

ESTUDIO BIOQUÍMICO-MOLECULAR DE LA ESTABILIDAD GENÉTICA EN PLANTAS DE TOMATE PROCEDENTES DE SEMILLAS TRATADAS CON BAJAS DOSIS DE RAYOS X

R. Ramírez[✉], L. M. González, María C. González, Licet Chávez, Arais Fernández y Yanelis Camejo

ABSTRACT. For the extensive agricultural exploitation of vegetable radiostimulation, it is indispensable to study the genetic stability of treated varieties, having in mind X ray potentialities of inducing not only physiological but genetic changes as well. Therefore, biochemical and molecular markers were employed in tomato plants derived from irradiated seeds at low doses of X rays. For the biochemical analysis, peroxidases, polyphenoloxidases and dismutase superoxide isoenzymes were determined whereas the Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) method based on Polymerase Chain Reaction (PCR) was used for the molecular analysis. When comparing the electrophoretic patterns from the control and irradiated treatments applied to the three enzymatic systems, there were not appreciable variations on the number of bands and their intensities, indicating the little variability induced in these systems by the low X ray doses. Also, from the molecular viewpoint, electrophoretic patterns showed a clear amplification of DNA by generating a total of 155 bands in all varieties studied. This molecular marker showed a high monomorphism independently of the treatments applied, with values ranging between 86 and 97 %, indicating that irradiation at low doses did not induce an important genetic variability and confirming its possible practical usefulness for stimulating some physiological processes without causing mutations.

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.

Key words: genetic stability, RAPD, isoenzyme, X rays, tomato

Palabras clave: estabilidad genética, RAPD, isoenzimas, rayos X, tomate

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 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 radiacio-

Dr.C. R. Ramírez, Investigador Auxiliar, Dr.C. L. M. González, Investigador Titular; Licet Chávez, Investigador Agregado y Yanelis Camejo, Investigadora del Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov", carretera Bayamo-Manzanillo, km 16.5, Peralejo, Bayamo, Granma; Dra.C. María C. González, Investigadora Titular del Departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, CP 32 700; Arais Fernández, Investigadora del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

✉ rramirez@dimitrov.cu

nes 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 poliácridamida ha sido ampliamente utilizado, para el monitoreo de la estabilidad y 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 reconocen que presenta una serie de inconvenientes (7), 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 solo 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 variabilidad genética en plantas, procedentes de semillas irradiadas o del cultivo *in vitro*, la detección de variación somaclonal, la caracterización de bancos de germoplasmas y el establecimiento de relaciones filogenéticas, entre otros aspectos (7).

De acuerdo con 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 Polimórfico Amplificado al Azar (*RAPD*), que permite 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 los *RAPD* han sido considerados una herramienta muy útil en estudios relacionados con la variabilidad y 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.

Se seleccionaron semillas de cuatro variedades comerciales de tomate (*Solanum lycopersicum* 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, un filtro de aluminio de 0.75 mm y una potencia de dosis de 11.47 Gy/min con una temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 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 peroxididasas, 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 en un gramo de material vegetal (11).

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 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Se realizaron tres réplicas en cada caso.

Las corridas electroforéticas para los sistemas isoenzimáticos, se llevaron a cabo en geles de poliácridamida (*PAGE*) al 10 % en lámina vertical y un sistema de buffer discontinuos, con buffer de corrida Tris-Glicina 0.04M, pH 8.3 (11).

Técnicas de tinción de los geles para la determinación de isoenzimas:

- ☞ *Peroxidasas:* se usó acético glacial, benzidina dihidroclórica y una solución de H_2O_2 (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 de Guedes (14).
- ☞ *Superóxido dismutasa:* se utilizaron como sustratos Nitro Blue Tetrasolium y riboflavina, según el procedimiento de Arulsekera y Parfitt (15, 18).

Evaluación molecular (RADP) para determinar la 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, Wood y Hichs (16), en todas las variantes experimentales. El precipitado final fue resuspendido en 100 μL de buffer TE 1X (10 mM Tris-HCl, Molaridad 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-Molaridad Borato, 1mM EDTA pH 7), durante 45 min a 100 volts. Para la tinción de los geles se usó bromuro de etidio (5 mg.mL⁻¹), 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 *Ultrasepec Plus Spectrophotometer* Pharmacia LKB.

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

Tabla I. 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 25 µL, 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 *Techné* 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 ultravioleta.

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, solo las peroxididasas permitieron establecer diferencias varietales, en cuanto al número de bandas entre INCA 9-1 (dos ban-

das) y las restantes (cuatro bandas), lo que se corresponde con lo planteado 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 las recomiendan para estudios de estabilidad genética y en la identificación de cultivares, así como también han recomendado su uso (2, 7) 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, peroxididasas y superóxido dismutasas (Figura 1 a y b), 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 numerosos planteamientos 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 de este trabajo y del amplio uso de estos marcadores bioquímicos en estudios de variabilidad y estabilidad genética en materiales vegetales irradiados (2), estos 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 influidos por los factores ambientales y 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 de la PCR.

Los resultados de la determinación de la concentración más adecuada de ADN genómico mostraron que 5 ng en un volumen de 25 µL es suficiente, para que se produzca la amplificación del ADN a través de la reacción en cadena de la polimerasa; también que la concentración de 1 ng/25 µL 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 µL, donde la reacción en cadena de la polimerasa se inhibió totalmente, sin producir resultado alguno en los patrones de electroforesis.

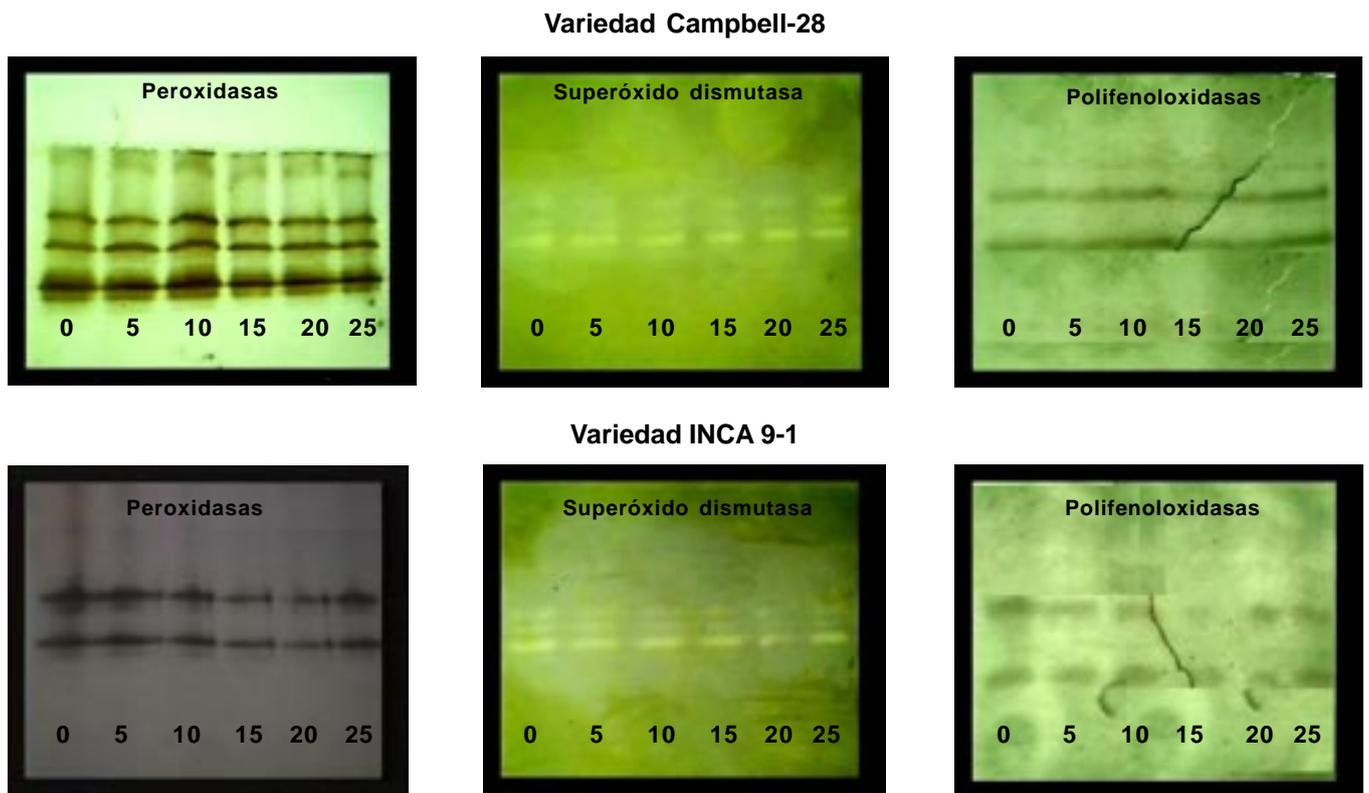


Figura 1a. Patrones electroforéticos obtenidos en los análisis isoenzimáticos en las variedades Campbell-28 e INCA 9-1

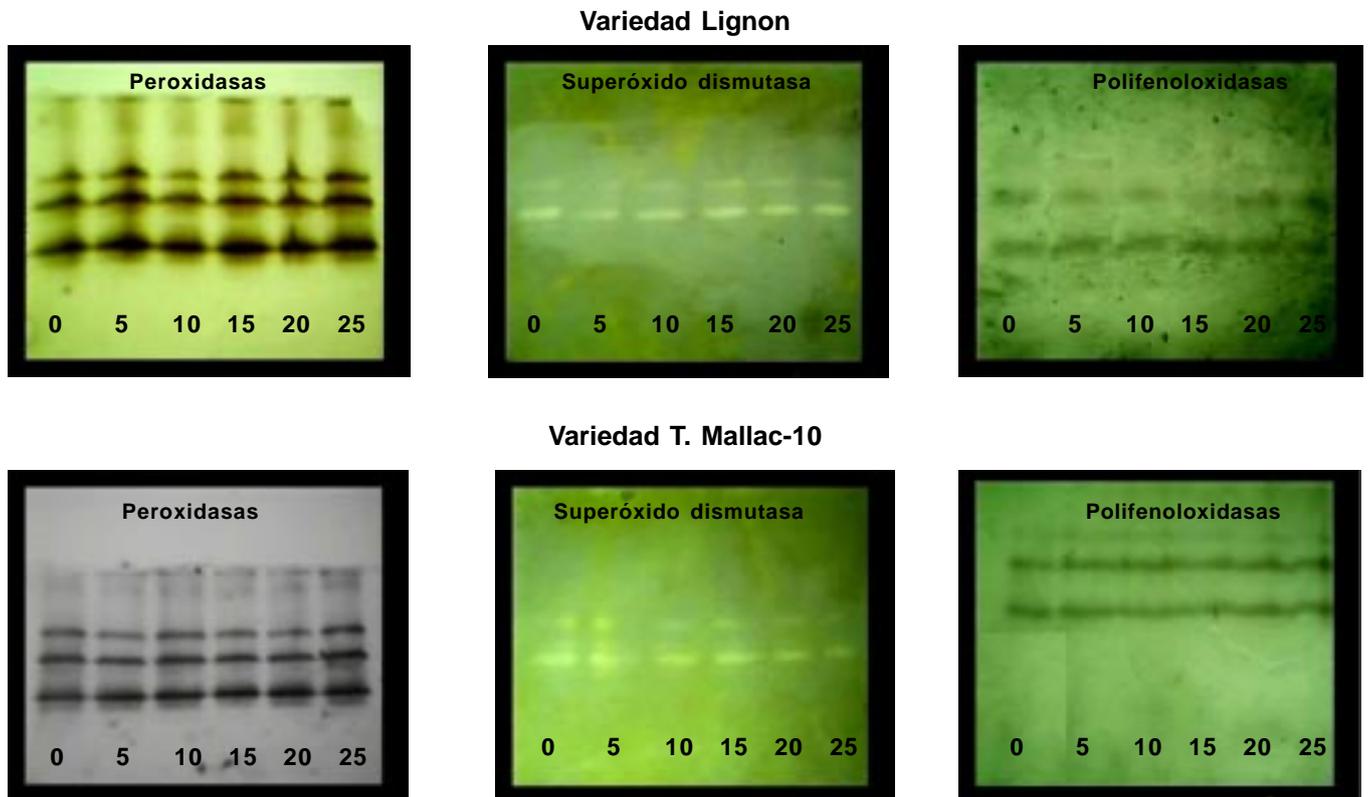


Figura 1b. Patrones electroforéticos obtenidos en los análisis isoenzimáticos en las variedades Lignon y T. Mallac-10

Estos resultados coinciden con otros publicados (22, 23), los cuales plantean que altas concentraciones de ADN genómico (mayor de 100 ng) bloquean la actividad de la enzima Taq ADN polimerasa, probablemente por la presencia de una mayor cantidad de contaminantes en la muestra y un excesivo número de moléculas de ADN en relación con 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 II). La funcionalidad de estos cebadores para detectar variación genética ha sido informada en el estudio de la diversidad genética en variedades cubanas de tomate (9) y las especies salvajes relacionadas así como explorando la variabilidad genética inducida por las radiaciones ionizantes (24).

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 (Figura 2 a y b, Tabla III), donde se agrupó la variabilidad detectada (3-14 %) con el marcador molecular 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 al estudiar el genoma de diferentes especies de plantas, procedentes de semillas tratadas con bajas dosis de radiaciones ionizantes (20).

Partiendo de estos resultados, sería importante señalar que el efecto estimulante de las bajas dosis de rayos X causó, probablemente, cambios fisiológicos y no genéticos, como señalan además los resultados publicados con anterioridad (10), que muestran la existencia de una zona de estimulación en la curva de radiosensibilidad de estas variedades, que conlleva a incrementos significativos en algunos indicadores fisiológicos de las plantas radioestimuladas, a partir de los cuales se seleccionaron las dosis empleadas en este trabajo y corroboran la existencia de algunas teorías de la radioestimulación vegetal (25, 26).

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 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.

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

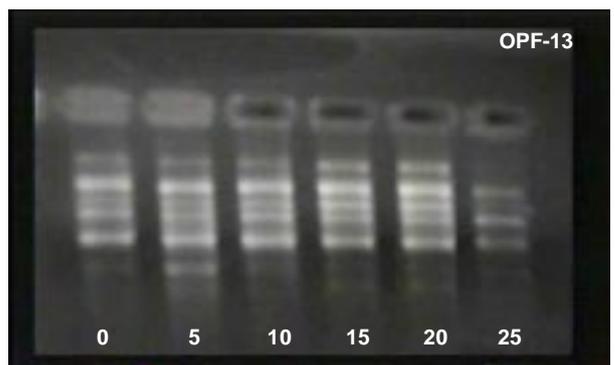
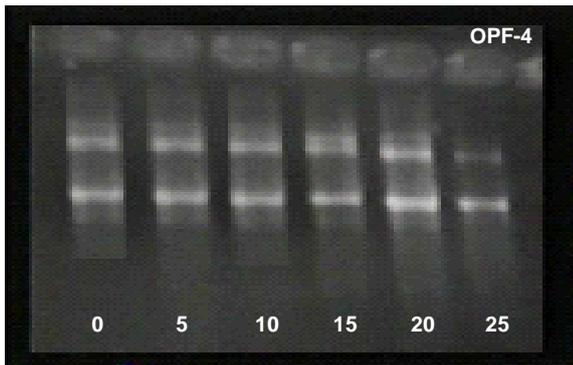
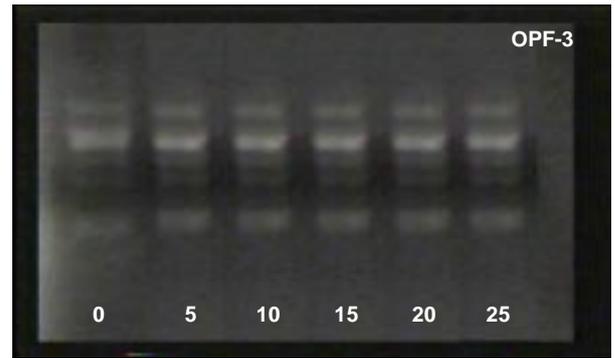
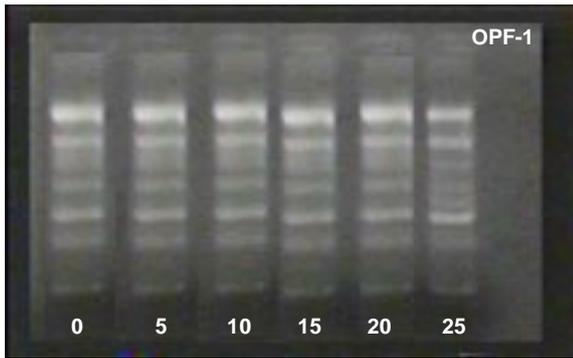
Cebador	INCA 9-1			T. Mallac-10			Lignon			Campbell -28		
	NBM	NBT	PM	NBM	NBT	PM	NBM	NBT	PM	NBM	NBT	PM
OPF-01	6	6	100	3	3	100	6	6	100	7	7	100
OPF-03	3	4	75	5	5	100	5	5	100	3	3	100
OPF-04	3	4	75	2	2	100	2	2	100	2	2	100
OPF-05	4	5	80	5	5	100	3	4	75	5	5	100
OPF-07	4	4	100	3	3	100	3	3	100	3	4	75
OPF-13	3	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 III. Número de bandas monomórficas y totales detectadas en las plantas, procedentes de los tratamientos irradiados

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

Variedad Campbell-28



Variedad INCA 9-1

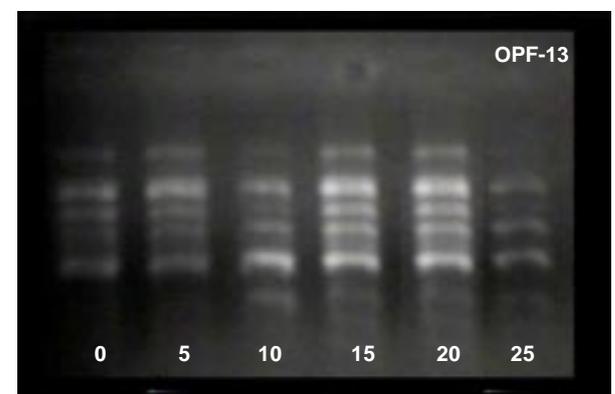
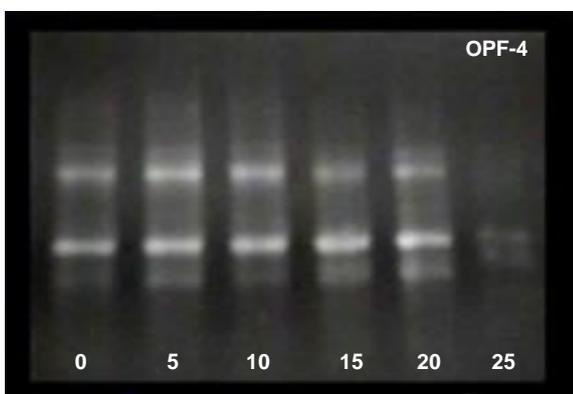
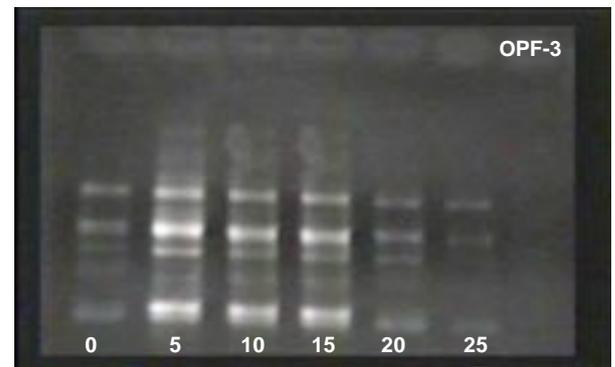
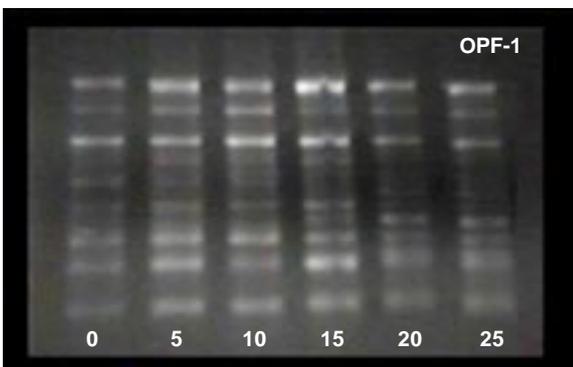
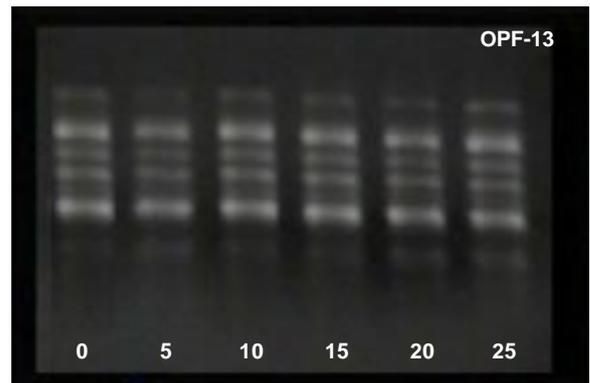
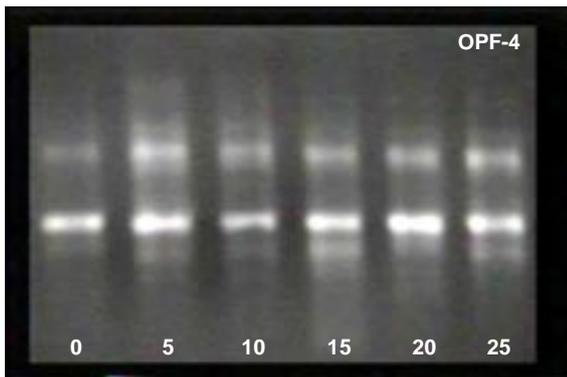
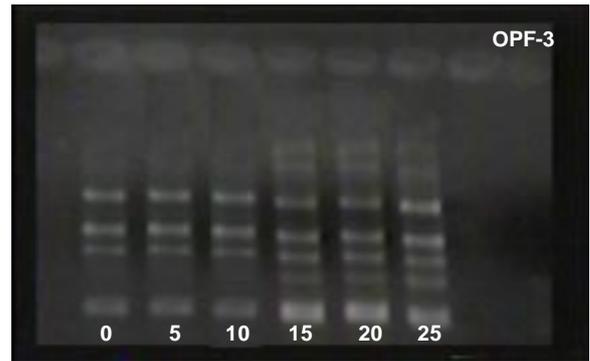
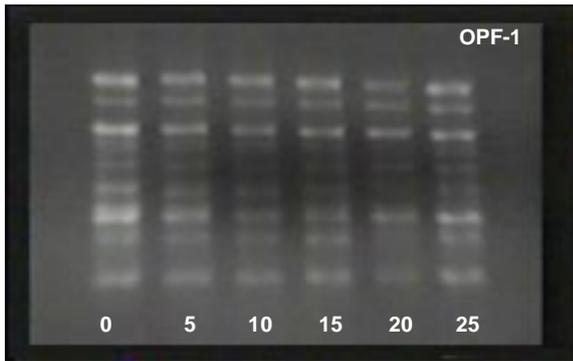


Figura 2a. Patrones electroforéticos obtenidos con el empleo del *RAPD*

Variedad Lignon



Variedad T. Mallac-10

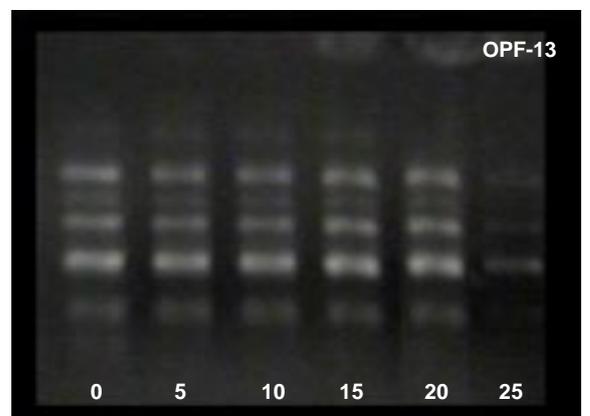
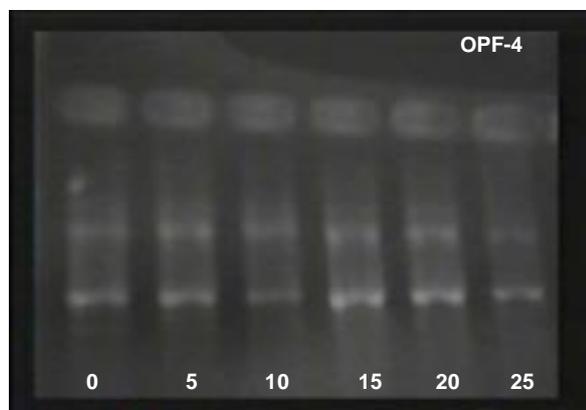
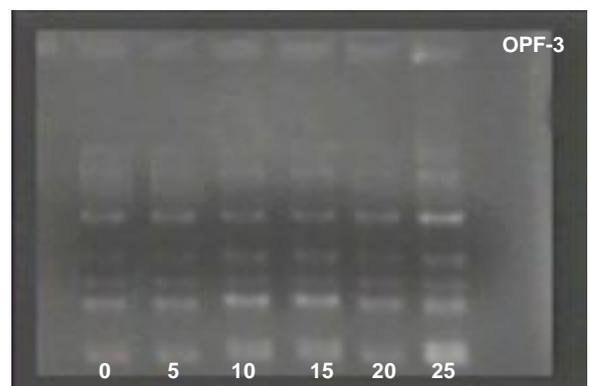
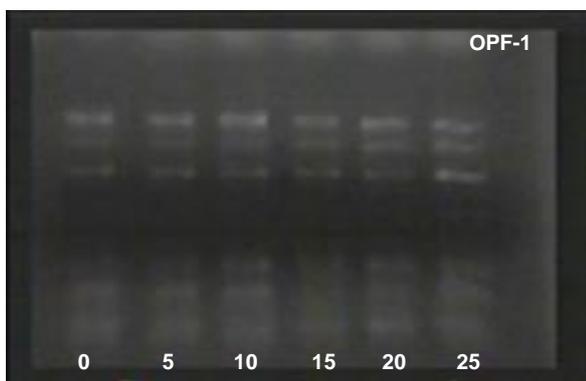


Figura 2b. Patrones electroforéticos obtenidos con el empleo del *RAPD*

CONCLUSIONES

- Se muestra la posibilidad de empleo de la técnica del ADN polimórfico 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 marcadores moleculares, capaces de abarcar una mayor parte del genoma y detectar un mayor grado de polimorfismo.

REFERENCIAS

1. Vasilevski, G. Perspectives of the application of biophysical methods in sustainable agriculture. *Bulg. J. Plant Physiol. Special Issue*, 2003, p. 179-186.
2. Shirley, B. W.; Hanley, S. y Goodman, H. M. Effect of ionizing radiation on plant genome. *Plant Cell*, 2003, vol. 4, no. 3, p. 333-347.
3. Soto, J. T. y Sañudo, A. M. Bajas dosis de radiación y respuestas adaptativas. *Rev. Nucleus*, 1998, vol. 24, p. 22-26.
4. Luckey, T. D. Radiobiology deceptions reject health. En: Proceedings of ICON 8788. VIII International Conference on Nuclear Engineering (8:2000 april 2-6: Baltimore).
5. González, L. M.; Ramírez, R. y Camejo, Y. Estimulación del crecimiento y desarrollo de plántulas de tomate del cultivar Santa Clara a los rayos gamma del ^{60}Co . *Alimentaria*, 2002, vol. 331, p. 67-70.
6. Llanes, S. Caracterización bioquímica de somaclones y mutantes de arroz (*Oryza sativa*, L.). [Tesis de Diploma]. Facultad de Biología, Universidad de La Habana. 2002. 47 h.
7. Cornide, M. T. /et al./ Marcadores moleculares. Nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. La Habana: Editorial Félix Varela, 2002. 366 p.
8. Chávez, L. y González, L. M. Aspectos generales sobre el uso de los marcadores moleculares en la evaluación de la diversidad y la mejora genética vegetal. *Alimentaria*, 2004, vol. 352, p. 119-126.
9. Peteira, B.; Fernández, E.; González-Chávez, M.; Shagarodsky, T. y Miranda, I. Aplicación de marcadores RAPD al estudio de la diversidad genética en variedades de tomate y especies salvajes relacionadas en Cuba. *Rev. Protección Vegetal*, 2001, vol. 16, no. 2-3, p. 84-91.
10. Ramírez, R.; González, L. M.; Camejo, Y.; Fernández, Y. y Zaldívar, N. Estudio de radiosensibilidad en plantas de tomate procedentes de semillas tratadas con bajas dosis de rayos X. *Cultivos Tropicales*, 2006, vol. 27, no. 1, p. 63-67.
11. Solórzano, E. A. Estudio de enzimas y proteínas de defensa en la interacción tomate vs tizón temprano (*Alternaria solani*). [Tesis de Grado]; CENSA-UNAH, 2002, 107 p.
12. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 73, p. 248-250.
13. Iglesias, L. Estudio de la variabilidad morfoagronómica y bioquímica en soya (*Glycine max*. L. Merrill). [Tesis de doctorado]; INCA, 1986. 85 p.
14. Guedes, M. y Rodríguez, C.I. Disc electrophoretic pattern of phenoloxidase from leaves of coffee cultivars. Sep. De Portugal. *Acta Biologica. Serie A.*, 1974, vol. 13, p. 169-177.
15. Arulzekar S. y Parfitt, D. E. Isozyme analysis procedures for stone fruits, almond, grape, walnut, pistachio and fig. *Hort Science*, 1986, vol. 21, no. 4, p. 928-933.
16. Dellaporta, S. L.; Wood, J. y Hichs, J. B. A plant molecular DNA miniprep, versión II. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1986, vol. 1, p. 19-21.
17. Oropeza, M.; Erick, A.; Marilyn, R. y Vargas, T. Establecimiento de un protocolo *RAPD* eficiente para plantas de ñame. *Agronomía Trop.*, 2006, vol. 56, no. 4, p. 601-606.
18. Florido, M.; Álvarez, M.; Lara, R. M.; Plana, D.; Valera, M.; Shagarodsky, T. y Moya, C. Caracterización morfoagronómica y bioquímica de 20 accesiones de tomate (*Lycopersicon spp*). *Cultivos Tropicales*, 2002, vol. 23, no. 4, p. 61-69.
19. Gogebashvili, M.; Pkhaladze, L. e Ivanishvili, N. The influence of gamma irradiation on the formation of the antigenetic structure of plant protein. *Radiation Studies*, 2002, vol. 10, no. 1, p. 12-17.
20. Palevina, I.; Gotlib, I. V.; Kudryashova, O. y Afanasiev, G. Genome stability after low level irradiation. *Radiation Biology and Radioecology*, 2004, vol. 36, no. 4, p. 546-560.
21. Jiménez, P. y Collada, P. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en programas de conservación. *Sistemas y Recursos Forestales*, 2000, vol. 2, p. 237-248.
22. Fitzwater, T. DNA and PCR Methods Archives. Consultado [5-5-2002]. Disponible en: <http://micro.nwfsc.noaa.gov/forums/>.
23. Kay, I. y Ron, A. PCR template concentration, at HYPERLINK. Consultado [5-5-2002]. Disponible en: <http://micro.nwfsc.noaa.gov/forums/>.
24. Mukandama, J. P.; Peteira, B. y González, M. C. Empleo de marcadores RAPD para el análisis de la variabilidad genética en genotipos de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill), *Cultivos Tropicales*, 2004, vol. 25, no. 3, p. 63-66.
25. Mortazavi, S. M.; Ikushima, T. y Mozdarani, H. An introduction to adaptive response. 2004.
26. Muckerheide, J. There has never been a time that the beneficial effects of low dose ionizing radiation were not known. *Review of Center for N*, 2004.

Recibido: 20 de noviembre de 2007

Aceptado: 22 de septiembre de 2008