

EFFECTO DE LAS BAJAS DOSIS DE RAYOS X EN LA ESTABILIDAD GENÉTICA DE PLANTAS DE TOMATE (*SOLANUM LYCOPERSICUM*, L.)

Ramiro Ramírez Fernández, Luis M. González, María C. González, Licet Chávez, Arais Fernández y Yanelis Camejo

Instituto de Investigaciones Agropecuarias “Jorge Dimitrov”. Carretera Bayamo-Manzanillo Km. 16½, Gaveta Postal 2140, Bayamo 85100, Granma. Cuba
rramirez@dimitrov.cu

RESUMEN

Para el uso extensivo en la agricultura de la radioestimulación vegetal, es imprescindible estudiar la estabilidad genética de las variedades tratadas, teniendo en cuenta las potencialidades de los rayos X de inducir no solo cambios fisiológicos, sino también genéticos. Con tales fines, se usaron marcadores bioquímicos y moleculares en plantas de tomate procedentes de semillas tratadas con bajas dosis de rayos X. En el análisis bioquímico se emplearon las isoenzimas peroxidadas, polifenoloxidasas y superóxido dismutasas y en el molecular se usó la técnica del ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD), basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Al comparar los patrones electroforéticos del testigo y los tratamientos irradiativos aplicados en los tres sistemas isoenzimáticos, no se observaron variaciones apreciables en cuanto al número de bandas, ni en sus intensidades, lo que señala la poca variabilidad inducida en estos sistemas por las bajas dosis de rayos X. También, desde el punto de vista molecular, los patrones electroforéticos que se obtuvieron mostraron que todos los cebadores utilizados produjeron una amplificación nítida del ADN, los cuales generaron un total de 155 bandas, en todas las variedades estudiadas. Se observó, además, con el marcador molecular empleado un alto monomorfismo independientemente de los tratamientos aplicados, con valores entre 86-97 %, lo que indica que la irradiación a bajas dosis no aportó variabilidad genética de consideración, confirmando su posible utilidad práctica en la estimulación de algunos procesos fisiológicos sin causar mutaciones.

Palabras claves: estabilidad genética, RAPD, isoenzimas, rayos X, tomate.

EFFECT OF LOW-DOSE X-RAY IN THE GENETIC STABILITY OF TOMATO PLANTS (*LYCOPERSICON ESCULENTUM*, M.)

ABSTRACT

For the extensive agricultural use of the vegetable radioestimulation is indispensable to study the genetic stability of the treated varieties, because the X rays have potentialities not only inducing physiologic changes, but also genetic. With such a purpose biochemical and molecular markers were used in tomato plants grown from irradiated seeds with low dose of X rays. In the biochemical analysis the isoenzymes peroxidase, polyphenoloxidase and superoxide dismutase they were used and in the molecular the Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD), based on the Polymerase Chain Reaction (PCR). When comparing the control electrophoretic patron and the irradiated treatments applied, in the three systems isoenzimáticos appreciable variations were not observed as for the number of bands, neither in their intensities, what points out the little variability induced in the

plants radioestimuladas. From the molecular point of view the patron electroforéticos that were obtained showed that all the used primers produced a clear amplification of the DNA, which generated a total of 155 bands, in all the varieties study. It was also observed, with the marker genetic employee a high monomorfismo independently of the applied treatments, with values among 86-97%, what indicates that the irradiation to low dose didn't contribute genetic variability of consideration, confirming its possible practical utility in the stimulation of some physiologic processes without causing mutations.

Key Words: genetic stability, RAPD, isoenzyme, X rays, tomato.

INTRODUCCIÓN

El empleo de bajas dosis de radiaciones ionizantes con el fin de estimular los procesos fisiológicos en las plantas puede aportar grandes beneficios a la agricultura (radioestimulación) sin provocar cambios genéticos (1). Al respecto, algunos autores han mostrado una alta estabilidad en el genoma de las plantas procedentes de semillas tratadas con bajas dosis de radiaciones ionizantes (2), mientras que otros han señalado baja probabilidad en la aparición de mutaciones, totalmente indistinguible a la que se produce de forma natural (3,4).

No obstante, es muy discutido a nivel mundial la falta de un umbral de dosis para la inducción de mutaciones, es por ello que resulta imprescindible realizar estudios de estabilidad genética en las plantas procedentes de semillas tratadas con dosis estimulantes de radiaciones ionizantes, más si se considera que los rayos X y gamma son los agentes físicos más eficaces para provocar mutaciones en los organismos vivos (4, 5).

El estudio de proteínas y sistemas isoenzimáticos por electroforesis en geles de almidón o poliacrilamida ha sido ampliamente utilizado para el monitoreo de la estabilidad y/o variabilidad genética presente en especies y variedades de diferentes cultivos (6, 7).

A pesar del amplio uso de esta técnica en los análisis genéticos, algunos autores (7) reconocen que presenta una serie de inconvenientes que dificultan su utilización en la estimación de la variación o estabilidad genética, porque cerca del 30% de los cambios de bases del ADN no originan modificación en las secuencias de aminoácidos de las proteínas. La técnica, también, presenta la limitante de ser sólo válida para el estudio de genes estructurales, que codifican para determinadas proteínas y depende de la edad y el tipo de tejido utilizado.

A partir de los años sesenta, se inició el desarrollo de técnicas que permiten estudiar la variación a nivel molecular y evaluar caracteres con control genético sencillo en la propia molécula de ADN (8).

En los últimos años se han realizado investigaciones combinando los estudios electroforéticos de isoenzimas con las técnicas moleculares a nivel de ADN con vistas a determinar la estabilidad y/o variabilidad genética en plantas, procedentes de semillas irradiadas o del cultivo *in vitro*, la detección de variación somaclonal, la caracterización de bancos de germoplasmas, el establecimiento de relaciones filogenéticas, entre otros aspectos (7).

De acuerdo a la tecnología utilizada, suelen distinguirse dos grandes grupos de marcadores de ADN: los detectados por hibridación del ácido nucleico con sondas marcadas y los basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Dentro de esta última clasificación se encuentra la técnica del ADN Polimorfico Amplificado al Azar (RAPD), los cuales permiten la amplificación mediante PCR de secuencias discretas del genoma sin conocimiento previo acerca de este.

En Cuba existen diversos ejemplos del uso de los marcadores moleculares en el monitoreo de la variabilidad genética presente en el germoplasma; tal es el caso del estudio desarrollado por investigadores del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria en el cultivo del tomate (9), donde específicamente el RAPD ha sido considerado como una herramienta muy útil en estudios relacionados con la variabilidad y/o estabilidad genética, pero no existen publicaciones de su empleo en plantas procedentes de semillas tratadas con bajas dosis de radiaciones ionizantes; aspecto sumamente importante a la hora de recomendar el uso extensivo de la radioestimulación de semillas en la agricultura.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la estabilidad genética a través de marcadores bioquímicos y moleculares (RAPD) en plantas de tomate procedentes de semillas estimuladas con bajas dosis de rayos X.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aspectos generales

Se seleccionaron semillas de cuatro variedades comerciales de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill): Lignon, INCA 9-1, Tropical Mallac – 10 y Campbell –28, las cuales fueron tratadas en una fuente de rayos X, marca Philips, con un régimen de trabajo de 55 KV y 30 mA, con un filtro de aluminio de 0.75 mm y una potencia de dosis de 11.47 Gy/min con una temperatura de 24 ± 1 °C y dosis de 0, 5, 10, 15, 20, 25 Gy previamente seleccionadas como dosis estimulantes en estudios de radiosensibilidad (10) desarrollados en casa con techo de cristal y a partir de indicadores fisiológicos y bioquímicos.

Posterior a la irradiación las semillas se colocaron a germinar en cepellones con capacidad de 240 plántulas (por tratamiento), en condiciones semicontroladas y a los 25 días de germinadas, se realizó su caracterización bioquímica y molecular.

Desde el punto de vista bioquímico, se estudiaron los sistemas isoenzimáticos peroxidasas, polifenoloxidasas y superóxido dismutasas y como marcador molecular se empleó el RAPD.

Evaluación isoenzimática para determinar la estabilidad genética.

Se seleccionaron al azar hojas jóvenes de 30 plantas por tratamiento y se realizó la extracción de proteínas según el procedimiento descrito y estandarizado por Solórzano (11) en un gramo de material vegetal.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (12), realizando la lectura de la absorbancia a 595 nm del complejo proteína - Azul de Coomassie G- 250 en un espectrofotómetro (Ultrospec Plus Spectrophotometer, Pharmacia LKB), para lo cual se realizó una curva patrón de albúmina bovina (BSA) a partir de una solución madre de 1mg/mL. Se realizaron tres réplicas en cada caso.

Las corridas electroforéticas para los sistemas isoenzimáticos, se llevaron a cabo en geles de poliacrilamida (PAGE) al 10% en lámina vertical y un sistema de buffer discontinuos; con buffer de corrida Tris-Glicina 0.04M, pH 8.3.

Técnicas de tinción de los geles para determinación de isoenzimas :

Peroxidasas: Se usó acético glacial, benzidina dihidroclórica y una solución de H₂O₂ (28-32 %), según la metodología de Iglesias (13)

Polifenoloxidasas: Se utilizó dihidroxifenil metil-alanina y L-prolina en 100 mL de buffer fosfato, según la técnica descrita por Guedes (14).

Superóxido dismutasa: Se utilizaron como sustratos Nitro Blue Tetrasolium y riboflavina según el procedimiento descrito por Arulseker y Parfitt (15) y citado por Florido (18).

Evaluación molecular (RADP) para determinar estabilidad genética.

En la evaluación molecular se usó 1g de material vegetal (hojas), procedente de 30 plantas, las cuales fueron maceradas con nitrógeno líquido. Posteriormente, se procedió a la extracción de ADN siguiendo el protocolo de Dellaporta, Word y Hichs (16), en todas las variantes experimentales. El precipitado final fue resuspendido en 100 µL de buffer TE 1X (10 mM Tris – HCl, EDTA).

La calidad del ADN se constató por electroforesis de los extractos en geles de agarosa al 0.8% y solución amortiguadora de corrida TBE 0.5X (45mM Tris-Borato, 1mM EDTA pH 7), durante 45 min a 100 Volts. Para la tinción de los geles se usó bromuro de etidio (5mg/ml), durante 15-20 min y posteriormente se observaron en un transiluminador (Bioblock Scientific) (17).

La concentración de cada muestra se determinó a través de la medición de la densidad óptica a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro *Ultraspec Plus Spectrophotometer* Pharmacia LKB.

La reacción de amplificación se realizó en un volumen total de 25µL que contenía: 10mM Tris-HCl a pH 8,3; 50mM KCl, 2mM MgCl₂, 0.001% de gelatina, 100µM de cada dNTPs, 5 pmoles de cebador Kits OPA y OPF de la firma comercial Operon Technologies (Tabla 1), 2U de Taq ADN polimerasa (Amplicen) y ADN genómico.

Tabla 1. Cebadores empleados en el estudio molecular (RAPD) de las plantas procedentes de semillas irradiadas

No.	Cebador	Secuencia
1	OPF -01	ACGGATCCTG
2	OPF- 03	CCTGATCACC
3	OPF- 04	GGTGATCAGG
4	OPF- 05	CCGAATTCCC
5	OPF -07	CCGATATCCC
6	OPF -13	GGCTGCAGAA
7	OPF-14	TGCTGCAGGT
8	OPF-15	CCAGTACTCC
9	OPA-12	TCGGCCATAG
10	OPA-13	CAGCACCCAC

La concentración óptima de ADN genómico fue determinada experimentalmente, al realizar el PCR variando la cantidad de ADN (1, 5, 10, 15, 25, 50, 100, 200, 400 ng) en un volumen de 25µL, usando una muestra seleccionada al azar (4) que representa a la variedad INCA 9-1, tratada con una dosis de irradiación de 15 Gy y un cebador tipo OPF-13.

La amplificación se produjo en un termociclador marca *Techne* de la firma Progene programado para 45 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 36°C y 2 min. a 72°C, y un ciclo de 10 min. a 72°C. Los productos de la PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en solución amortiguadora TBE 0.5X y se tiñeron con bromuro de etidio, antes de ser observados en un transiluminador con luz ultra violeta.

La comparación de los patrones de amplificación obtenidos se realizó a través de la presencia y ausencia de las bandas más intensas, y se conservó su visualización a través de fotografías digitales. Este experimento se repitió tres veces en el tiempo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los sistemas isoenzimáticos estudiados, sólo las peroxidasas permitieron establecer diferencias varietales, en cuanto al número de bandas entre INCA 9-1 (2 bandas) y las restantes (4 bandas), lo que se corresponde con lo planteado por diferentes autores sobre el poco polimorfismo que presenta este cultivo (18).

Las isoenzimas estudiadas son consideradas de amplio espectro de especificidad y codificadas por un gran número de genes, además de presentar gran estabilidad en su expresión enzimática, por lo que algunos autores las recomiendan para estudios de estabilidad genética y en la identificación de cultivares. Al respecto algunos autores (2, 7) han recomendado su uso en el monitoreo de la estabilidad genética en plantas procedentes de semillas irradiadas, incluyendo el tomate (19).

Al comparar los patrones electroforéticos del testigo y los tratamientos aplicados no se observaron variaciones apreciables en cuanto al número de bandas, ni en sus intensidades, en las cuatro variedades para los tres sistemas analizados: polifenoloxidasas, peroxidasas y superóxido dismutasas, señalando la poca variabilidad inducida en las plantas procedentes de semillas irradiadas.

Cabe significar que la no existencia de variabilidad isoenzimática pudiera atribuirse a que el tratamiento de las semillas, con bajas dosis de irradiación no afectó a los loci involucrados en la expresión de los sistemas isoenzimáticos; por lo que no alteraron su patrón electroforético (20).

Lo anterior corrobora los planteamientos de numerosos investigadores sobre la baja probabilidad en la aparición de mutaciones en las plantas procedentes de tratamientos estimulantes con bajas dosis de irradiación (3, 4, 20).

A pesar de los resultados obtenidos en este trabajo y del amplio uso de estos marcadores bioquímicos en estudios de variabilidad y estabilidad genética en materiales vegetales irradiados (2), éstos presentan algunas desventajas que disminuyen su eficacia, por tanto no todas las mutaciones que se originan en el organismo podrán ser detectadas electroforéticamente, es por ello que se acude al empleo de los marcadores moleculares como una herramienta eficaz para monitorear la estabilidad genética (7).

En este sentido los marcadores moleculares, proporcionan una medida más exacta de la estabilidad genética, debido a que no son influenciados por los factores ambientales,

tienen el potencial de revelar niveles elevados de variación con una amplia cobertura de todo el genoma (21).

Sin embargo, para un uso eficaz de esta técnica se necesita precisar algunos aspectos relacionados con la concentración más adecuada del ADN genómico para su amplificación a través del PCR.

Los resultados obtenidos en la determinación de la concentración más adecuada de ADN genómico mostraron que 5 ng en un volumen de 25 μ L es suficiente para se produzca la amplificación del ADN a través de la reacción en cadena de la polimerasa; también que la concentración de 1 ng/25 μ L fue insuficiente para la visualización nítida de los patrones electroforéticos del ADN después de realizado el PCR; algo similar ocurrió con las concentraciones superiores a 100 ng/25 μ L donde la reacción en cadena de la polimerasa se inhibió totalmente, sin producir resultado alguno en los patrones de electroforesis.

Estos resultados coinciden con los publicados por Fitzwater (22), Kay y Ron (23) los cuales plantean que altas concentraciones de ADN genómico (mayor de 100 ng) bloquean la actividad de la enzima Tag ADN polimerasa, probablemente por la presencia de una mayor cantidad de contaminantes en la muestra y un excesivo número de moléculas de ADN con relación a las de la enzima.

Los patrones electroforéticos que se obtuvieron mostraron que todos los cebadores utilizados produjeron una amplificación nítida del ADN, los cuales generaron un total de 155 bandas, en todas las variedades estudiadas, 42 de ellas en INCA 9-1, 40 en Campbell -28, 37 en Lignon y 32 en T. Mallac-10. Los cebadores más informativos fueron el OPF-1, en tres de las variedades y el OPF-3 en T. Mallac al generar el mayor número de bandas (Tabla 2). La funcionalidad de estos cebadores para detectar variación genética ha sido informada por Peteira, Fernández y Chávez (9) en el estudio de la diversidad genética en variedades cubanas de tomate y las especies salvajes relacionadas y por Mukandama, Peteira y González (24) explorando la variabilidad genética inducida por las radiaciones ionizantes.

Al comparar los patrones electroforéticos de las plantas, procedentes de los tratamientos de irradiación aplicados y el control se observó un monomorfismo total en las dosis de 5 – 20 Gy, en las cuatro variedades de tomate estudiadas; a excepción de la dosis de 25 Gy (Tabla 3) donde se agrupó la variabilidad detectada (3-14 %), con el marcador genético empleado. Este alto monomorfismo pudiera indicar que la irradiación a bajas dosis no aportó variabilidad genética de consideración.

Este comportamiento coincide con los resultados publicados por otros autores (20) al estudiar el genoma de diferentes especies de plantas, procedentes de semillas tratadas con bajas dosis de radiaciones ionizantes.

Partiendo de estos resultados, sería importante señalar que el efecto estimulante de la irradiación causó, probablemente, cambios fisiológicos y no genéticos. Basados en las teorías existentes, la estimulación pudiera estar relacionada con el surgimiento de una serie de daños en el interior de las membranas que no afectan la germinación de las semillas y que provocan la activación de varias enzimas las cuales conllevan a la formación de sustancias fisiológicamente activas, que a bajas concentraciones provocan la activación de la división celular conjuntamente con la formación en las células de importantes órganos, como las mitocondrias y los cloroplastos, así como una mayor conversión de las sustancias de reserva en productos asimilables, que favorecen la formación de las plántulas (25, 26).

Tabla 2. Número de bandas monomórficas y totales detectadas con cada cebador y el porcentaje de monomorfismo calculado para cada variedad de tomate estudiada.

Cebador	INCA 9-1			T. Mallac-10			Lignon			Campbell -28		
	NBM	NBT	PM	NBM	NBT	PM	NBM	NBT	PM	NBM	NBT	PM
OPF-01	6	6	100	3	3	100	6	6	100	7	7	100
OPF-03	3	4	75	5	5	100	5	5	100	3	3	100
OPF-04	3	4	75	2	2	100	2	2	100	2	2	100
OPF-05	4	5	80	5	5	100	3	4	75	5	5	100
OPF-07	4	4	100	3	3	100	3	3	100	3	4	75
OPF-13	3	5	60	1	3	33	5	5	100	4	5	80
OPF-14	1	1	100	1	1	100	1	1	100	1	1	100
OPF-15	4	5	80	3	3	100	4	4	100	6	6	100
OPA-12	4	4	100	3	3	100	3	3	100	3	3	100
OPA-13	4	4	100	4	4	100	4	4	100	4	4	100
Total	36	42	86	30	32	94	36	37	97	38	40	95

NBM- Número de bandas monomórficas, NBT- Número de bandas totales, PM- Porcentaje de monomorfismo.

Tabla 3. Número de bandas monomórficas y totales detectadas en las plantas, procedentes de los tratamientos de irradiación.

Dosis (Gy)	INCA 9-1			T. Mallac-10			Lignon			Campbell -28		
	NBM	NBT	PM	NBM	NBT	PM	NBM	NBT	PM	NBM	NBT	PM
0	42	42	100	32	32	100	37	37	100	40	40	100
5	42	42	100	32	32	100	37	37	100	40	40	100
10	42	42	100	32	32	100	37	37	100	40	40	100
15	42	42	100	32	32	100	37	37	100	40	40	100
20	42	42	100	32	32	100	37	37	100	40	40	100
25	36	42	86	30	32	94	36	37	97	38	40	95

Por otro lado, la dosis de 25 Gy, a pesar de ser estimulante, pudiera inducir cierta variabilidad genética, por lo que no se recomienda su uso en condiciones de producción para la estimulación de semillas.

La poca variabilidad revelada por los marcadores bioquímicos y moleculares usados, indica una mayor seguridad en la aplicación de bajas dosis de rayos X con el fin de estimular determinados procesos fisiológicos en las plantas (radiohormeis) y un menor riesgo de provocar mutaciones. A la vez muestra la necesidad de emplear otros sistemas isoenzimáticos y otros métodos moleculares capaces de abarcar una mayor parte del genoma y detectar un mayor grado de polimorfismo para verificar la posible estabilidad genética en las plantas procedentes de los tratamientos con bajas dosis de irradiación.

CONCLUSIONES

Se muestra la posibilidad de empleo de la técnica del ADN polimorfo de amplificación aleatoria (RAPD) para evaluar la estabilidad genética de las plantas procedentes de semillas irradiadas con bajas dosis de rayos X y discriminar las posibles dosis mutagénicas.

Se observó una alta estabilidad genética en las plantas procedentes de semillas radioestimuladas, mostrada por los marcadores bioquímicos y moleculares usados, lo que corrobora el uso práctico de las bajas dosis de rayos X en la estimulación de determinados procesos fisiológicos en las plantas con una baja probabilidad de provocar mutaciones.

RECOMENDACIONES

Corroborar la estabilidad genética en las plantas procedentes de semillas radioestimuladas con otros sistemas isoenzimáticos y otros marcadores moleculares capaces de abarcar una mayor parte del genoma y detectar un mayor grado de polimorfismo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Vasilevski, G. (2003): Perspectives of the application of biophysical methods in sustainable agriculture. *Bulg. J. Plant Physiol.* Special Issue. 179-186.

Shirley, B. W.; S. Hanley y H. M. Goodman (2003): Effect of ionizing radiation on plant genome. *Plant cell*, 4(3): 333-347.

Soto, J. T. y A. M. Sañudo (1998): Bajas dosis de radiación y respuestas adaptativas. *Rev. Nucleus*, 24: 22-26.

Luckey, T. D. (2000): Radiobiology Deceptions reject health. Proceedings of ICONE 8788. VIII International Conference on Nuclear Engineering. April 2-6, Baltimore, MD USA.

González, L. M.; R. Ramírez y Y. Camejo (2002): Estimulación del crecimiento y desarrollo de plántulas de tomate del cultivar Santa Clara a los rayos gamma del ⁶⁰Co. *Alimentaria*, 331: 67-70.

Llanes, S. (2002). Caracterización bioquímica de somaclones y mutantes de arroz (*Oryza sativa*, L.). [Tesis de Diploma]. Facultad de Biología, Universidad de La Habana. 47 h.

Cornide, M.T. et al. (2002). Marcadores moleculares. Nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. *Editorial Félix Varela*. La Habana, 366 pp.

Chávez, L. y L. M. González (2004): Aspectos generales sobre el uso de los marcadores moleculares en la evaluación de la diversidad y la mejora genética vegetal. *Alimentaria*, 352: 119-126.

Peteira, B.; E. Fernández; M. González Chávez; T. Shagarodsky e I. Miranda (2001): Aplicación de marcadores RAPD al estudio de la diversidad genética en variedades de tomate y especies salvajes relacionadas en Cuba. *Rev. Protección Vegetal*, 16 (2-3): 84-91.

Ramírez R., L. M. González, Y. Camejo, Y. Fernández y N. Zaldívar (2006). Estudio de radiosensibilidad en plantas de tomate procedentes de semillas tratadas con bajas dosis de rayos X. *Cultivos Tropicales*, 27(1): 63-67.

Solórzano, E. A. (2002): Estudio de enzimas y proteínas de defensa en la interacción tomate (*Lycopersicon esulentum*, Mill) vs tizón temprano (*Alternaria solani*). [Tesis de Grado]. CENSA-UNAH, La Habana. 107 p.

Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*73: 248-250.

Iglesias, L. (1986): Estudio de la variabilidad morfoagronómica y bioquímica en soya (*Glycine max.* L. Merrill). Tesis de Doctor en Ciencias Agrícolas. Cuba. 85 pp.

Guedes, M. y Rodríguez, C.I. Disc electrophoretic pattern of phenoloxidase from leaves of coffee cultivars. Sep. De Portugal. *Acta Biologica*. Serie A., Vol XIII:169-177.1974.

Arulzekar S. y Parfitt, D.E. (1986): Isozyme Análisis procedures for stone fruits, almond, grape, walnut, pistachio and fig. *Hort Science*. 21(4): 928-933.

Dellaporta, S.L.; Wood, J. y Hichs, J.B. (1983): A plant molecular DNA minipreparation, versión II. *Plant Mol. Biol.*. Rep. 1: 19-21.

Oropeza M.; A. Erick; R. Marilyn y T. Vargas (2006): Establecimiento de un protocolo RAPDs eficiente para plantas de ñame. *Agronomía Trop.* 56(4): 601-606.

Florido, M.; M. Álvarez; R.M.Lara; D. Plana; M. Valera; T. Shagarodsky y C. Moya (2002): Caracterización morfoagronómica y bioquímica de 20 accesiones de tomate (*Lycopersicon spp*). *Cultivos Tropicales*, 23(4): 61- 69, 2002.

Gogebashvili, M.; L. Pkhaladze y N. Ivanishvili (2002): The influence of gamma irradiation on the formation of the antigenetic structure of plant protein. *Radiation Studies*, 10(1):12-17.

Palevina, I., I. V. Gotlib, O. Kudryashova y G. Afanasiev (2004): Genome stability after low level irradiation. *Radiation Biology and Radioecology*, 36(4): 546-560.

Jiménez, P. y P. Collada (2000): Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en programas de conservación. *Sistemas y Recursos Forestales*. 2: 237-248.

Fitzwater, T (2002): DNA and PCR Methods Archives. Disponible en: <http://micro.nwfsc.noaa.gov/forums/>., Consultada 5/5/2002.

23. Kay I. y Ron A. (2002): PCR template concentration, at HYPERLINK "http://micro.nwfsc.noaa.gov/forums/" <http://micro.nwfsc.noaa.gov/forums/>

Mukandama, J.P.; B. Peteira y M.C. González (2004): Empleo de marcadores RAPD para el análisis de la variabilidad genética en genotipos de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill), *Cultivos Tropicales*, 25(3):63-66.

Mortazavi, S. M.; T. Ikushima y H. Mozdarani (2004): An introduction to adaptive response. Web page, 2 pp.

Muckerheide, J. (2004): There has never been a time that the beneficial effects of low dose ionizing radiation were not known. *Review of Center for Nuclear Technology and Society at WPI Massachusetts State*, USA, 1-5.