observar su comportamiento *in vitro* y en campo y describir su morfología celular mediante microscopia electrónica.

2.4.3. Aclimatación

Al cabo de 60 días más las plántulas *in vitro* fueron trasplantadas a un sustrato de suelo compuesto por: tierra negra, cascajo y turba en una

proporción 2:1:1, respectivamente, la mixtura se autoclavó a 121 °C y 15 PSI por 30 minutos.



Figura 10.- Preparación de sustrato para aclimatación de *Saintpaulia ionatha*. A) Tamizado de Tierra negra B) Tamizado de Turba C) tamizado de cascajo D) mixtura final del sustrato requerido para la aclimatación.

Se aclimato las plantas en condiciones controladas, con una temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; una humedad relativa de 70-80%. La humedad relativa fue alcanzada ya que se envolvió durante 31 días los explantes en una bolsa plástica, (fig. 11) y fueron regados 2 veces por semana (Norhayati D., *et al* 2008).



Figura 11.- A) Primera semana en la aclimatación de *Saintpaulia ionatha*, uso de frasco de vidrio invertido B) día 8-28 en la aclimatación de Violeta Africana, uso de bolsa plástica

Durante 60 días, se valoró las variables *porcentaje de supervivencia*, *tamaño de la roseta*, y *número de hojas*, de las plántulas aclimatadas, se realizaron cuatro tratamientos incluyendo un blanco.

Para medir el tamaño de la roseta, se utilizó el programa informático INFINITY ANALYZE, el crecimiento de la planta fue foto documentado a los 0, 15, 30, 45 y 60 días.

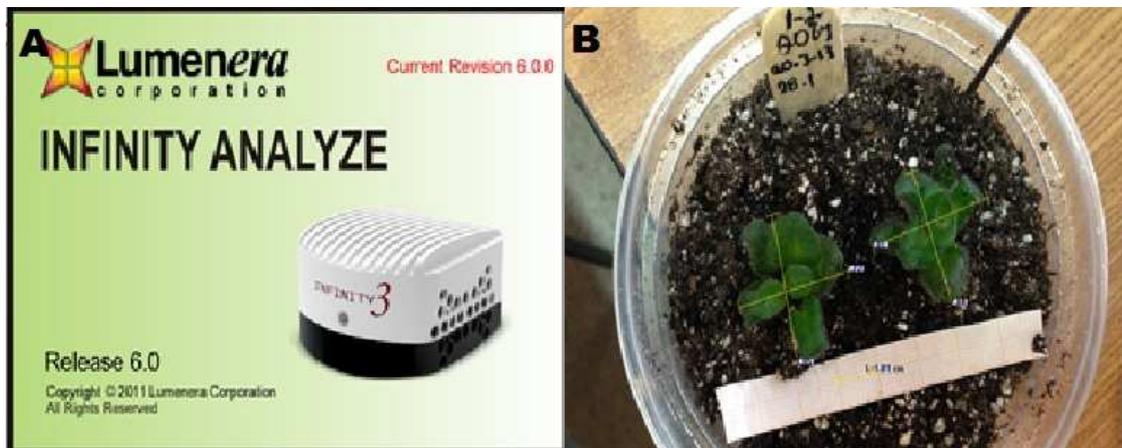


Figura 12.- Uso de Software para mediciones digitales de diámetro A) Programa Infinity Analyze, usado durante el análisis B) Medición de fotografías de explantes de Violeta africana con el Paquete Infinity Analyze.

El conteo del número de hojas se hizo de manera manual, recopilando datos cada 15 días durante 2 meses.



Figura 13- Número de hojas durante la fase de aclimatación de *Saintpaulia ionantha*

La supervivencia de las plántulas fue valorada quincenalmente, aquellas cuyo sistema vascular están dañadas son consideradas como no viables.



Figura 14.- A) *Saintpaulia ionantha* con el sistema vascular no viable, Necrosis avanzada del tejido vegetal a los 21 días B) Violeta Africana vigorosa a los 21 días de aclimatación

Con el fin de conocer las diferencias significativas entre las medias de cada tratamiento los resultados, se sometieron a un análisis no paramétrico Kruskal Wallis, con un nivel de probabilidad de 0,05. La unidad experimental fue un envase plástico de 0.25 litros, sembrado con 2 explantes

2.5. Cortes ultra finos para observar la estructura vegetal con microscopio electrónico de transmisión.

El protocolo utilizado para observar cortes ultra finos de una sección de hoja de *Saintpaulia ionatha*, comprendió cuatro fases: Acondicionamiento químico, infiltración y polimerización y cortes finos.

En la primera fase, de acondicionamiento químico, se realizó cortes frescos del material vegetal, en un tamaño inferior a 1 cm por lado, y se sumergió en una solución de glutaraldehído al 2% durante 16 horas, seguida de 2 lavados con buffer fosfato acompañada de una etapa de post fijación donde se utilizó tetra óxido de osmio (TOO), al 1% durante 60 min, seguida de dos lavados con agua destilada (Del Hierro 2013).

Para culminar la primera fase se realizó la deshidratación del material vegetal con diluciones seriadas de etanol, para lo cual se sumergió las muestras en una solución de etanol al 30, 50,70, 80, 90 y 99,9% durante 1 hora, la última concentración se hizo por duplicado con un tiempo de 16 horas.

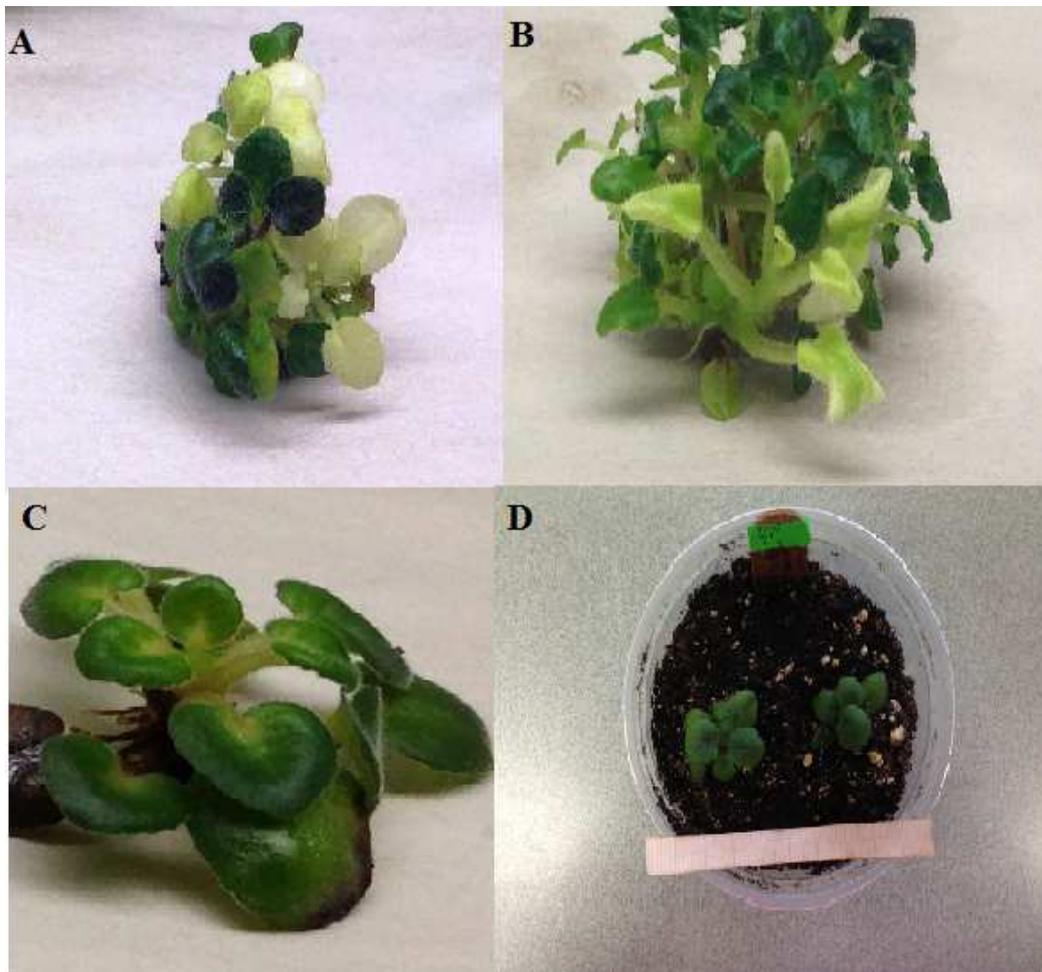


Figura 15- Muestras vegetales utilizadas para realizar cortes ultrafinos. A) Violeta Africana *in vitro* irradiada con 30 Gy B) Violeta Africana *in vitro* irradiada con 30 Gy C) Violeta Africana *in vitro* sin haber sido expuestas a radiaciones. D) Violeta irradiada con 20 Gy

Para la segunda fase, de infiltración y polimerización, las muestras deshidratadas fueron suspendidas en una solución 1:1 de acetonitrilo: etanol, durante 1 hora en agitación constante, a continuación se sumergió la muestra en acetonitrilo al 100%, 1 hora en agitación, para luego ser llevada a una

solución de acetonitrilo: resina en una proporción 2:1, durante toda la noche en rotación.

Pasadas 16 horas aproximadamente, se cambió la muestra a una solución de acetonitrilo: resina en una proporción de 1:1 durante 8 horas en rotación, seguida de una proporción 2:1 resina: acetonitrilo durante 16 horas más. Para finalizar esta fase se embebió las muestras en resina al 100% durante 8 horas, seguida de una última transferencia a resina pura para ser llevada a la incubadora durante 72 horas para la polimerización.



Figura 16.- Resina epoxi con muestra vegetal infiltrada

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 (Kuhó, 2007).

Finalmente la fase de cortes finos, requirió de la preparación previa de algunos materiales, entre ellos la elaboración de cuchillas de vidrio para los cortes. El equipo utilizado para este proceso, fue un cortador para vidrio de microscopía RMC, cuyo producto es cuchillas triangulares de vidrio (Fig. 2.5.3). Paralelamente se preparó los soportes para las muestras, mesh, bañados en oro (Fig. 2.5.3.)

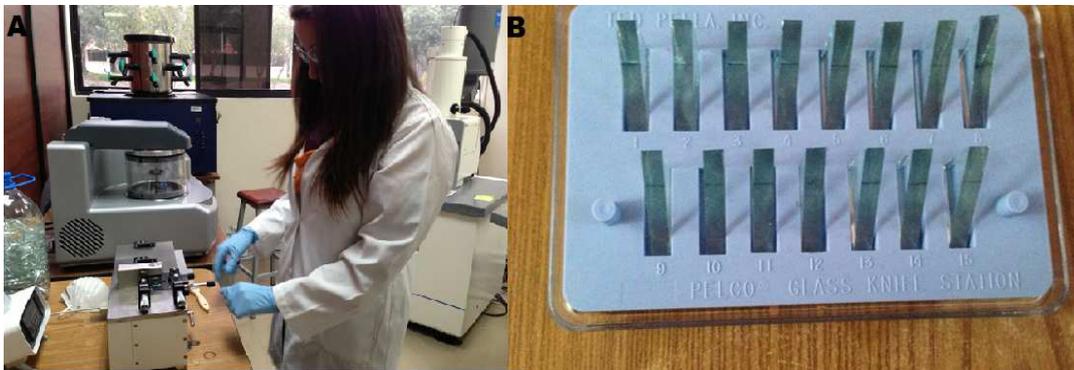


Figura 17: A) Proceso de elaboración de cuchillas de vidrio B) cuchillas de vidrio para cortes de secciones finas



Figura 18: Proceso de revestimiento de soportes de cobre con oro.

Para realizar los cortes finos con la ayuda de un micrótopo fue necesario el tallado de la resina en forma de un trapecio, con la ayuda de un estereo microscopio se tallo la cara frontal de la resina procurando dejar una superficie lisa, con la muestra en el centro del paralelogramo.

Los cortes fueron realizados por un ultramicrotomo, los primeros cortes semi finos se lograron programando la consola electrónica del ultra micrótopo de la siguiente manera: la ventana superior e inferior de corte, la velocidad de corte de 1.5 mm/s y el espesor de 0.5 a 1 μ . Las secciones ultra finas fueron obtenidas después de localizar en los cortes semifinos el área de interés para el seccionamiento. Posteriormente, se programó en la consola electrónica del ultra micrótopo: la ventana superior e inferior de corte, la velocidad de corte de 1.0 mm/s y el espesor de 50 a 100 nm.

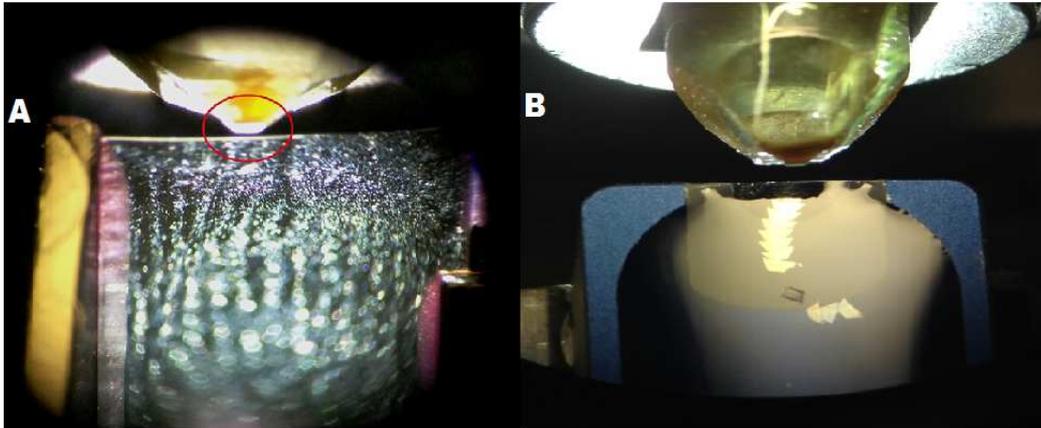


Figura 19.- Proceso para realizar cortes ultrafinos a) Tallado de la punta de la resina en forma de un trapecio, visto a través de microtomo b) cortes ultra finos con espesor de 70 nm vistos a través de microtomo, el color dorado de los cortes indica

Luego de obtener los cortes, fueron fijados a los soportes o mesh, para que las estructuras celulares puedan ser observadas se realizó una tinción doble con acetato de uranillo al 1% y citrato de plomo al 2%. Las muestras previamente teñidas, fueron introducidas en la porta muestras del TEM para buscar y captar imágenes de cortes ultra finos que muestren la estructura interna de las hojas.

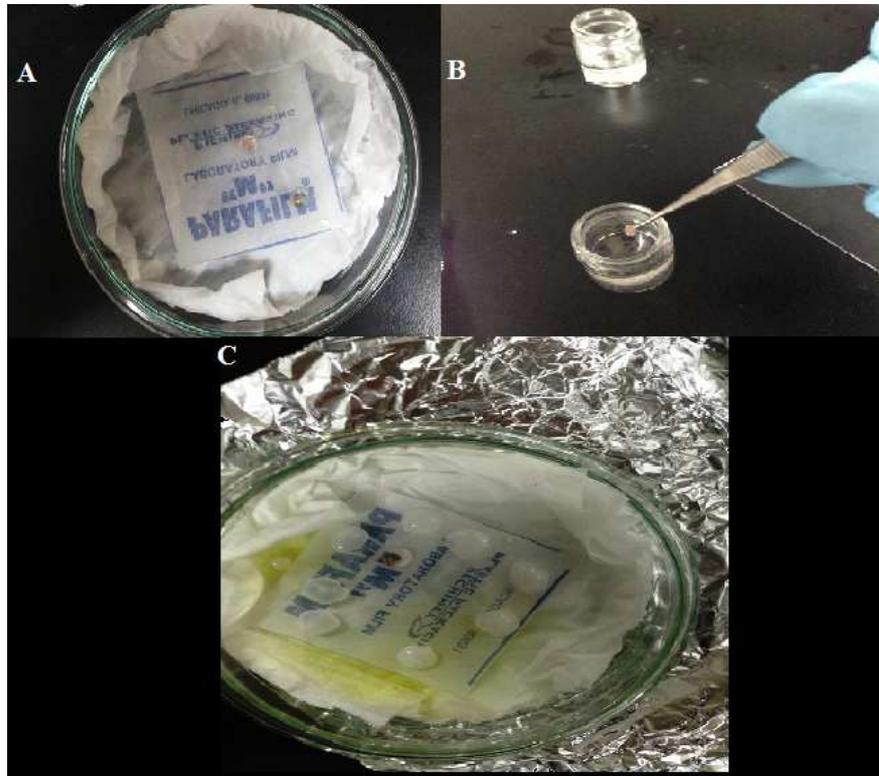


Figura 20.- Tinción doble negativa. a) Cortes ultra finos sostenidos en un mesh sumergidos en acetato de uranillo. b) Lavados con agua destilada, para la remoción de exceso de los químicos d) Tinción con citrato de plomo

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Determinación de la dosis letal media sobre una población de *Saintpaulia ionatha in vitro*

El valor de la DL_{50} fue calculado sobre la base de la reducción del 50% de la regeneración de las plántulas evaluado 5 semanas después de recibir las dosis de radiación; el mayor índice de mortalidad se presentó en la dosis de 90 Gy, con un porcentaje de supervivencia de 0%. La tabla 2 muestra los porcentajes de mortalidad en cada dosis de radiación, situando los valores de DL_{50} en las dosis de 53 Gy, al ajustar los datos a una regresión lineal.

Tabla 2.- Porcentajes de supervivencia de explantes *in vitro* de *Saintpaulia ionatha* después de 5 semanas de evaluación.

Dosis	Plántulas irradiadas	Plántulas sobrevivientes	% supervivencia
Blanco	20	20	100
10 GY	20	20	100
20 GY	20	18	90
30 GY	20	17	85
40 GY	20	13	65
50 GY	20	12	60
60 GY	20	9	45
70 GY	20	6	30
80 GY	20	1	5
90 GY	20	0	0
100GY	20	0	0

En la presente investigación se evidenció que el crecimiento de las plantas declinó a medida que aumentaban las dosis de radiación. En la gráfica 3.1 se observa que a partir de 40 Gy se produce una drástica disminución en el crecimiento de los explantes; 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. Los explantes no irradiados (blanco), presentaron un 100% de regeneración con plantas de aspecto normal.

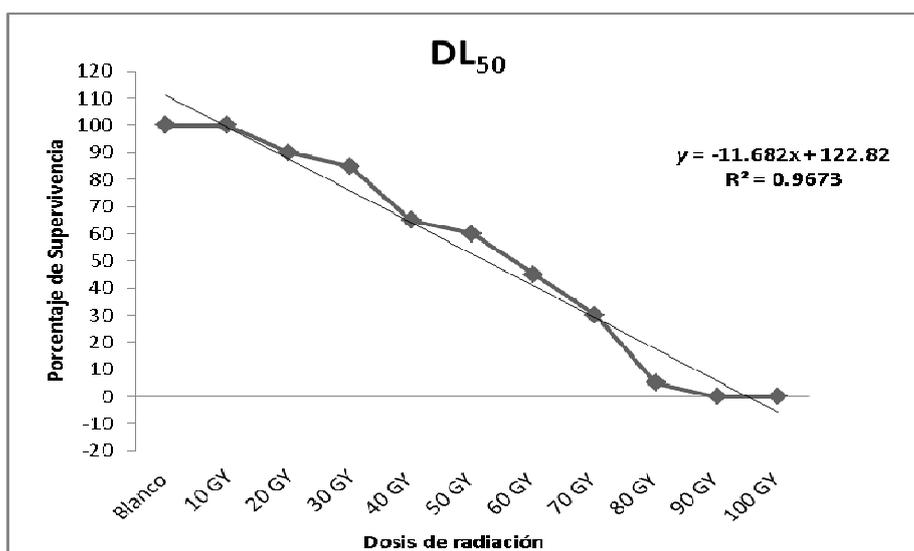


Grafico 1.- Curva de radiosensibilidad de cultivo *in vitro* de *Saintpaulia ionatha* expuesta a radiación gamma Co60

3.2 Efectos de la radiación sobre el coeficiente de multiplicación *in vitro*

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

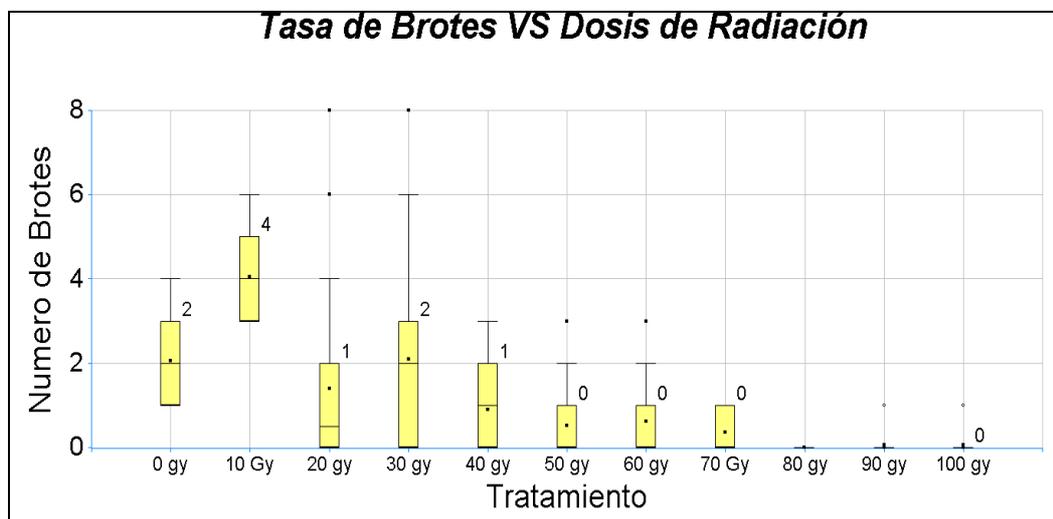


Gráfico 1.- Diagrama de cajas representando la distribución de datos para el índice de brotes en cada dosis de irradiación aplicada sobre el cultivo *in vitro* de *Saintpaulia ionatha* evaluadas 5 semanas después de la irradiación.

Los datos obtenidos fueron distribuidos para la *tasa de brotes* 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. Los puntos localizados fuera de la simetría de la distribución señalan

la presencia comportamientos atípicos, es decir que dieron como resultado valores muy alejados al resto de datos, lo que sugiere un comportamiento único de ciertos individuos de población, en este caso frente a los efectos de la radiación. En el gráfico 3.2 se presentan las medianas para el coeficiente de multiplicación, y la influencia de la dosis de radiación sobre el mismo. Se observó una disminución de los brotes a medida que aumenta la dosis de radiación. La mayor tasa de brotes se registró en la dosis de 10 Gy con un coeficiente de 4 brotes por explante. Mientras que las dosis de 0 y 30 Gy presentaron una mediana de 2 brotes por explantes y la dosis de 20 y 40 Gy registraron una tasa de 1 brote por explante. A partir de estas dosis se puede notar que la producción de brotes es nula.

En la tabla 3 se enmarcan los resultados de un análisis estadístico no paramétrico del coeficiente de multiplicación o número de brotes utilizando la prueba Kruskal Wallis para conocer si los tratamientos tienen una diferencia significativa entre sus medias, con un nivel de probabilidad de $p=0.05$. Los resultados del análisis dividieron a los tratamientos en 5 grupos estadísticos donde sus medias no tienen una diferencia estadística significativa. El tratamiento de 0 y 10 Gy pertenecen al mismo grupo estadístico presentando un índice de producción de brotes homogénea, simultáneamente 0 Gy pertenece al mismo grupo estadístico que 30Gy mientras que 30, 20, y 40 Gy conforman un distinto grupo estadístico, en cuanto a las dosis de 20, 40, 50, 60, 70 Gy se

ubican dentro del cuarto grupo estadístico dejando a las dosis de 50, 60 70, 80, 90 y 100 Gy en el quinto grupo estadístico.

Tabla 3- Prueba de contrastes Kruskal Wallis para la variable *Número de Brotes* en las distintas dosis de radiación evaluada a las 5 semanas después de la irradiación

Prueba de Kruskal Wallis

semana	Variable	tratamiento	Medias	D.E.	Medianas	H	p
5	Numero de Brotes	0 gy	2,05	1,00	2,00	101,16	<0,0001
5	Numero de Brotes	10 Gy	4,05	1,19	4,00		
5	Numero de Brotes	100 gy	0,05	0,22	0,00		
5	Numero de Brotes	20 gy	1,40	2,21	0,50		
5	Numero de Brotes	30 gy	2,10	2,12	2,00		
5	Numero de Brotes	40 gy	0,90	0,97	1,00		
5	Numero de Brotes	50 gy	0,52	0,87	0,00		
5	Numero de Brotes	60 gy	0,63	0,89	0,00		
5	Numero de Brotes	70 Gy	0,35	0,49	0,00		
5	Numero de Brotes	80 gy	0,00	0,00	0,00		
5	Numero de Brotes	90 gy	0,05	0,22	0,00		

Trat.	Ranks
80 gy	60,00 A
100 gy	63,88 A
90 gy	63,88 A
70 Gy	87,13 A B
50 gy	91,24 A B
60 gy	99,09 A B
40 gy	112,88 B C
20 gy	114,43 B C
30 gy	143,86 C D
0 gy	165,28 D E
10 Gy	199,98 E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

3.3 Efecto de la radiación sobre el crecimiento longitudinal *in vitro*

Se valoró el crecimiento longitudinal 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.

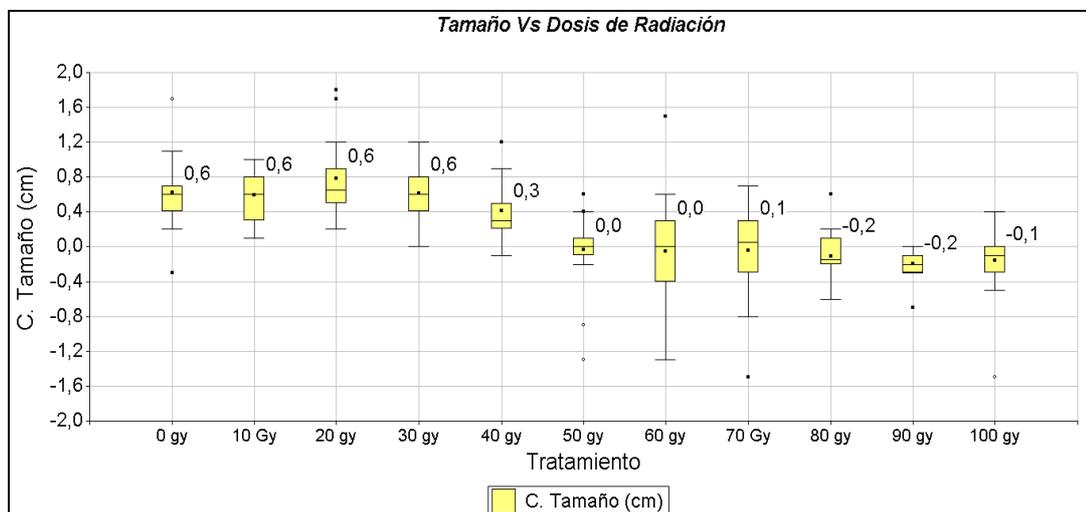


Gráfico 2.- Diagrama de cajas para el crecimiento longitudinal de explantes *in vitro* de *Saintpaulia ionatha* para varias dosis de radiación gamma ^{60}Co evaluadas 5 semanas después de la irradiación

Estos datos fueron analizados con la prueba estadística Kruskal Wallis para identificar las diferencias estadísticas que puedan existir entre los distintos tratamientos. En la tabla 4 se indican los resultados del análisis estadístico con un nivel de probabilidad $p=0.05$.

Tabla 4 - Prueba de contrastes Kruskal Wallis para la variable *Crecimiento Apical* en las distintas dosis de radiación

Prueba de Kruskal Wallis

semana	Variable	tratamiento	Medias	D.E.	Medianas	H	p
5	C. Tamaño (cm)	0 gy	0,62	0,41	0,60	124,43	<0,0001
5	C. Tamaño (cm)	10 Gy	0,59	0,27	0,60		
5	C. Tamaño (cm)	100 gy	-0,16	0,40	-0,10		
5	C. Tamaño (cm)	20 gy	0,79	0,41	0,65		
5	C. Tamaño (cm)	30 gy	0,61	0,31	0,60		
5	C. Tamaño (cm)	40 gy	0,42	0,33	0,30		
5	C. Tamaño (cm)	50 gy	-0,03	0,41	0,00		
5	C. Tamaño (cm)	60 gy	-0,05	0,65	0,00		
5	C. Tamaño (cm)	70 Gy	-0,05	0,53	0,05		
5	C. Tamaño (cm)	80 gy	-0,11	0,28	-0,15		
5	C. Tamaño (cm)	90 gy	-0,20	0,16	-0,20		

Trat.	Ranks
90 gy	44,70 A
100 gy	59,25 A
80 gy	61,83 A
60 gy	76,75 A
50 gy	80,05 A
70 Gy	80,58 A
40 gy	134,85 B
0 gy	159,23 B C
10 Gy	160,90 B C
30 gy	162,45 B C
20 gy	176,20 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

El análisis congregó los tratamientos en 3 grupos estadísticos con comportamientos homogéneos. La dosis de 0, 10, 20 y 30 Gy no presentaron diferencias significativas durante su crecimiento, siendo estos los de mayor crecimiento apical. Simultáneamente las dosis de 0, 10 y 30 Gy pertenecen al

mismo grupo estadístico conjuntamente con 40 Gy. Mientras que 50, 60, 70, 80, 90 y 100 Gy conforman el tercer grupo estadístico sin diferencias significativas entre sus medias.

3.4 Efecto de la radiación sobre el número de hojas *in vitro*

El número de hojas se evaluó con el fin de conocer los efectos de la radiación durante el desarrollo del crecimiento *in vitro* de plántulas de violeta africana. Para esta variable, el gráfico 3.4 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. De igual manera se reconocen comportamientos atípicos para la dosis de 20, 30, 50, 60 y 80 Gy.

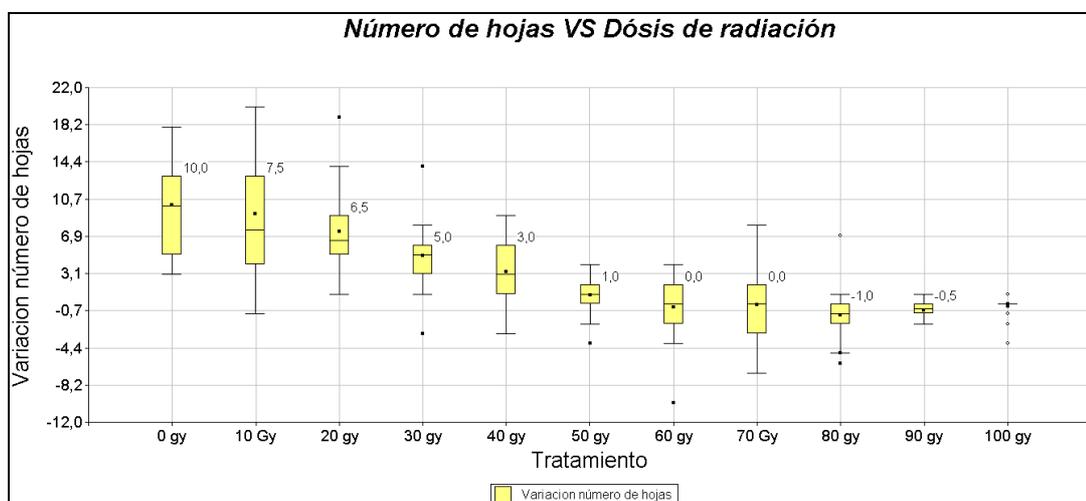


Gráfico 3.- Diagrama de cajas para el Número de hojas de *explantes in vitro* de *Saintpaulia ionatha* para varias dosis de radiación gamma ^{60}Co

Con el fin de identificar las diferencias entre cada tratamiento, los datos obtenidos fueron comparados con la prueba de contrastes no paramétrica de Kruskal Wallis, cuyo resultado dividió a los tratamientos en 6 grupos cuyas medias no son significativamente diferentes (tabla 5).

En el grupo A, se encuentran los tratamientos de 60 a 100 Gy, en el grupo B se encuentran los tratamientos de 50, 60, 70, 90 y 100 Gy. Mientras que el grupo C reúne a las dosis de 50 y 40 Gy, el grupo D está compuesto por las dosis de 40 y 30 Gy, simultáneamente 30 Gy pertenece al mismo grupo con 20 y 10 Gy conformando el grupo D. Finalmente el grupo F está compuesto por las dosis de 20, 10 y 0 Gy.

Tabla 5- Prueba de contrastes Kruskal Wallis para el variable *número de hojas* en las distintas dosis de radiación *in vitro* evaluadas 5 semanas después de la irradiación

Prueba de Kruskal Wallis

semana	Variable	tratamiento	Medias	D.E.	Medianas	H	p
5	Variacion número de hojas	0 gy	10,05	4,50	10,00	134,06	<0,0001
5	Variacion número de hojas	10 Gy	9,20	5,99	7,50		
5	Variacion número de hojas	100 gy	-0,25	1,07	0,00		
5	Variacion número de hojas	20 gy	7,40	4,44	6,50		
5	Variacion número de hojas	30 gy	4,90	3,28	5,00		
5	Variacion número de hojas	40 gy	3,30	2,98	3,00		
5	Variacion número de hojas	50 gy	0,90	1,89	1,00		
5	Variacion número de hojas	60 gy	-0,31	3,53	0,00		
5	Variacion número de hojas	70 Gy	-0,10	3,81	0,00		
5	Variacion número de hojas	80 gy	-1,10	2,61	-1,00		
5	Variacion número de hojas	90 gy	-0,60	0,82	-0,50		

Trat.	Ranks
80 gy	47,30 A
90 gy	53,03 A B
100 gy	65,20 A B
70 Gy	71,18 A B
60 gy	72,72 A B
50 gy	90,07 B C
40 gy	125,93 C D
30 gy	145,76 D E
20 gy	167,78 E F
10 Gy	172,28 E F
0 gy	185,08 F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

3.5 Aclimatación

Para conocer cómo afecta la irradiación de los explantes *in vitro* a su adaptación en campo se evaluaron durante 45 días las variables *supervivencia*, *número de hojas*, y *tamaño de la roseta*.

Las dosis que se escogieron para esta fase de la investigación son aquellas que presentaron un porcentaje de supervivencia mayor al 70% (tabla 2). Estas dosis son 0, 10 20 y 30 Gy.

Durante el ensayo, se tomó en cuenta el índice de mortalidad de los explantes aclimatados. 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 grafico 3.5 representa los porcentajes de supervivencia para cada dosis.

Tabla 6.- Índices de supervivencia en la fase de aclimatación de explantes irradiados *in vitro* con dosis de 0, 10, 20 y 30 Gy.

Tratamiento	Explantes aclimatados	Explantes viables	Explantes no viables	Índice de supervivencia
0 Gy	50	44	6	0.88
10 Gy	50	42	8	0.84
20 Gy	50	40	10	0.80
30 Gy	50	32	18	0.64

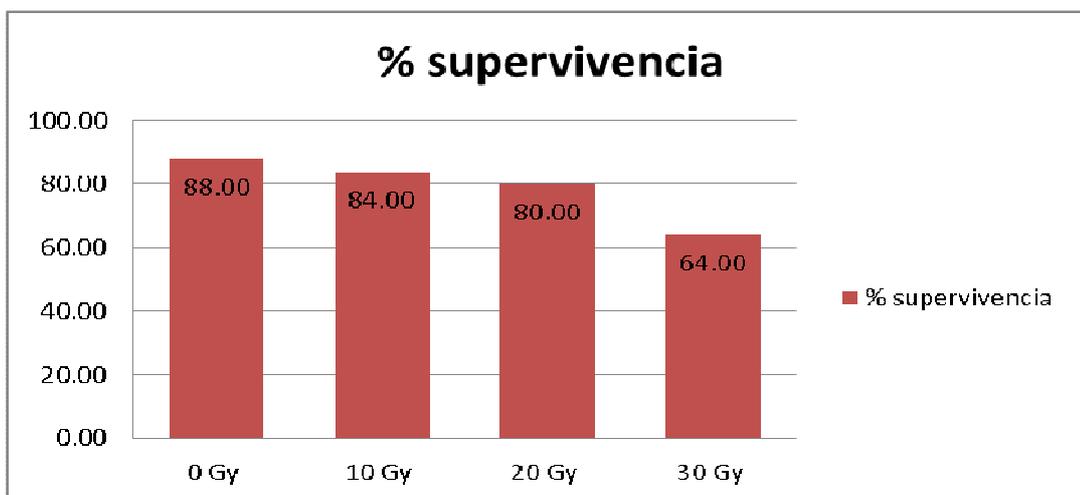


Gráfico 4.- Porcentajes de supervivencia en la fase de aclimatación de plantulas de *Saintpaulia ionatha* irradiadas *in vitro*.

3.6 Efectos de la radiación sobre el número de hojas en fase de aclimatación

El número de hojas, alcanzó su índice máximo a la dosis de 10 Gy. La grafica 6 muestra el comportamiento de los explantes irradiados para cada dosis de radiación documentado cada 15 días. Se puede observar como a partir de la semana 0 de aclimatación la dosis de 10 Gy presenta medias mayores para el número de hojas, registrando de igual manera máximos en su distribución más altos que para el resto de tratamientos de radiación. Las dosis de 0, 20 y 30 Gy, presentan un comportamiento bastante uniforme para esta variable. De igual manera se observó como a medida que las dosis aumentan el rango de distribución de los datos aumenta registrando valores negativos.

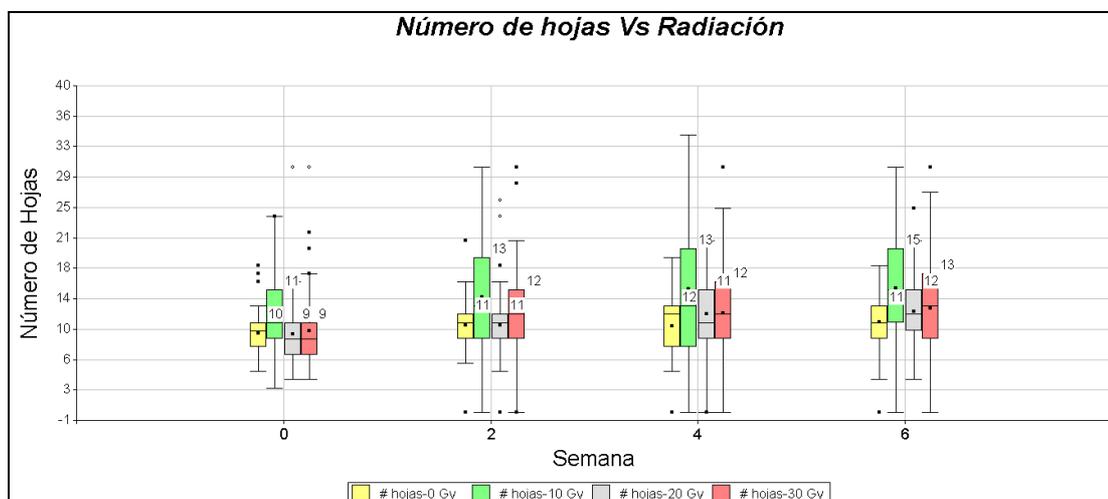


Gráfico 5.- Diagrama de cajas representando la distribución de los datos obtenidos cada quince días para el número de hojas de los explantes aclimatados previamente irradiados *in vitro* con las dosis de 0, 10, 20 y 30 Gy evaluado cada 15 días

En la tabla 7 se indican los resultados de los datos llevados a un análisis estadístico comparativo no paramétrico, en donde divide a los tratamientos en 2 grupos estadísticos, sin diferencias significativas entre sus medias. En el grupo B se encuentra la dosis de 10 Gy, indicando que su comportamiento tiene una diferencia significativa con el resto de tratamientos que se encuentran agrupados en el grupo estadístico A. La media para estos tratamientos oscila entre 10 a 13 hojas por explante

Tabla 7.- Prueba de contrastes Kruskal Wallis para el variable *número de hojas* de los explantes aclimatados previamente irradiados *in vitro* con las dosis de 0, 10, 20 y 30 Gy, evaluados cada 15 días

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Dosis	Medias	D.E.	Medianas	H	p
# hojas	0 Gy	10,45	3,69	10,00	24,99	<0,0001
# hojas	10 Gy	14,29	7,61	13,00		
# hojas	20 Gy	11,12	4,50	11,00		
# hojas	30 Gy	11,76	6,37	11,00		

Trat.	Ranks
0 Gy	365,04 A
20 Gy	389,07 A
30 Gy	410,60 A
10 Gy	489,67 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

3.7 Efectos de la radiación sobre el tamaño de roseta en la fase de aclimatación

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 cm², para la dosis de 20 Gy, tal como lo indica la figura 7. En esta figura el diagrama de cajas señala el proceso de crecimiento de la planta cada quince días para cada dosis de irradiación recibida. El crecimiento de la roseta es proporcional al tiempo, al igual que a la dosis de radiación absorbida, entre mayor es el tiempo y menor la dosis, mayor es el área de la roseta. Sin

embargo la dosis de 10 Gy a lo largo de las semanas indica la presencia de muchos individuos con comportamientos atípicos que alcanzan áreas de roseta mucho más altos que el resto de individuos irradiados con diferentes dosis.

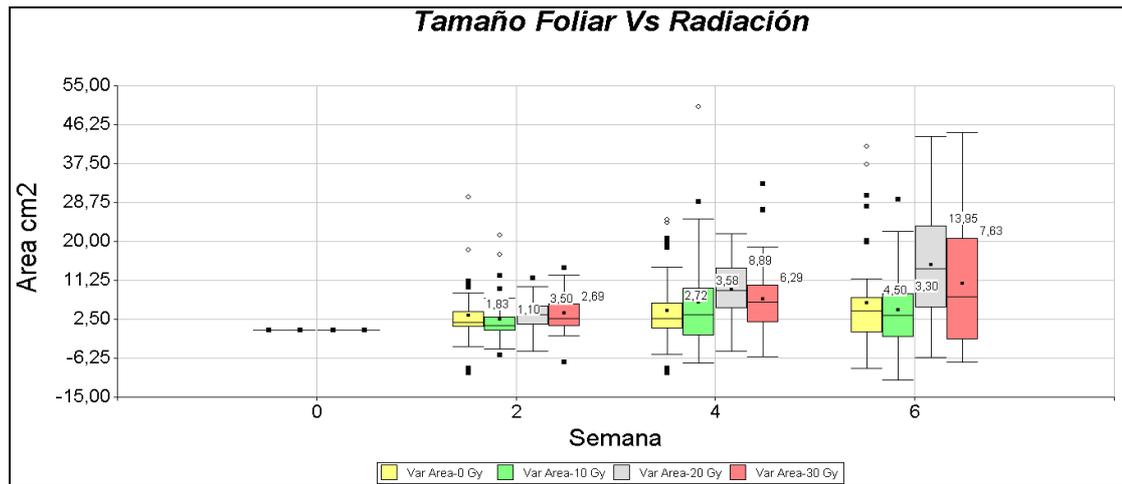


Gráfico 6.- Diagrama de Cajas representando la distribución de los datos obtenidos cada quince días para el tamaño de roseta de los explantes aclimatados previamente irradiados *in vitro* con las dosis de 0, 10, 20 y 30 Gy evaluada cada 15 días

De igual manera, con el fin de conocer si los tratamientos de irradiación generan un comportamiento distinto en los explantes, se sometieron los datos a un análisis no paramétrico de Kruskal Wallis (Tabla 8) para este análisis se consideró la variación de tamaño que presentaron las plantas entre cada medición hecha. Como resultado se dividieron a las medias en dos grupos dejando la dosis de 20 Gy en un grupo estadístico distinto al del resto de tratamientos, registrando la media más alta. Mientras que 0, 10 y 30 Gy

conforman un distinto grupo estadístico sin presentar una diferencia significativa entre sus medias.

Tabla 8.- Prueba de contrastes Kruskal Wallis para el tamaño de la roseta de los explantes aclimatados previamente irradiados *in vitro* con las dosis de 0, 10, 20 y 30 Gy evaluada cada 15 días

Prueba de Kruskal Wallis

Semana	Variable	Dosis	Medias	D.E.	Medianas	H	p
6	Var Area	0 Gy	6,18	11,01	4,50	17,54	0,0005
6	Var Area	10 Gy	4,53	9,12	3,31		
6	Var Area	20 Gy	14,71	12,83	15,11		
6	Var Area	30 Gy	10,54	13,87	7,64		

Trat.	Ranks
10 Gy	85,26 A
0 Gy	91,13 A
30 Gy	108,17 A
20 Gy	132,10 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

3.8 Microscopía electrónica

Ciertos explantes sometidos a irradiación presentaron diferente pigmentación en la superficie de sus hojas, la pigmentación foliar de explantes que no han recibido radiación gamma exhiben una coloración verde oscura (figura 21 B), mientras la dosis de 30 Gy en uno de los individuos irradiados presentó un color verde claro, incluso en algunas de sus hojas la mita color verde oscura y la otra mitad color verde claro (fig 21 A).

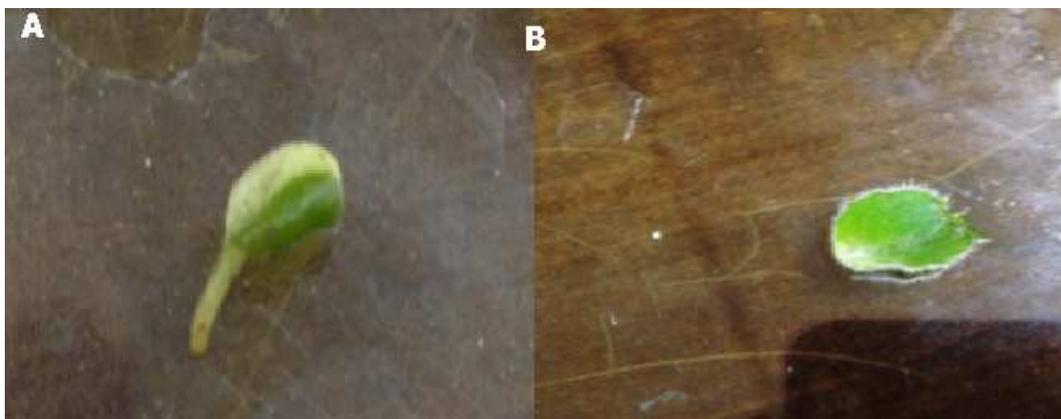


Figura 21.- Hojas de explantes *in vitro* A) muestra de hoja después de haber recibido una dosis de 30 Gy, muestra Q1 B) muestra B1, hoja de explantes que no han recibido radiación *in vitro*

Las muestras preparadas para obtener cortes ultrafinos y ser observadas por Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) fueron procesadas con distintos tratamientos con el fin de alcanzar una estabilización celular que permita describir la morfología celular lo más parecido a su comportamiento *in vivo* posible. El primer ensayo, ensayo A, descrito en el apartado material y métodos, permitió describir la estructura ultra fina de las células de hojas de un explante testigo, o blanco (B1) es decir sin dosis de irradiación. En las figuras 22 y 23 se ven 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 fue de 90 nm.

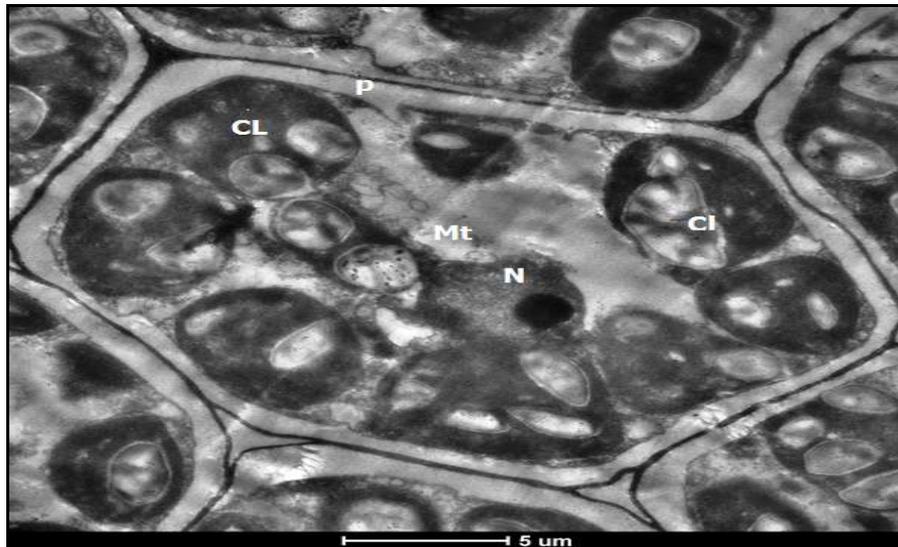


Figura 22.- Célula vegetal de una sección de hoja de *Saintpaulia ionatha* sin tratamientos de radiación con gran acumulación de cloroplastos (Cl), con presencia de mitocondrias (Mt), un núcleo prominente (N) y pared celular bien definida (P). Bar= 5 μ m

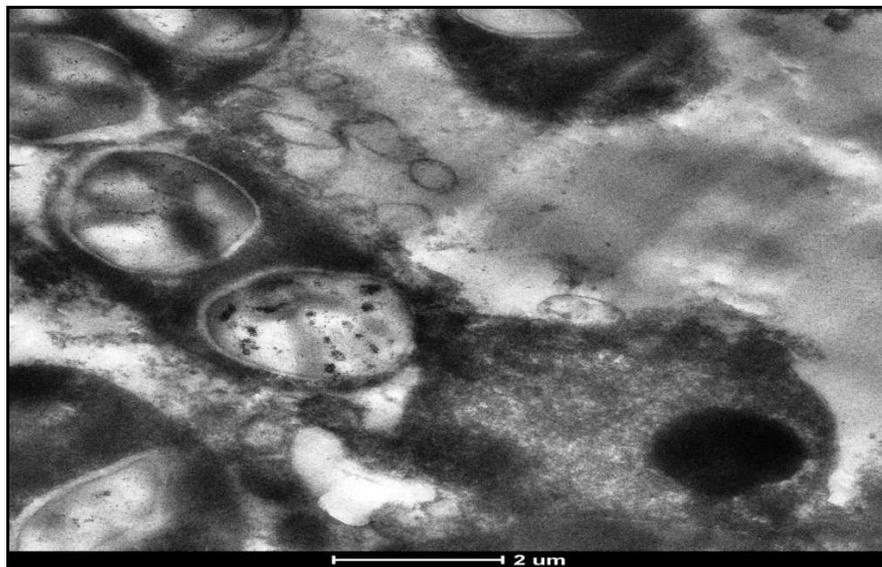


Figura 23 Citoesqueleto de célula vegetal de una sección de hoja de *Saintpaulia ionatha* sin tratamientos de radiación con presencia de cloroplastos (Cl) y mitocondrias (Mt), un núcleo prominente (N). Bar= 2 μ m

La figura 24 indica cortes de 1000 nm vistos con un microscopio óptico con un objetivo de 100x y 40x. La figura 24A muestra la estructura celular de la hoja identificada como Q1, donde se puede identificar las paredes celulares, con bordes irregulares vistos con un lente de 100x. En la figura 25B se puede observar la estructura celular del tejido parenquimático de reserva de la muestra B1 a una magnificación de 40x, mientras que la figura 25C permite ver las células del tejido en una magnificación de 100x indicando la gran cantidad de plastos en su interior.

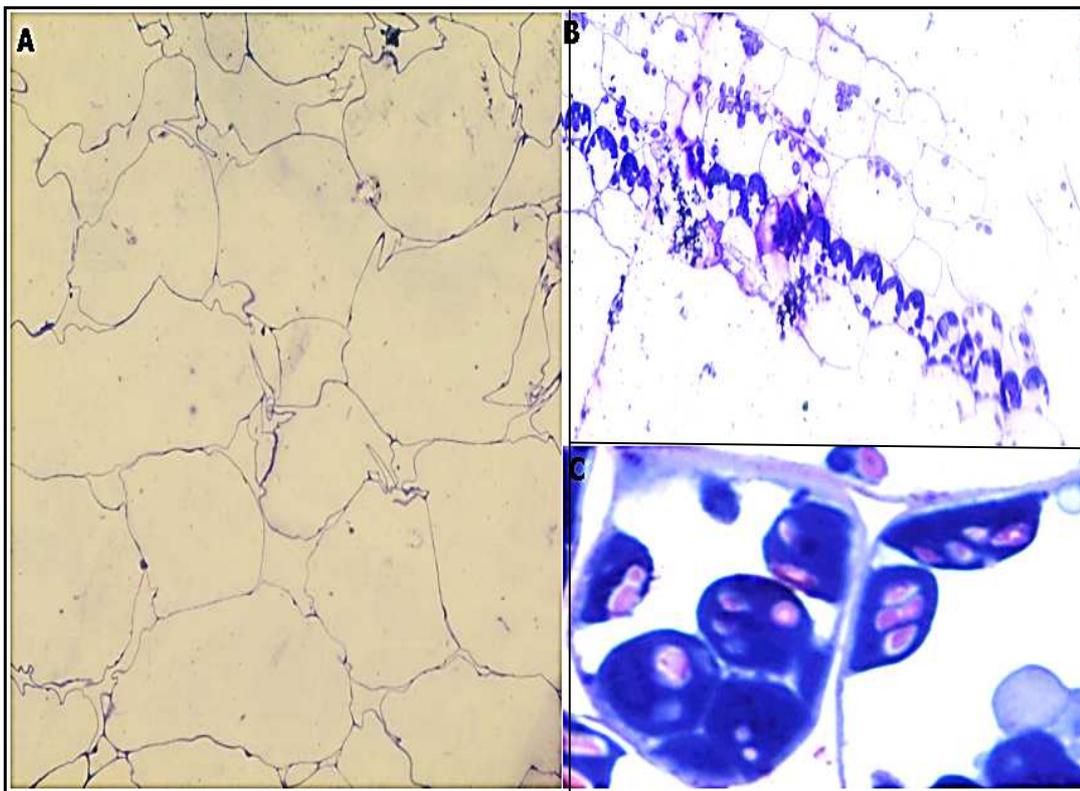


Figura 24.- Cortes de 1000 nm de sección de hojas. Ensayo A A) Q1 magnificación 100x B) B1 con magnificación 40X C) B1 un objetivo de de 100x.

Para el siguiente ensayo, ensayo B, se probó una infiltración experimentada para tejido humano (Guerra, 2012). En la figura 25 se ve la estructura celular de una sección de hoja de la muestra Q1 y la muestra B1. La figura 25A indica células de la muestra Q1, cuya estructura no ha sido conservada, se aprecia una fusión celular y una pérdida completa de la forma. Las células son vistas con una magnificación de 100x a un corte de 1000nm de espesor. La figura 25B indica la estructura celular de una sección de hoja de la muestra B1, las células conservan su pared celular, y no se aprecia fusión entre sus células, se distingue además dentro de las estructura acumulación de organelas celulares. El tejido es visto con un lente en aumento 100x a para corte de 1000 nm de espesor.

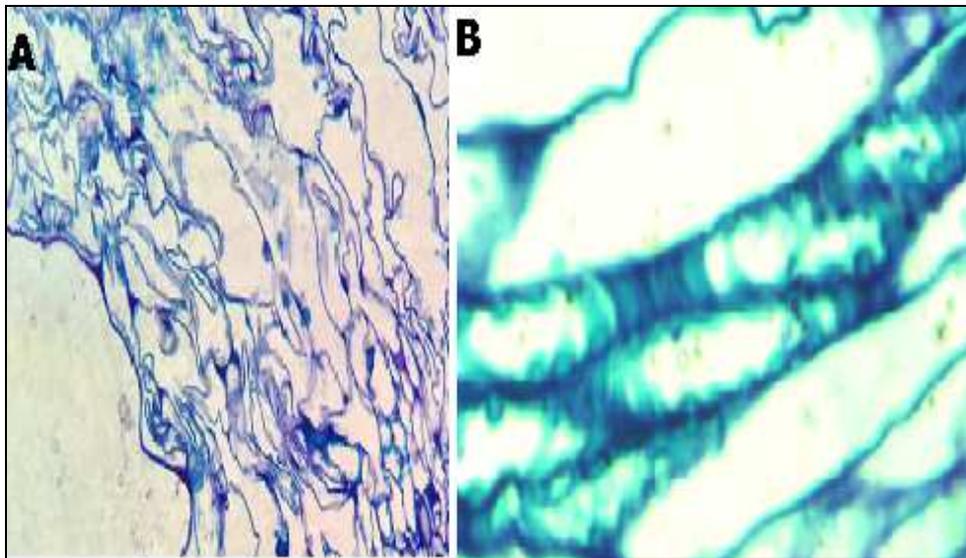


Figura 25.-Ensayo B. Cortes de 1000 nm de sección de Hojas para A) Q1 vistas con un aumento 100x B) B1 vistas con aumento 100x.

Con el fin de conseguir cortes apropiados para observar la estructura celular se probó distintas durezas de resina, se probó una resina de consistencia suave, media y dura. Los resultados de los ensayos C, D y E están representados en la Figura 26, la Figura 27 y la Figura 28

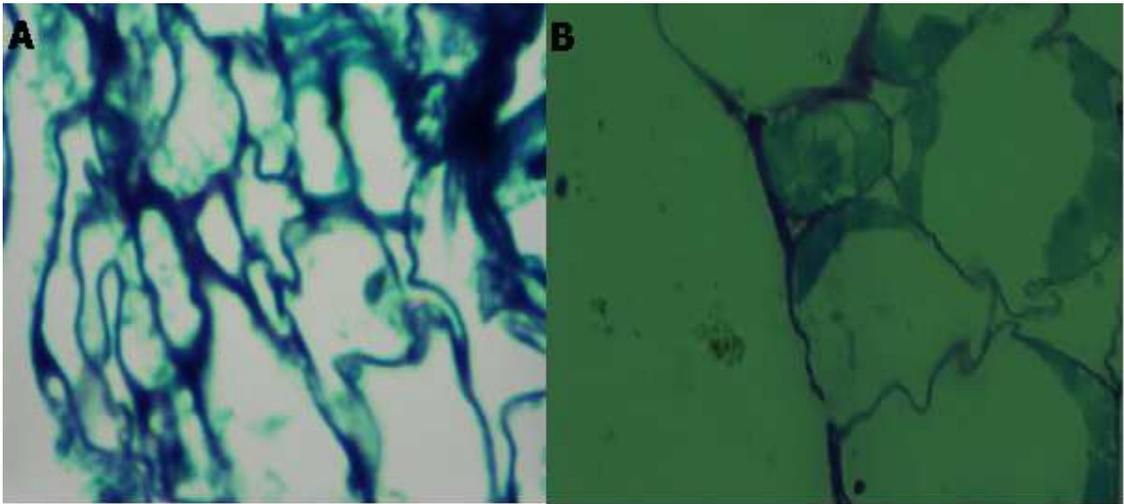


Figura 26.- Ensayo C con resina suave cortes de 1000 nm de sección de Hojas A) Q1 vistas con un aumento 100x B) B1 vistas con aumento 100x.

La Figura 26A indica un corte de 1000 nm de una sección de hoja de Q1 con una resina suave, se aprecia una deformación celular y no se puede identificar ningún organelo dentro de la célula. En la figura 26B se observa un corte de 1000 nm infiltrado con una resina suave donde con una magnificación de 100x se puede apreciar la forma celular, con un patrón reiterado de organelas al interior de la célula.

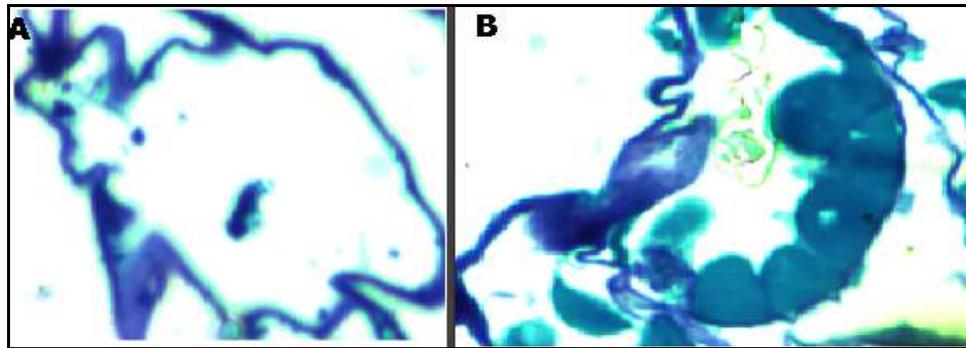


Figura 27.- Ensayo D con resina media, cortes de 1000 nm de sección de Hojas A) Q1 vistas con un aumento 100x B) B1 vistas con aumento 100x.

La figura 28 A y B indica cortes de 1000 nm de una sección de hoja de Q1 y B1 respectivamente con una resina de consistencia dura. Se aprecia en ambos casos una deformación celular con la diferencia que en caso de la muestra B1 conserva sus organelas, en la figura B se identifica la presencia de cloroplastos a su interior.

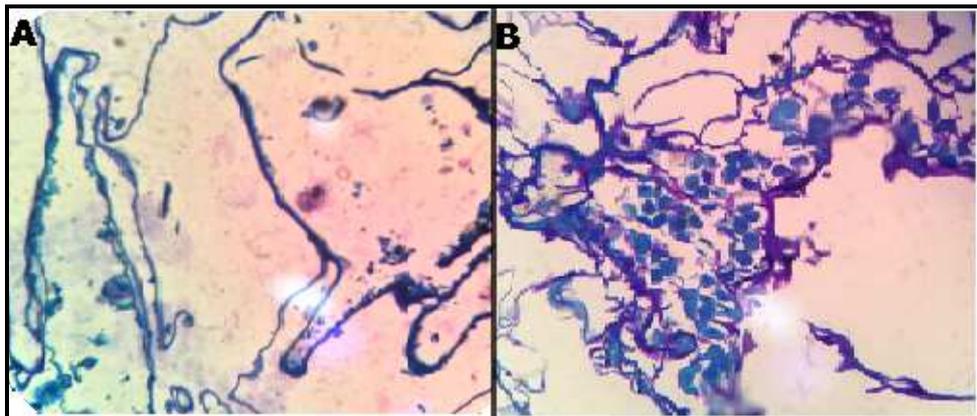


Figura 28.- Ensayo E con resina dura, cortes de 1000 nm de sección de Hojas A) Q1 vistas con un aumento 100x B) B1 vistas con aumento 100x.

El ensayo F engloba los tratamientos realizados con una fijación prolongada con glutaraldehído al 5% en un buffer PBS 0.2M, durante 96 horas con diferentes infiltraciones. La figura 29 indica cortes de 1000 nm vistos con un aumento de 100x.

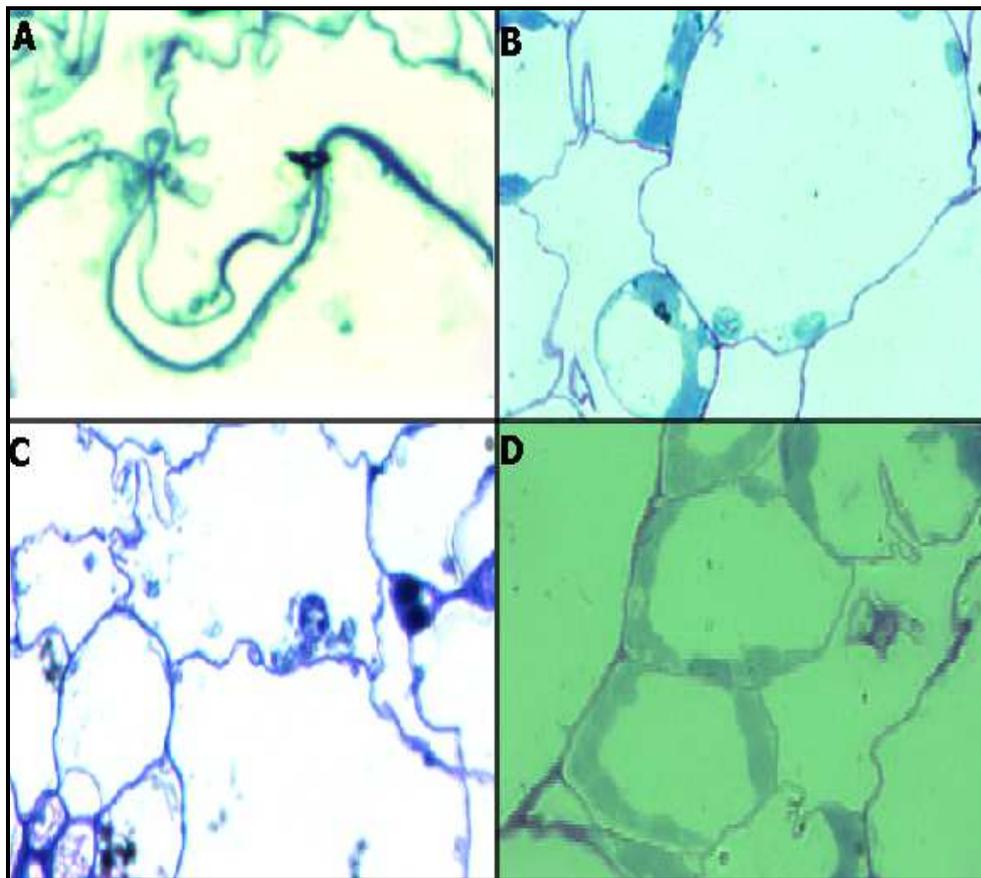


Figura 29.- Ensayo F que reúne los tratamientos realizados con fijación por un tiempo de 96 horas con Glutaraldehído, los cortes tienen un espesor de 1000 nm A) sección de Q1 vistas con un aumento 100x tratamiento Acetonitrilo como agente de transición B) Sección de B1 vistas con aumento 100x tratamiento con acetonitrilo como agente de transición C) sección de Q1 vista con un aumento 100x tratamiento con Oxido de Propileno como agente de transición D) Sección de B1 vistas con aumento 100x tratamiento con oxido de propileno como agente de transición

La figura 29 A y B indican secciones de hoja Q1 y B1 respectivamente, infiltradas con acetonitrilo como agente transitorio. Se puede apreciar en el corte de Q1 una deformación celular mayor a la observada para el corte de B1, que conserva a más de su forma celular, una acumulación de organelas en su interior. La figura 29 C y D indican secciones de hoja Q1 y B1, infiltradas con óxido de propileno como agente transitorio. Se puede reconocer en la figura 29 C un estructura celular difusa, a comparación de la figura 29 D que mantiene la forma de sus células conservadas con una gran presencia de organelas en su interior. La figura 30 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). El tejido es parte del ensayo F.



Figura 30.- 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 μ m

Para el ensayo G se probó con buffer cacodilato 0.1M para una concentración de glutaraldehído de 3%, sugerido en diversas bibliografías para cortes ultrafinos (*Penttila, A. et al 1975*) realizando distintos tratamientos. La figura 31 ilustra los cortes de 1000 nm observados con un lente de 100x.

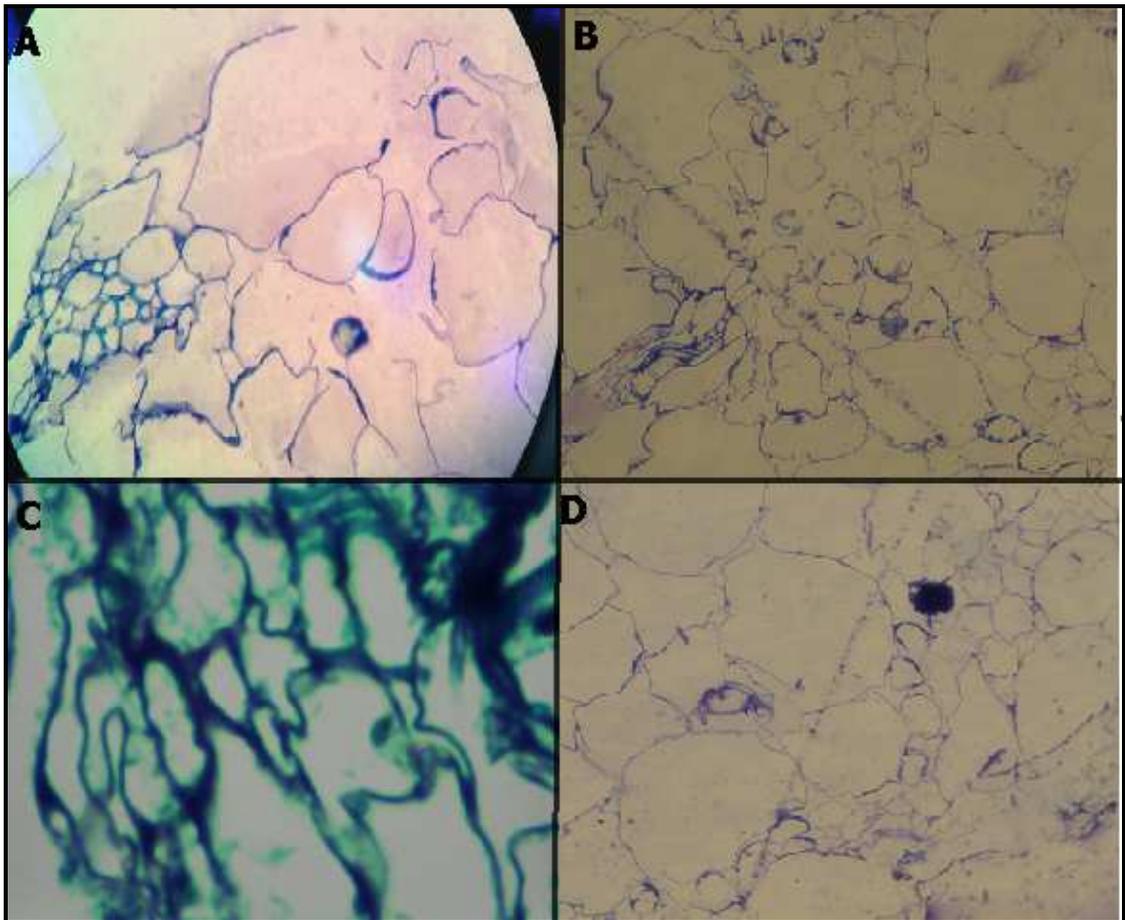


Figura 31.- Ensayo G que reúne los tratamientos realizados con fijación con Glutaraldehído 3%, en buffer cacodilato 0.2 M lo cortes tienen un espesor de 1000 nm A) sección de Q1 vistas con un aumento 100x tratamiento acetonitrilo como agente de transición B) Sección de B1 vistas con aumento 100x. Tratamiento con acetonitrilo como agente de transición C) sección de Q1 vista con un aumento 100x tratamiento con oxido de propileno como agente de transición D) Sección de B1 vistas con aumento 100x tratamiento con Oxido de propileno como agente de transición.

Finalmente el ensayo H engloba distintos tratamientos con glutaraldehído al 2,5% adicionado con sucrosa al 4% (Fig 3.12 A y B) el proceso de fijación conservo la estructura celular del tejido parenquimático de la hoja, en la figura 32 A se puede apreciar los núcleos y la pared celular, mientras que en la figura 32 B se observa la estructura celular, con presencia de organelos indefinidos en su interior. En cuanto al tratamiento realizado con glutaraldehído al 2,5%, Formaldehído al 1,5% y sucrosa al 4% (figura 32 C), se observa una buena conservación de la estructura celular con presencia de células nucleadas.

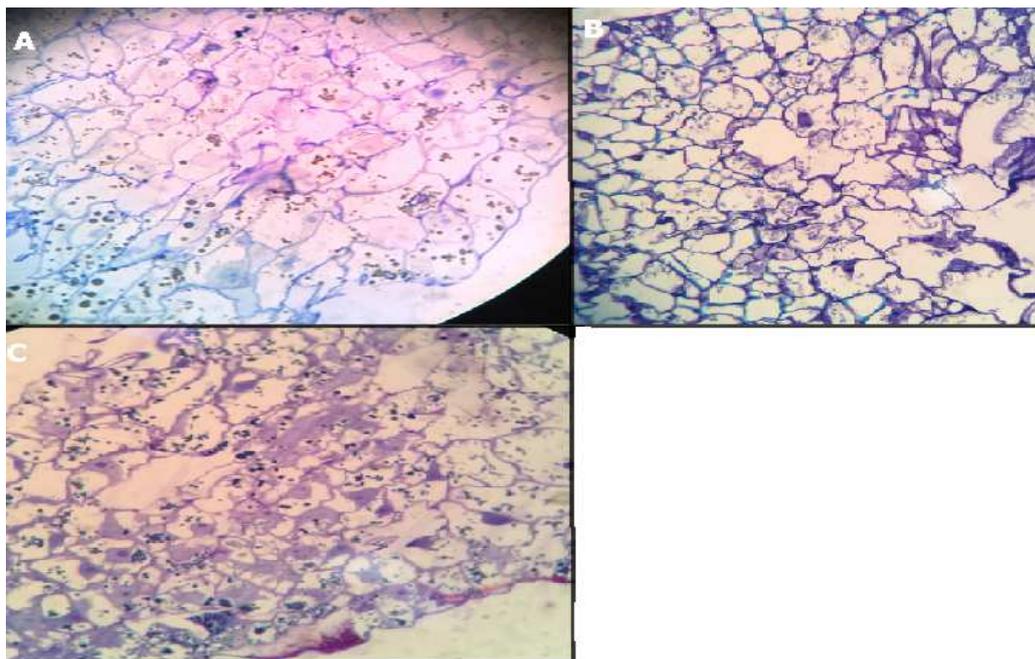


Figura 32.- Ensayo F reúne los tratamientos realizados con fijación con Glutaraldehído 2.5%, en buffer PBS 0.1 M durante 2 horas los cortes tienen un espesor de 1000 nm A) sección de Q1 vistas con un aumento 100x B) Sección de B1 vistas con aumento 100x. C) sección de Q1 vista con un aumento 100x.

Capítulo 4: DISCUSIÓN

4.1 Determinación de la dosis letal media sobre una población de *Saintpaulia ionatha in vitro*

Se ha reportado durante muchos años que la exposición de especies vegetales a la radiación gamma produce alteraciones capaces de generar mutantes morfológicos, mutantes fisiológicos y mutantes 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. Se ha reportado para otras especies como *Torenia fourmieri* una disminución de

crecimiento a partir de 20 Gy. (Anchalee, 2011), Mientras que para un cultivo *in vitro* de *Anubias congenias* irradiado con dosis de 0 a 100 Gy se reportó una dosis DL_{50} 32.12 Gy, para especies irradiadas en su estado de semillas se reportan DL_{50} de hasta 425 Gy para la germinación de *Jatropha curcas* (Songsri, *et al.*, 2011) fortaleciendo lo publicado por Sparrow *et al.*, (1961) que mencionan que la radiosensibilidad en plantas es diferente para cada etapa de crecimiento y que en general, el tejido vegetal de rápido crecimiento es altamente sensible a dosis de irradiación agudas, evidenciado también en la presente investigación, asegura también que el buen estado fisiológico de un individuo contribuye a disminuir la radiosensibilidad de especies vegetales.

4.2. Efectos de la radiación sobre el coeficiente de multiplicación *in vitro*

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. El caso de encontrar una mayor concentración de citoquinas que auxinas el resultado será la generación de brotes, en contra parte una mayor concentración de auxinas dará como resultado la dominancia apical y generación de raíces (Gordon, 1957).

El cultivo *in vitro* puede controlar estas condiciones acelerando el proceso de producción de brotes, ciertas 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^{-1} de AIA y 2.0 mg L^{-1} Zetina (Norhayati, *et al*, 2008). El medio utilizado en el presente estudio fue un medio MS suplementado con $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de Kinetina; 2 mg L^{-1} 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. Es importante recalcar, que las radiaciones ionizantes, en dosis altas causan daños a nivel celular y de DNA irreparables que no permiten la supervivencia de las plántulas, y por ende en la producción de Brotes, reflejado en la gráfica 5 donde la producción de brotes a partir de 80 Gy es nula, la combinación de estos dos efectos, disminución de hormonas y letalidad contribuyen a la disminución de brotes

Se conoce también que la radiación puede ejercer un efecto de estímulo en bajas dosis sobre la división celular (Sparrow, *et al*, 1961) en el presente estudio se reportó que la dosis de 10 Gy presenta la mayor tasa de brotes, destacando el aumento de actividad celular en los meristemas laterales que son los directos responsables en la producción de brotes.

La tabla 3 detalla los grupos estadísticos con comportamiento afines para el número de brotes, aquellos que registraron una tasa de brotes nula se encuentran dentro de un mismo grupo. Sin embargo dentro de las dosis de 60 y 70 Gy existen individuos con un coeficiente de multiplicación diferente a cero pese a presentar media de cero, permitiendo que estas dosis pertenezcan simultáneamente a otro grupo estadístico. La aleatoriedad de los efectos de la radiación (Kovács & Keresztes, 2002) hacen posibles la sobrevivencia de algunos individuos permitiendo incluso su propagación, la curva de radiosensibilidad modelada en la gráfica 4 señala una sobrevivencia del 45 y 30% para las dosis de 60 y 70 Gy respectivamente explicando la presencia de brotes en estas dosis.

Los comportamientos atípicos dentro de los individuos, descritos por puntos fuera de la distribución de los datos en el diagrama de cajas, como en el caso de la dosis de 20 y 30 Gy, reiteran la aleatoriedad de los efectos de la radiación sobre cada individuo irradiado, generando comportamientos inusuales, es decir distintos a la mayoría de individuos congregados dentro de un rango de distribución, como un coeficiente de multiplicación de ocho brotes por explante

registrado para la dosis de 30 Gy (fig. 3.2) estos comportamientos atípicos indican la presencia de mutantes a lo largo de las dosis de irradiación utilizadas (Gunckel, 1957).

4.3 Efecto de la radiación sobre el crecimiento longitudinal *in vitro*

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. En el proceso de crecimiento la elongación celular es definido por movimientos dirigidos por la luz, este fenómeno es conocido como fototropismo, resaltando así la importancia que tiene la luz en este proceso. La temperatura, también juega un papel importante en el proceso, ya que se asocia una disminución de crecimiento con bajas temperaturas (Sparrow, *et al* 1961). Sin embargo estos factores, luz y temperatura, han sido excluidos en el análisis del crecimiento de los explantes, ya que durante el proceso de investigación las temperaturas ambientales fueron controladas teniendo una temperatura constante de 25 ± 1 °C y una intensidad lumínica de 1000 Lx y 18 h diarias de iluminación. No se puede desconocer la contribución de auxinas y giberelinas, dos reguladores de crecimiento involucrado en el crecimiento apical de explantes, sin embargo ya que el medio de cultivo fue enriquecido con una alta concentración de auxinas

un daño sobre su ruta metabólica solo podrá ser evaluado en campo (Gunckel, 1957).

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. Es reiterada la acumulación de eventos atípicos para la dosis de 20 Gy, al igual que en el caso de la *tasa de brotes* donde se evidenció el mismo fenómeno.

La tabla 3 dividió los tratamientos de irradiación en 3 grupos, el grupo A que registro los menores medias para el crecimiento, el grupo B que representa las dosis con crecimiento homogéneo, y el grupo C que incluye la dosis de 20 Gy pero excluye a la dosis 40 Gy, recalando la diferencia entre los dos tratamientos, debido a la letalidad de ciertas aberraciones inducidas por la radiación a partir de esta dosis.

4.4 Efecto de la radiación sobre el número de hojas *in vitro*

Violeta Africana es una especie vegetal compacta, de tallo corto que forman racimos ovalados de flores cerca al suelo. La morfología propia de la planta no permite identificar con claridad brotes laterales, debido a la cercanía entre ellos. Se consideró durante la investigación un brote al conjunto robusto de hojas capaz de ser sub cultivado, por esta razón el número de brotes con el número de hojas está íntimamente relacionado, los dos provienen del mismo tejido meristemático (Norhayati, *et al*, 2008).

Estudios similares sobre efectos de la radiación ionizante en diferentes especies cultivadas *in vitro* (Anchalee, 2011; Othola-Gómez, *et al*, 2001) han reportado disminución del número de hojas a medida que la radiación aumenta, evidenciando nuevamente los daños mortales de la radiación sobre los explantes. Durante la presente investigación se vio que el necrosamiento de los explantes por efectos de la radiación empieza en el tejido vascular (tallo) permitiendo que las hojas sean la última parte de la planta en ser afectada, es por esto que los resultados mostrados en la tabla 4 divide a los tratamientos en seis grupos estadísticos pues la aparente resistencia de las hojas a la radiación hace que los resultados presenten comportamientos distintos para los tratamientos. El tiempo de valoración para esta variable, no permitió establecer el ciclo final de los efectos letales de radiación sobre las hojas.

La tabla 4 indica que las dosis de 10 y 20 Gy no tienen una diferencia significativo en cuanto a la producción de hojas comparado con 0 Gy. No obstante es importante revisar los expuesto por el análisis exploratorio (gráfica 4) donde indica que pese a que el tratamiento de 0 Gy presenta la media más alta, 10 hojas por explante; la dosis de 10 Gy registra una distribución más amplia indicando que parte de sus individuos alcanzaron valores máximos de hasta 20 hojas por explante siendo este un valor mucho más alto que lo registrado por el resto de tratamientos. Este análisis exploratorio es recíproco con lo reportado para el número de brotes donde los resultados sugieren que la dosis de 10 Gy generan un estímulo en la división de te meristemas laterales encargados de este fenómeno, produciendo mayor número de brotes.

La grafica 4 indica también comportamientos atípicos en la dosis de 20 Gy para esta variable, congruente a lo expuesto anteriormente para el número de brotes y el tamaño, los comportamientos atípicos sugieren grandes probabilidades de encontrar mutantes, coincidiendo con lo expuesto por González, (2005) quienes reportan una nueva variedad de Violeta Africana, "Delia" obtenida a una dosis de 20 Gy (González, *at al.*, 2005).

4.5 Aclimatación

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 división celular, es otra función que también se ve afectada, por el uso de fitohormonas que pueden acelerar el proceso de división celular (Saifullah, *at al*, 2007).

Se debe asegurar un buen sistema radicular de las plántulas antes de ser llevadas a campo, ya que de todos los factores mencionados dificultan su adaptación y si no posee un sistema que le permita absorber nutriente y adherirse a su medio las posibilidades de sobrevivencia disminuyen, confundiendo el efecto de la radiación sobre estos (Lincon & Zeiger, 2006)

Existe poca literatura acerca de los efectos de radiación de especies *in vitro* comparando con su crecimiento *in vivo*, (Anchalee, 2011; Othola-Gómez, *et al*, 2001); sin embargo en base a lo expuesto reiteradamente acerca del daño que las radiaciones generan sobre las rutas metabólicas (Gordon, 1957) de reguladores de crecimiento, la presente investigación pretendió identificar tales alteraciones al aclimatar los explantes irradiados y comparar los parámetros *supervivencia*, *número de hojas*, y *tamaño de roseta*.

En cuanto a la supervivencia de los explantes, como se mencionó anteriormente al ser una etapa crítica es posible encontrar un índice de mortalidad para plántulas que no han sido irradiadas, como se indica en la tabla 6 donde para la dosis de 0 Gy se registra un 88% de supervivencia. Publicaciones hechas sobre la regeneración de cultivos *in vitro* de *Saintpaulia* indican que el índice de regeneración obtenido es bastante bueno encontrándose en los rangos esperados. Taha, *et al*, (2008) reportaron una supervivencia del 84% para Violeta Africana, otros estudios, en Anthurios por ejemplo, publican porcentajes de 81% de supervivencia en esta fase (Morales, *et al*, 2008), y diversa literatura manifiesta que los rangos esperados para una buena aclimatación van del 80 al 90%

La tabla 6 indica como los índices de supervivencia 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 supervivencias sobre el 80%. La dosis de 30 Gy por otra parte presenta un porcentaje de supervivencia

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.

4.6.- Efectos de la radiación sobre el número de hojas en fase de aclimatación

Como se ha mencionado, el tejido encargado de la regeneración de la planta, incluida la formación de hojas es el meristemático; desde los inicios de la radiología estudios realizados en plantas, registran que este tejido es más sensible a efectos de radiación que tejidos con una actividad celular menor de igual manera se ha visto que durante el crecimiento muchos sistemas internos u organelas celulares pueden ser afectados dando como consecuencias diferentes patrones de crecimiento (Lincon & Zeiger, 2006) .

Tomando en cuenta que el efecto de la radiación sobre ciertas rutas metabólicas involucradas en la producción de hormonas pueden ser afectadas, o incluso la misma hormona puede ser modificada reduciendo su capacidad de estímulo de crecimiento, el comportamiento homogéneo de la dosis de 20 y 30 Gy es entendible, las primeras semanas presentan un pico de crecimiento seguido de un crecimiento constante hasta la sexta semana de evaluación,

menor a el crecimiento de la dosis de 0 Gy. No se observa un decrecimiento pese a la alta mortalidad registrada para la dosis de 30 Gy, esto refuerza lo expuesto acerca de la capacidad de retención de los reguladores de crecimientos adicionados en el medio por parte de los explantes (Maiké & Alfermann, 2002).

El gráfico 3.6 permite observar que 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.

4.7.- Efectos de la radiación sobre el tamaño de roseta en la fase de aclimatación

El tamaño de la roseta se refiere al área que ocupan las hojas para formar la parte aérea de la planta, está afectada por dos características importantes; el número de hojas y el área foliar. Los resultados indicados para esta variable (tabla 8 y gráfico 7) muestran un fenómeno interesante, pese a que el mayor número de hojas se evidenció en la dosis de 10 Gy, el mayor tamaño de roseta se registra en la dosis de 20 Gy. Este resultado es comparable a

estudios similares realizados en estacas de hojas de *Saintpaulia ionatha* con tratamiento de radiación gamma; donde los resultados indican que diámetro de roseta más alto fueron obtenidos a 20 Gy (Wongpiyasatid, *et al.*, 2007).

El área foliar de las plantas está relacionado con el desarrollo, es un parámetro muy importante dado que las hojas sintetizan los carbohidratos que van a repartirse en los diferentes órganos además de ser las directas responsables de la fotosíntesis, por ende entre mayor es la superficie, mejor eficiencia en el proceso (Kozlowsky, *et al.*, 1991). La floración, por ejemplo, es un evento que depende claramente del área foliar ya que se requiere de mucha energía para la maduración de yemas florales, esta energía es producida al interior de las hojas (Warnock *et al.*, 2006). Estos resultados implican que ambas dosis de radiación ejercen un estímulo en la división celular de la planta, cada uno en diferentes tejidos.

4.8 Microscopía electrónica

La presencia de quimeras no es más que un indicativo de la coexistencia de distintas líneas celulares en un mismo organismo. Cuando se habla de líneas celulares, se refiere a células con contenido de información genética distintas unas de otras. La figura 21 indica una mutación en una de las líneas celulares que conforman las hojas y muestran albinismo, la falta de color indican que no

hubo una diferenciación de cloroplastos sobre la capa dérmica trayendo como consecuencia una nula producción de clorofila, es interesante ver como la distribución de las dos líneas están limitadas por la nervadura principal de la hoja (Lincon & Zeiger, 2006).

A nuestro conocimiento no se ha reportado literatura sobre estudios en la estructura ultrafina de hojas quimeras vistos por microscopio electrónico de transmisión. Los esfuerzos dedicados a este fin, han abierto un gran desafío durante la presente investigación sugiriendo que el albinismo encontrados está acompañado de diferentes alteraciones morfológicas y bioquímicas en los componentes celulares, que dificultan su estabilización química, en las siguientes líneas se buscara explicar las diferentes condiciones en las que las muestras han sido procesadas con el fin de analizar su estructura.

El primer ensayo realizado (Fig. 3.8), fue elaborado con el protocolo reportado en polen de tomate de árbol (del Hierro, 2013). Las diferencias estructurales entre el polen y hojas han generado dificultades en la aplicabilidad del protocolo en las muestras analizadas.

El polen es un órgano expuesto a condiciones extremas durante largos periodos después de ser liberados de las anteras, lo que conlleva una estructura celular capaz de resistir tales daños, la barrera de protección para estas células es conocida como *esporodermis*. Las células vegetales de una sección de hoja por su parte, son la frontera de la planta con el medio ambiente,

y las encargadas de asegurar el intercambio de gases, luz y nutrientes lo que implica una pared celular constituida de celulosa un polisacárido altamente selectivo que confiere rigidez a la célula, sin embargo no tan resistente como la esporodermis, que está constituida por exina e intina, péptidos sumamente resistente a daños (Lincon & Zeiger, 2006).

Entre las principales diferencia encontramos la presencia de cloroplastos y una vacuola extensa para células de hojas, mientras que para las células de polen una marcada diferencia es la presencia de dos núcleos, uno vegetativo y otro germinativo. Estas características confieren un gradiente osmótico distinto para cada célula, dando como resultado el daño celular al usar el mismo protocolo para muestras como las obtenidas de los ensayos de irradiación *in vitro* (Maike & Alfermann, 2002).

Cabe resaltar, que en el ensayo A, las muestras blanco (B1) no reportaron las mismas deformaciones que las muestras quimeras (Q1). 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 *Maike & 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. Las capas de células epidérmicas poseen paredes celulares rígidas con capas de cutina, suberina o ceras a lo largo de la hojas, formando una gran barrera al daño ambiental, sin embargo las células encontradas en cultivo *in vitro* han perdido estas características estructurales presentando una capa de protección más delgada, evidenciado en las diferencias estructurales que pueden aumentar la radiosensibilidad de las células (Fig 3.2; 3.3 y 3.4). El daño causado en las células de Q1 no permite realizar cortes ultra finos porque implica ruptura celular por este motivo la gráfica 3.4 indica cortes de 1000 nm vistos en microscopio óptico (Maiké & Alfermann, 2002).

Los ensayo B, C, D y E pretenden superar las dificultades presentadas para realizar cortes ultrafinos, el ensayo B sigue el protocolo sugerido por Guerra (2012) quien sugiere que para tejidos delicados, se debe probar con una infiltración graduada que asegure el reemplazo completo del agente intermediario (acetoneitrilo) sin que la viscosidad de la resina cause daños sobre la célula.

Por su parte John & Luft (1961) menciona que si el momento de realizar corte la resina se rasga es muy probable que la muestra sea mas dura que la resina, o que su infiltración a sido pobre por la visocidad del polimero. Se probó

tres tipos de resinas de consistencia, suave, media y dura. Los resultados indicaron nuevamente la susceptibilidad de las células a el proceso de preparación, manteniendo un patron claro a lo largo de los ensayos, la estructura celular de Q1 es vacia se identifica paredes celulares, mientras que los controles (B1), aunque no muestran una estructura definitiva su contenido celular es evidente en todos los casos, con gran presencia de plastos y almidón en su interior.

La hoja es una parte muy importante de la planta, a más de lo ya mencionado, juega un papel muy importante en el intercambio gaseoso, que da como resultado una gran difusión de gases en su interior. Cuenta ademas con un sistema vacuolar que ocupa hasta el 90% del tamaño total de la célula. Estas características presentan un desafío enorme para los fijadors que buscan mantener la esructura celular intacta, pues la acción de los fijadores es disuelta al interior de la célula. Kuho, (2007) incluso asegura que “ Las membranas vacuolares son altamente sensibles a fijadores, tienen facilidad de ruptura durante este proceso, liberando el contenido vacuolar en el citoplasma. La presencia de vacuolas y paredes celulares delgadas han llevado que las células tengan una presión osmótica considerablemente alta en relación al medio que la rodea. Desafortunadamente, no se ha descubierto agentes fijadores efectivos para solucionar los problemas de rompimientos vacuolares” (Kuho, 2007).

No obstante, el ensayo F prueba con un periodo de fijación extendido, con resultados poco promisorios en cuanto a la conservacion de la estructura celular

pero reveladores en relación a la diferencia entre Q1 y B1. Las células con un menor daño pertenecen al tejido B1 y persiste la presencia de estructuras internas en las células, a diferencia de las células Q1 que no presentan contenido celular.

Es importante resaltar que durante el ensayo F se probó un nuevo protocolo de deshidratación eliminando la concentración del 30% de etanol ya que se presume puede producir maceración en los tejidos, y deshidrataciones prolongadas pueden generar deformaciones celulares irreversibles (Vazquez & Echeverria, 2000).

Varias publicaciones sobre métodos de microscopía electrónica, hacen referencia de igual manera, a la importancia de la solución amortiguadora utilizada para la difusión de el fijador en la célula y como su osmolaridad previene daños celulares o causa daños (Kuhro, 2007; Penttilä, *et al*, 1975). El ensayo G y H buscan distintos vehículos osmolares para disminuir este efecto, el ensayo G utilizó buffer cacodilato 0.2 M, al igual que Finer & Smith, (1982) en su estudio de células epidermicas de *Saintpaulia ionatha* de un cultivo *in vivo*. Los resultados mostrados en este ensayo reúnen la evidencia para asegurar que las condiciones fisiológicas de las células *in vitro* son más complejas que lo que se ha reportado en la literatura y el daño de la radiación sobre tejido va más allá que la influencia en la pigmentación de las hojas, ha generado modificaciones morfológicas, fisiológicas y bioquímicas que no permiten un correcto procesamiento de sus células.

El ensayo H es prueba de lo expuesto, pese a que la osmolaridad del vehículo amortiguador da muestras de no alterar la estructura celular, (fig. 3.12) conservando incluso los núcleos celulares, los cortes ultrafinos vistos en TEM dieron como resultado una ruptura celular donde la identificación de células fue inválida.

En base a lo evidenciado a lo largo de los ensayos realizados para microscopía electrónica se puede resaltar la diferencia morfológica de el tejido B1 con Q1, mostrada en la resistencia de las células al procesamiento químico, y por la demostración de contenido celular en su interior. El factor delimitante en los protocolos de microscopía electrónica es la fijación una vez estabilizadas las estructuras celulares el procesamiento de la muestra no causaría daños severos. Existen diversos amortiguadores químicos disponibles de acuerdo al pH y la concentración molar que se requieran. (Vazquez & Echeverria, 2000)

Capítulo 5: 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% (DL₅₀) es de 53 Gy y asegura que no hay supervivencia con dosis superiores a 80 Gy después de 30 días de recibir irradiación gamma Co⁶⁰

La producción de brotes y el número de hojas disminuyen a medida que la dosis de radiación aumenta. 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.

La tasa de crecimiento longitudinal no es directamente afectada por la radiación ionizante recibida.

El porcentaje de supervivencia de explantes de *Saintpaulia ionatha* aclimatados en un sustrato compuesto por tierra negra, turba y cascajo en una proporción de 2:1:1 es de 88%. La dosis de 30 Gy disminuye la supervivencia de explantes en su fase de aclimatación presentando apenas 64% de supervivencia

La acumulación de eventos atípicos para la dosis de 20 Gy aumenta las probabilidades para encontrar mutantes con gran capacidad regenerativa en campo. El porcentaje de supervivencia en campo es de 80%.

El tamaño de roseta está directamente influenciado por el área foliar, la dosis de 20 Gy presenta el mayor tamaño de roseta a los 45 días de aclimatación de plántulas irradiadas *in vitro*.

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 fijadores hipertónicas, razón por la cual no permitieron realizar cortes ultrafinos del tejido vegetal.

El tejido vegetal *in vitro* proveniente de explantes no irradiación mantiene una estructura conservada con gran presencia de organelas celulares frente al tejido de explantes irradiados que no presentan contenido celular en su interior y alta susceptibilidad a plasmólisis

Capítulo 6: RECOMENDACIONES

Debido a que la radiación genera mutaciones y daños al azar para determinar un patrón de sensibilidad claro es preferible realizar los ensayos de exposición con al menos 100 individuos para cada dosis.

El proceso de necrosamiento o muerte celular de hojas en los explantes de *Saintpaulia ionatha* es lento. El estudio de radiosensibilidad debe ser extendido a 60 días de observaciones.

Con el fin de establecer daños sobre las rutas metabólicas de los principales reguladores del crecimiento, se recomienda sembrar los explantes irradiados en un medio MS sin adición de fitohormonas.

Para medir efectos de la radiación ionizante gamma Co^{60} los estudios pueden ser complementados con análisis citogenéticas que permitan determinar la frecuencia de poliploideas.

Siendo la fijación el proceso determinante para realizar cortes ultrafinos, es importante conocer el comportamiento osmolar de las células estudiadas. La osmolaridad de la solución portadora del fijador puede causar plasmólisis por lo que es importante el uso de distintas soluciones amortiguadores con distintos rangos de pH y concentración molar.

El uso de resina EPON 812 es ampliamente utilizado para infiltración de tejidos animales, humanos y vegetales, sin embargo para tejidos vegetales se recomienda el uso de resina Spurs por tener una viscosidad menor la resina EPON.

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, Managment, & Applied Siences & 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 folowing 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 and young axenic leaves of African Violet (*Saintpaulia ionantha*). *Scientia 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
- 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 ionantha*) . *Revista Electronica Granma Ciencia*, 50-57.
- Espinoza, A., Mejía, J., & Rodríguez, 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). Multiplicacion in vitro de violeta Africana Saintpaulia ionatha. *Revista electronica Granma Ciencia*, 11(2), 45-51.
- Estrada J., P. M. (2011). Efecto de rayos gamma 60Co 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 Trópicales*, 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 .
- Henny, J., & Chen, R. (2012). Cultural Guidelines for comercial production of African Violets (Saintpaulia ionatha). *Enviromental Horticulture Department, University of Florida.*, 2-4.

- Hered, J. (1964). INTERSPECIFIC HYBRIDIZATION IN AFRICAN VIOLETS. *Journal of heredity*, 55(4), 181-183.
- Hoyos, J. L., Crispulo, R., & Velasco, R. (2008). Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de fitohormonas en la micropropagación del plátano Dominico Hartón (Musa AAB Simmonds). *REVISTA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS*, 99-104.
- International Atomic Energy Agency. (2013). *Comisión Internacional de Protección Radiológica*. Recuperado el Enero 2013, de Unidad y Medidas de la Radiacion : (https://rpop.iaea.org/RPOP/RPoP/Content-es/InformationFor/HealthProfessionals/1_Radiology/QuantitiesUnits.htm).
- Jala, A. (2009, 09). Morphological Change Due to Effects of Acute Gamma Ray on Wishbone Flower (*Torenia fourmieri*) In Vitro. *International Transaction Journal of Engineering, Management, & Applied Sciences & Technologies*, 2(4), 378-384.
- Jala, A. (2011, 09). Morphological Change Due to Effects of Acute Gamma Ray on Wishbone Flower (*Torenia fourmieri*) In Vitro . *International Transaction Journal of Engineering, Management, & Applied Sciences & Technologies*, 2(4), 375-384.
- Jordan, M., & Casaretto, J. (2006). *Hormonas y Reguladores del crecimiento: Etileno, Ácido Absicícico, Brasinoesteroides, Poliaminas, Ácido Salicílico y Ácido Jasmonico*. La Serena: Ediciones Universidad de la Serena.

- Konzak, C., Nilan, R., Wagner, J., & Foster, R. (1965). Efficient chemical mutagenesis. . En IAES.FAO, *The use of induced mutations in plant breeding* (págs. 346-347). Roma: Pergamo Press.
- Kovács, E., & Keresztes, A. (2002). The effect of gamma and Uv-B/C radiation on plant cells. *Micron*, 199-210.
- Kuho, J. (2007). *ELECTRON MICROSCOPY. Methods and protocols*. New Jersey: Humana Press Inc.
- Kuo, J. (2007). *Electron Microscopy*. New Jersey: Human Press Inc.
- Lincon, T., & Zeiger, E. E. (2006). *Fisiología Vegetal*. España: Universitat Jaume.
- Maike, P., & Alfermann, A. W. (2002). The organization of higher plants and plant cells and their impact on cel plant biotechnology. En P. Maike, & A. W. Alfermann, *Plant Tissue Culture* (págs. 578-588). Düsseldorf.
- Morales, C., Corbera, C., Paneque, C., & Calaña, M. (2008). Efecto del sustrato en la aclimatación del cultivo de anturio (*Anthurium andreanum*). *Scielo*, 258-265.
- Naylor, E., & Jhonson, B. (1937, Dec). A Histological Study of vegetative reproduction in *Saintpaulia ionatha*. *American Journal of Botany*, 24(10), 673-678.
- Norhayati, D., Rosna, M., & Azlina, N. (2008). Studies on plant regeneration and Somaclonal Variation in *Saintpaulia ionatha*. *Pakistan Journal og Biological Science*, 1240-1245.

- Norhayati, D., Rosna, M., & Hasbullah, N. (2008). Studies on Plant regeneration and somaclonal Variation on Saintpaulia ionatha. *Pakistan Journal of biological science*, 11(9), 1240-1245.
- Novak, F., & Brunner, H. (1992). Plant breeding: Induced mutation technology for crop improvement. *IAEA Bulletin*, 4, 25-33.
- Otahola-Gómez, V., & Aray, M. y. (2001). Induction of mutants in flower color of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* (Ram) Tzvelev) using. *Revista UDO Agrícola*, 1(1), 56-63.
- Othola-Gómez, V., Aray, M., & Antoima, Y. (2001). Inducción de mutantes para el color de la flor en crisantemos (*Dendranthema grandiflora* (Ram.) Tzvelec) mediante radiaciones gamma. *UDO agricola*, 56-63.
- Pabon, L. (2011). Induccion de mutaciones mediante radiaciones gamma de (*Passiflor edulis* Sim. var. *Universidad de Bogota*. Bogota, Colombia.
- Perez, J. (1998). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. *Instituto de Biotecnología de plantas*.
- Predieri, S. R. (2001). Pear mutagenesis: in vitro treatment with gamma rays and field selection for productivity and fruit traits. *Euphytica* 3, 217-227.
- Puchooa, D. (2005). In vitro Mutation Breeding f Anthurium by gamma radiation. *INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRICULTURE & BIOLOGY*, 11-20.
- Rabin, C., & Gonzalez, G. (2011). *Energía Nuclear, Medicina Industrial*. Montevideo: DIRAC.

- Randall, C., & Vasquez, M. (1994). UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA DE IZTAPALAPA. *Establecimiento de una planta industrial de micropropagación de plantas de ornato de (Violeta Africana) con fines de explotación y consumo interno*. Mexico.
- Robert, N., & Cherry, J. (2001). Radiaciones Ionizantes. En E. d. trabajo, *Organización internacional del Trabajo O.I.T* (tercera ed.). España: Española.
- Roca, W. M., & Mroginski, L. (1993). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Cali: W. M. y Mroginski, L. A. (eds.).
- Rodriguez, R. (1978). *Introducción a la Tecnología Nuclear. Su desarrollo y perspectivas en América Latina*. BUenos Aires: Editorial de la Universitaria de Buenos Aires.
- Rubí M., E. D. (1995). *Mejoramiento genético del aguacate mediante mutagenesis radio inducida*. Recuperado el Febrero 03, 2013, de [www:http://www.avocadosource.com/journals/cictamex/cictamex_1995/fit](http://www.avocadosource.com/journals/cictamex/cictamex_1995/fit)
- Saifullah, K., Saima, N., & Kashif, A. (2007). Callus induction, plant regeneration and acclimatization of african violet (*Saintpaulia ionatha*) using leaves as explants. *Pakistan Botanic Journal*, 1263-1268.
- Sánchez, M. I. (2009). America Latina, Situación Actual y Plantas de Irradiación en México. *"establecimiento de un control de calidad para el proceso de irradiación industrial"*, (págs. 1-10). Toluca.
- Songsri, P. S. (2011). Effects of Gamma Radiation on Germination and Growth Characteristics of Physin nut (*Jatropha curcas* L.). *Journal of biological Science*, 268-274.

- Songsri, P., Suriham, B., Sanitchon, J., Srisawangwong, S., & Kesmala, T. (2011). Effects of gamma Radiation on germination and growth characteristics of physic Nut. *Journal of Biological Science*, 268-274.
- Soto, A., & Vega, G. (2011). *Plantas con flores que atraen mariposas*. Heredia: INBIO.
- Sparrow, A. (1989). Some cytological and morphological changes induced in plants by ionizing radiation. *Science*, 114-448.
- Sparrow, A., Cuany, R., Miksche, J., & Schairer, L. (1961). Some factor affectin the responses of plants to acute and chronic radiation exposures. *Radiation Botanity* , 10-34.
- Tafur-Bello, C. (1991). Efecto comparativo de diferentes fuentes mutagénicas en . *Tesis UNALM-Facultad de Agronomía*.
- Tangpong P., T. T. (2009). Effects of Acute and Chronic Gamma Irradiationson in vitro culture of anubis congenis N.E. Brown. *Natural Science*, 449-457.
- The American Phytopathological Society. (1999). *Plagas y enfermedades de las plantas en macetas con flores*. Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Vazquez, N., & Echeverria, O. (2000). *Introducción a la microscopía electronica aplicada a las ciencias biologicas*. Mexico : Universidad Nacional Autonoma de Mejico .
- Warnock, R., Valenzuela, J., Trujillo, A., Madriz, P., & Gutierrez, M. (2006). Área foliar, componentes del área folir y rendimiento de seis genotipos de carota. *Agronomía Tropical*, 21-42.

Wongpiyasatid, A., Thinnok, T., Taychasinpitak, T., Jompuk, P., chusreeaeom , K., & Lamseejan, S. (2007). Effect of Acute Gamma Irradiation on Adventitious Plantlet regeneration and Mutation from Leaf Cutting of African Violet (*Saintpaulia ionatha*). *Natural Science*, 633-640.

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Katherine Niveló Cepeda

COORDINADOR DE LA CARRERA

M.Sc. María Augusta Chávez

Lugar y fecha: SANGOLQUÍ, DICIEMBRE DEL 2013