

MAESTRÍA EN GENÉTICA VEGETAL  
Área Mejoramiento Genético  
UNR-INTA

Este trabajo ha sido presentado como requisito  
para la obtención del Grado Académico  
de

MAGÍSTER EN GENÉTICA VEGETAL

USO DE RADIACIÓN X COMO HERRAMIENTA PARA EL MEJORAMIENTO EN EL  
GÉNERO ORNAMENTAL *CALIBRACHOA* (SOLANACEAE)

Tesis  
De la Licenciada en Ciencias Naturales

PAULA BOLOGNA

**USO DE RADIACIÓN X COMO HERRAMIENTA PARA EL MEJORAMIENTO EN EL  
GÉNERO ORNAMENTAL *CALIBRACHOA* (SOLANACEAE)**

Tesis presentada por la Licenciada en Ciencias Naturales: PAULA BOLOGNA

Director de Tesis: Ing. Agr. (MSc) ALBERTO ROBERTO PRINA

Codirector de Tesis: Ing. Agr. (MSc) LAURA BULLRICH

Coordinador académico de Carrera: Ing. Agr. (Dra.) LILIANA PICARDI

Facultad de Ciencias Agrarias (Zaballa) – Universidad Nacional de Rosario.

2009

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo ha sido el fruto y la contribución de muchos...

En principio quisiera agradecer al aporte constante de conocimiento y experiencia que me han hecho mis directores, codirectores y profesores en esta temática. Segundo, a mis compañeros de trabajo por su ayuda desmedida y fortaleza que me han brindado desde siempre y a mis afectos y familia porque han sido mi fuente de apoyo en todo lo que me he propuesto.

A todos ellos GRACIAS.

“Un mundo sin mutación no podría continuar evolucionando y la Tierra estaría aún poblada por las formas más primitivas de vida”

*E Shuffling*

## ÍNDICE

<b>1. Introducción</b>	
Mutagénesis en el mejoramiento-breve historia .....	1
Mutagénesis en las plantas ornamentales .....	2
El género <i>Calibrachoa</i> .....	4
Objetivos: General y Específicos .....	7
Hipótesis de trabajo .....	7
<b>2. Materiales y Métodos</b>	
2.1 Dosimetría y estimación de la dosis letal media .....	8
2.2 Efectos de los rayos X en los brotes M1 .....	10
2.3 Tratamientos mutagénicos con rayos X .....	11
2.4 Caracterización de las mutantes	
2.4.1 Análisis fenotípico .....	13
2.4.2 Análisis genotípico .....	15
2.5 Evaluación de mutantes	
2.5.1 Capacidad de brotado .....	17
2.5.2 Floración en maceta y en cantero .....	18
<b>3. Resultados</b>	
3.1 Dosimetría y estimación de la dosis letal media .....	20
3.2 Efectos de los rayos X en los brotes M1 .....	21
3.3 Tratamientos mutagénicos con rayos X .....	25
3.4 Caracterización de las mutantes	
3.4.1 Análisis fenotípico .....	30
3.4.2 Análisis genotípico .....	39
3.5 Evaluación de mutantes	
3.5.1 Capacidad de brotado .....	41
3.5.2 Floración en maceta y en cantero .....	42
3.6 Anexo-Tablas de Resultados .....	44
<b>4. Discusión</b> .....	50

5.	<b>Conclusiones</b> .....	71
6.	<b>Apéndice I : Manejo del material</b> .....	73
7.	<b>Apéndice II : Mejoramiento por mutagénesis inducida</b> .....	74
8.	<b>Apéndice III : UPOV- INASE</b> .....	79
9.	<b>Bibliografía</b> .....	90

# USO DE RADIACIÓN X COMO HERRAMIENTA PARA EL MEJORAMIENTO EN EL GÉNERO ORNAMENTAL *CALIBRACHOA* (SOLANACEAE)

## Resumen

El trabajo de tesis se encuentra enmarcado dentro del programa de mejoramiento del género *Calibrachoa* que se lleva a cabo en el Instituto de Floricultura de INTA-Castelar para la obtención de plantas compactas adaptadas a las condiciones ambientales de Buenos Aires. El objetivo principal de este trabajo fue la evaluación de la radiación X como herramienta de mejora para generar variación en el género.

*Resultados y conclusiones:* La aplicación de dosis crecientes de radiación X en los meristemas (0, 15, 30 y 60 Gy) resultó efectiva para la estimación de la dosis letal media en 24 Gy. La aparición de malformaciones en hojas y flores y el estudio de la dinámica de desarrollo de los brotes M1 permitió evaluar los efectos de la irradiación en el clon seleccionado. La aplicación de la dosis fraccionada (8Gy/semana) resultó más efectiva para la inducción de mutantes que el tratamiento de dosis completa (24 Gy). En el primer caso se obtuvo un mayor número de brotes M1 y una mayor inducción de mutantes, hecho atribuido al fenómeno de “recuperación” que acontece en las intermitencias de cada evento de irradiación. Ambas metodologías produjeron una amplia gama de mutantes en color y forma de flor. En su gran mayoría los fenotipos obtenidos presentaron flores con variegación posicional, clonal y/o de genética inestable; lo cual hace suponer en esto último la presencia de elementos móviles. A su vez se detectó a partir del análisis de viabilidad del polen y de cruzamientos dirigidos, un genotipo mutante con 100 % de esterilidad. La caracterización morfométrica y colorimétrica de las mutantes permitió la selección de fenotipos con aptitud ornamental. Cabe mencionar en este trabajo la obtención de un fenotipo novedoso para el mercado florícola.

*Palabras claves:* radiación X, dosis letal media, brotes M1, aptitud ornamental.

# USE OF X RAY AS A TOOL IN THE BREEDING OF THE ORNAMENTAL *CALIBRACHOA* GENUS

## Abstract

This thesis belongs to the *Calibrachoa* breeding program of the Floriculture Institute (INTA-Castelar). The principal objective was to evaluate the mutagenic agent X rays as a tool for *Calibrachoa* breeding.

*Results and conclusions:* The application of increasing doses of X rays on the meristems (0, 15, 30 y 60 Gy) was effective to estimate in 24 Gy the Lethal Dose 50. Malformations in leaves and flowers and the study on the development on the axillary buds permitted the evaluation of X rays effects on the select clone. The split dose treatment was more effective than the acute dose treatment. We obtained the greater number of M1 axillary buds and the greater number of mutants with the split dose treatment. We supposed that in the split dose treatment is acting the phenomenon of “recuperation” on the interval events between radiations. Both methodologies produced a large spectrum on mutants for color and flower size. Phenotypes show flowers with positional and clonal variegation and unstable genetics with movil elements. We also detected a 100 % sterile mutant. The morphometric and colorimetric characterization were useful for the selection of some phenotypes and of a novel phenotype with ornamental aptitude for the floriculture market.

*Key Words:* X ray, lethal dose 50, M1 axillary bud, ornamental aptitude.



## GLOSARIO

**Aneuploidía:** Célula o individuo cuyo número de cromosómico difiere del número de cromosomas normal de la especie en uno o pocos de dichos cromosomas.

**Brote:** Término usual con que se designa el vástago en estado de desarrollo, a partir de la yema hasta que ha terminado su crecimiento.

**Clon:** Conjunto de células o individuos provenientes de un mismo origen por multiplicación vegetativa y por lo tanto se suponen genéticamente idénticos

**Compacidad:** Planta que presenta entrenudos cortos y ramificación desde la base.

**Dosis Letal Media (DLM):** Dosis de un agente a la cual la sobrevivencia de individuos o células resulta del 50 %.

**Efecto epigenético:** Efecto en la regulación de la actividad del gen mediado por un cambio reversible y heredable en la metilación o en la estructura de la cromatina sin alterar la secuencia de ADN.

**Generación M0:** Material experimental (por ejemplo: semillas, órganos vegetativos, tejidos cultivados *in vitro*) antes de la exposición a un mutágeno.

**Generación M1:** Material experimental correspondiente a la primera generación en que se realizó el tratamiento mutagénico.

**Generación M2:** Individuos derivados de la generación M1 obtenidos por autofecundación.

**Gray (Gy):** Nueva unidad de radiación equivalente a 100 rads.

**Mutación:** Cambio heredable en el material genético no causado por la recombinación o segregación.

**Mutación somática:** Cambio que se produce en el tejido diploide de una planta que son mantenidas por mitosis.

**MVD** (Mutant Varieties Database): Base de datos de la FAO/IAEA para las variedades mutantes.

<http://www-INFOCRIS.iaea.org/MDV/>

**Periclinal:** Tejido idiotípicamente diferente que se encuentra arreglado en capas concéntricas.

**Propagación vegetativa:** Tipo o modo de propagar las plantas a través del tejido somático.

**Quimera:** Órganos o tejidos con sectores somáticos de constituciones genéticas diferentes

**rad:** Unidad de dosis absorbida o dosis de radiación absorbida por gramo de tejido

(1R = 0.877 rad en aire, 1R = 0.95 o 0.96 rad en tejido vegetal).

**“Sport”:** Cambio o mutación espontánea que ocurre en baja frecuencia en la naturaleza.

**Sport family:** Familia de mutantes entre las la cual una de las característica se diferencia.

**Sector:** Área del tejido que se diferencia del entorno por tener un fenotipo es diferente.

**Selección Diplóntica:** Selección que ocurre por la competencia entre células genéticamente diferente en un tejido somático durante el desarrollo de la planta.

**Segmento nodal:** Segmento de tallo, generalmente explanto, que presentan por lo menos un nudo vegetativo.

**Teratogénico:** Relativo a la teratología o monstruosidad.

**Teratología:** Estudio de las anomalías y monstruosidades del organismo animal o vegetal.

**Variación:** Estado de la planta que muestra tejidos o partes vegetativas de distintos colores o de diversa constitución.

**WT** (*wild type*): Siglas en inglés que denotan al genotipo salvaje u original.

**Yema:** Rudimento de un vástago, que se forma habitualmente en la axila de las hojas y que suele estar protegido por una serie de catáfilos.

## 1. INTRODUCCIÓN

### Mutagénesis en el mejoramiento -breve historia-

Las bases experimentales para el uso de las radiaciones ionizantes como método de inducción de cambios genéticos (mutaciones) están dadas desde hace unos 80 años con los trabajos de Müller en *Drosophila* y de Stadler en plantas superiores (Prina, 1989). Su utilización en estudios de biología ha contribuido al progreso del conocimiento, especialmente en el área de la genética y la fisiología de los organismos procariotas y eucariotas; aportando gran cantidad de información y de material experimental. La técnica ha sido ampliamente utilizada como herramienta de apoyo para el mejoramiento vegetal. A fines de la década del treinta, Tollenar obtuvo en tabaco la primera mutante inducida que posteriormente se utilizó como cultivar comercial. La mutante era deficiente en clorofila con hojas claras y de mejor calidad que el cultivar original (Prina, 1993). Desde entonces se han obtenido numerosas variedades por mutagénesis inducida, registrándose en el año 1980 unas 225 mutantes inducidas y 1700 en el año 1995 (Maluszynski, 2001). Este número fue en aumento y en el último registro del año 2008 se habían inscripto alrededor de 3000 variedades, abarcando 175 especies de plantas, en 60 países.

China e India encabezan la lista de países con más logros obtenidos a través de esta técnica, seguidos por Japón, Rusia y Alemania (Maluszynski *et al.*, 1995). En la Argentina, el uso de mutaciones inducidas ha dado logros de importancia como la variedad de maní “Colorado Irradiado-INTA”, de mayor rendimiento y contenido de grasa; la variedad de limón “Eureka 22-INTA”, de superior calidad de frutos y rendimiento y la variedad de arroz “Puita-INTA-CL”, resistente a herbicidas del grupo de las imidazolinonas. Para este último caso, el alelo mutante del cultivar ha sido patentado en los Estados Unidos y en Europa, y está siendo utilizado en programas de mejoramiento en diversos países. Sin embargo a pesar de los logros mencionados, en Latinoamérica

la utilización de la técnica ha sido escasamente aprovechada. Actualmente existe un renovado interés por las técnicas de mutaciones inducidas a nivel mundial, hecho que se vio reflejado en el Congreso Internacional de Mutaciones en Plantas llevado a cabo en Viena (Austria) en agosto de 2008; en el que participaron más de 80 países, y alrededor de 300 trabajos presentados. Es menester mencionar que a partir de la década del 50 hasta mediados del 70, se realizaron numerosas investigaciones para mejorar el uso de la técnica de mutagénesis, aunque en los años sucesivos esto fue dejado de lado por el advenimiento de herramientas moleculares (Broertjes y van Harten, 1988). Recientemente en Latinoamérica se está abordando el desarrollo de este tema mediante el proyecto ARCAL (Acuerdo Regional de Cooperación para la promoción de la ciencia y la tecnología nuclear en América Latina y el Caribe) financiado por FAO/IAEA, en el que participan 13 países latinoamericanos y a nivel nacional a través de los proyectos institucionales de INTA (PMP 2009-2011) donde se propone también incrementar notablemente las investigaciones que involucran a las mutaciones inducidas, en el marco de los programas de mejoramiento en numerosos cultivos como arroz, trigo, cebada, álamo, cítricos, gramíneas forrajeras, girasol, colza, sorgo y plantas ornamentales.

#### Mutagénesis en plantas ornamentales

La técnica de inducción de mutantes también fue aplicada a los cultivos ornamentales desde los años 30s (van Harten, 2002). El tulipán fue el primer género ornamental en el que se obtuvo una variedad comercial mutante (“Faraday”). Dicha mutante obtenida por radiación X, presentaba una modificación en el color de flor y derivaba de la variedad comercial “Fantasy” (van Harten, 1998). A partir de allí numerosos cultivares fueron liberados directa o indirectamente a través del uso de mutágenos (van Harten, 2002). En la actualidad existen unos 600 cultivares comerciales para 41 especies ornamentales, en géneros como *Chrysanthemum*, *Alstroemeria*, *Dahlia*, *Bougainvillea*,

*Rosa, Achimenes, Begonia, Dianthus, Streptocarpus y Rhododendron* (Ahloowalia y Maluszynski, 2001; Maluszynski *et al.*, 2001; Schum, 2005; Datta y Chakrabarty, 2005).

La técnica de mutagénesis inducida en plantas ornamentales ha contribuido a la mejora de características morfológicas como el color de flor, arquitectura de planta, hábito de crecimiento (Shum y Preil, 1998); así como también ha estado vinculada a características fisiológicas tales como resistencia a patógenos, tiempo a floración, tolerancia a estrés hídrico, entre otras (Broertjes y Verboom, 1973). La técnica resulta muy útil para mejorar características particulares en variedades comerciales o en materiales en proceso avanzado de mejora, porque permite aprovechar un fondo genético de excelencia con la mejora en uno o en unos pocos caracteres (Broertjes, 1968). Por otra parte muchas de las variedades comerciales de plantas ornamentales son de propagación agámica, lo cual se presenta como una ventaja para dicha técnica permitiendo detectar, seleccionar y conservar los mutantes dentro de la generación mutante M1, acortando de esta manera el tiempo de mejora (Schum y Preil, 1998). En este aspecto, la obtención de combinaciones favorables inducidas por mutagénesis, sean interacciones inter o intragénicas, pueden mantenerse indefinidamente a través de este tipo de propagación. En relación a esto, es importante mencionar que generalmente este tipo de plantas son heterocigotas; por lo que cualquier cambio de alelo dominante a su estado recesivo se detecta en la primera generación vegetativa M1. También es importante destacar que debido a su condición heterocigota, las segregaciones por reproducción sexual resultan muy complejas y a veces la recuperación de un buen recombinante es difícil de obtener. A esto se le suman barreras de incompatibilidad reproductiva o niveles de ploidía alto del material (Broertjes, 1976). Otra ventaja es la forma de cultivo de las plantas ornamentales bajo invernáculo, lo que proporciona condiciones muy favorables para la selección de genotipos valiosos con requerimientos particulares.

### El género *Calibrachoa*

El género *Calibrachoa* pertenece a la familia Solanaceae. Fue descrita por La Llave y Lexarza en el año 1825 con la especie tipo *Calibrachoa procumbens* como género monotípico (Wijsman y de Jong, 1985). Por mucho tiempo fue considerada como sinónimo del género *Petunia* hasta que Wijsman y de Jong (1985) estudiando la taxonomía de *Petunia* diferenciaron 2 grupos por sus características morfológicas. Uno de los dos grupos presentó dos especies con 14 cromosomas y el otro grupo tres especies con 18 cromosomas. En 1990 Wijsman hace resurgir el nombre *Calibrachoa* y transfiere 15 especies de *Petunia* con características morfológicas similares a *P. parviflora* ( $2n=18$ ) al género *Calibrachoa*. Posteriormente 10 especies más se transfieren, con un total de 25 especies: *C. calicyna*, *C. caesia*, *C. dusenii*, *C. eglandulata*, *C. elegans*, *C. ericaefolia*, *C. excellens*, *C. hassleriana*, *C. heterophylla*, *C. humilis*, *C. linearis*, *C. linoides*, *C. macrodactylon*, *C. micrantha*, *C. ovalifolia*, *C. paranensis*, *C. parviflora*, *C. pygmaea*, *C. regnellii*, *C. repestis*, *C. sellowiana*, *C. sendtneriana*, *C. serrulata*, *C. spathulata*, *C. thymifolia* (Wijsman, 1990; Stehman, 1999; Stehman y Semir, 2005, 1997).

El centro de origen del género se encuentra en la región este de Sudamérica; región subtropical y templada, desde Minas Gerais de Brasil hasta Uruguay; con su máximo de abundancia en los estados de Santa Catarina y Rio Grande do Sul de Brasil (Wijsman y de Jong, 1985). Es un género exclusivamente sudamericano de distribución subtropical atlántica entre los paralelos 18° y 37°. En la Argentina se encuentran las especies *C. linearis*, *C. thymifolia*, *C. ovalifolia*, *C. humilis*, *C. excellens*, *C. caesia*, *C. missionica*, *C. pygmaea*, *C. parviflora*, *C. longistila* y *C. irgangii* (Stehman y Greppi, *en prensa*). El género se distribuye mayoritariamente en la región mesopotámica, principalmente en el nordeste y sur de Misiones y en el este de las provincias de Corrientes y Entre Ríos, con excepción de *C. parviflora* que se extiende hacia el oeste

y sur del país. Las especies son heliófilas y habitan en campos o bordes de selva con afloramientos rocosos o suelos litolíticos, arenosos y arcillosos (Greppi, cp)

El género presenta hábito subarborescente o herbáceo, corola infundibuliforme de simetría zigomorfa, prefloración conduplicada y anteras amarillas (Stehman, cp). La polinización es generalmente entomófila con floración en primavera-verano. El género presenta auto-incompatibilidad gametofítica a excepción de *Calibrachoa parviflora* (Tsukamoto *et al.*, 2002) y las especies se diferencian en 2 subgrupos según estudios de cruzamientos interespecíficos realizados por (Watanabe, 1997; Ando *et al.*, 2001). Las especies *C. parviflora* y *C. pygmaea* pertenecen al subgrupo 1 por compatibilidad en los cruzamientos y al subgrupo 2 todas las demás especies de *Calibrachoa*. Estudios en filogenia en *Petunia sensu* usando RFLP para ADN de cloroplastos también corroboran este aspecto reproductivo en el género (Ando *et al.*, 2005).

Con respecto al uso ornamental, el género *Calibrachoa* es uno de los géneros más novedosos en el mercado de plantas ornamentales. En el año 1992 la empresa japonesa Suntory Ltd. colocó en el mercado el primer cultivar de su serie llamada “Millon Bells”. Actualmente se encuentran en el mercado mundial 5 variedades “Millon Bells, MiniFamous, Callie, Superbells y Sunbells” (Suntary Ltd., Nils Klemm). El género es también conocido como “petunia salvaje”, “seaside petunia” o “Million Bells”; y compite junto a *Impatiens* y *Petunia* como planta en maceta. Habitualmente se las utiliza en arreglos florales colgantes tipo bold o en cantero. Es un género de propagación vegetativa, perenne y de durabilidad en los jardines; con un mantenimiento mínimo y bajos costos, ambos aspectos muy importantes en la producción ornamental.

Desde el año 1999 en el Instituto de Floricultura (IF, INTA-Castelar) se ha comenzado a trabajar en el mejoramiento de plantas nativas con potencial ornamental, primariamente dentro del proyecto INTA-JICA “Desarrollo de la Floricultura en la Argentina” (Suarez *et al.*, 2003) y luego a través de proyectos institucionales. El mejoramiento del género ha sido abordado por el IF a los

finés de obtener variedades adaptadas a las condiciones locales. Con ese propósito se han realizado viajes de exploración y recolección en las zonas de distribución y actualmente se mantiene una colección *in vivo* de 68 entradas en el que se encuentran individuos representantes de las 11 especies descritas para la Argentina. Por otro lado, se han realizado trabajos de domesticación, caracterización morfo-fenológica, propapagación *in vivo* e *in vitro*, cruzamientos, poliploidización, análisis de perfiles moleculares y ajustes en la metodología de transgénesis para el género (Facciuto *et al.*, 2009; Hagiwara *et al.*, 2002; Villanova *et al.*, 2009; Perez de la Torre *et al.*, 2009; Gennarelli *et al.*, 2009). En la actualidad algunos materiales en etapas avanzadas de mejora están siendo evaluados en establecimientos de productores a lo que se le suma la realización de ensayos a campo en distintos lugares del país para evaluar la *performance* en diferentes ambientes.

*Calibrachoa* es un género muy promisorio por su alta variabilidad de colores, sin embargo la demanda constante de nuevos materiales en el mercado florícola hace que se impongan nuevas estrategias de mejora para estos cultivos. Por ello, en este trabajo se propone al género *Calibrachoa*, como material experimental para realizar las primeras incursiones en la mejora a través de la inducción de mutantes. Para ello se cuenta con el apoyo que brinda el IF, en cuanto al conocimiento del género (aspectos taxonómicos, fisiológicos, genéticos) para un manejo apropiado del cultivo y el Instituto de Genética Edward A. Favret para la aplicación de los tratamientos y el aporte de experiencia y conocimientos en el manejo del material mutagenizado.



## Objetivos

### *General*

- Estudiar la radiación X como agente mutagénico con vistas a la mejora de plantas ornamentales de propagación vegetativa, y en particular en el género *Calibrachoa*.

### *Específicos*

- Estimar la dosis letal media (DLM) en un clon selecto de *Calibrachoa*.
- Analizar en el material de estudio los efectos de la irradiación.
- Determinar el tratamiento mutagénico más efectivo para la obtención de mutantes inducidas.
- Caracterizar los fenotipos mutantes teniendo en cuenta la morfometría, colorimetría, densitometría de flujo, viabilidad de polen y los cruzamientos dirigidos.
- Seleccionar clones mutantes con potencial ornamental.

## Hipótesis de trabajo

- A través de tratamientos con rayos X en *Calibrachoa* es posible obtener mutantes en características de la flor con potencial ornamental.

## 2. MATERIAL

El material elegido fue un híbrido del género *Calibrachoa*, seleccionado a partir de una generación de individuos obtenidos del cruzamiento realizado entre *C. excellens* (20030924 H1) y la variedad comercial “Callie Dark Blue” (Goldsmith) (Apéndice I). La selección del clon fue basada en características ornamentales tales como: porte de la planta, color y tamaño de la flor (Fig.1).

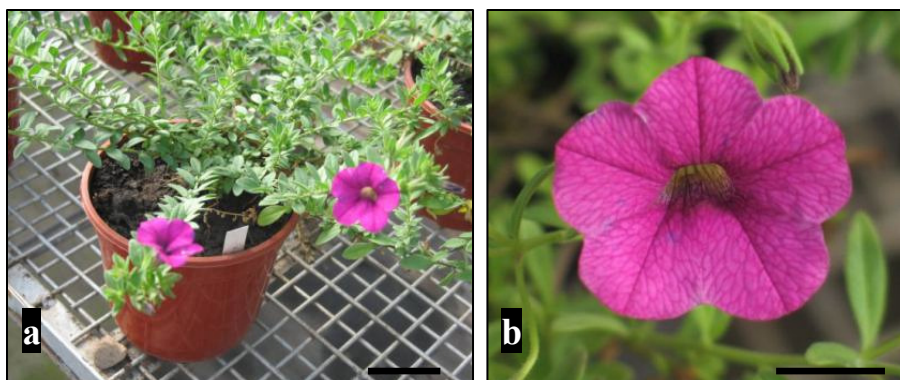


Figura 1. Planta de *Calibrachoa*. **a)** Planta en maceta, **b)** Detalle de la flor. **AUMENTO** = Barra 4 cm, 1 cm, respectivamente.

## 2. MÉTODOS

### 2.1 Dosimetría y estimación de la dosis letal media

Se cortaron segmentos nodales de 7 cm de longitud que contenían entre 10 a 12 nudos con hojas. Los segmentos fueron colocados en macetas de 9 cm de diámetro (maceta N° 9) con capacidad para 250 ml de sustrato. Se utilizó como sustrato una mezcla de vermiculita, perlita y turba en proporción 1:1:1 (v/v); y para homogeneizar el enraizado se usó hormona en polvo en la base de los segmentos –ácido indol-3-butírico (IBA), 250 ppm-. En la parte superior de las macetas llenas de sustrato, se colocaron tres láminas de papel metálico (diámetro 10 cm) con diez perforaciones en las cuales fueron introducidos los segmentos nodales. El objetivo de ello fue proteger las raíces del posible daño fisiológico producido por la irradiación (Fig. 2). El

cultivo se realizó en cámara de cría con temperatura mínima controlada ( $15 \pm 2^\circ \text{C}$ ) y en condiciones de alta humedad o *mist*. A las 4 semanas de cultivo, 30 segmentos nodales enraizados, se irradiaron con dosis de 0, 15, 30 y 60 Gy. Se utilizó como fuente de rayos X una máquina industrial perteneciente al Instituto de Genética E. A. Favret INTA-Castelar de 120 KW, 15 mA.



Figura 2. Segmentos nodales de *Calibrachoa* cultivados en cámara de cría, nótese el papel metálico (flecha).

El ápice de los segmentos fue removido luego de la irradiación a los fines de promover el crecimiento de los brotes axilares tal como cita Taiz y Zeiger (2002). Los segmentos nodales fueron transplantados individualmente a macetas N° 9 con un sustrato compuesto por hoja de pino, resaca de río y tierra en proporción 2:1:1 (v/v) (Apéndice I) y fueron cultivados en invernáculo con control de temperatura mínima ( $10 \pm 1^\circ \text{C}$ ). La estimación de la DLM se realizó a través de la sobrevida de los brotes M1 (brotes axilares desarrollados en el segmento nodal luego de la irradiación). Para ello se contabilizaron los brotes desarrollados en cada dosis y se utilizó la prueba de Chi-cuadrado para analizar la homogeneidad de las medias ( $\alpha = 0.05$ ).

## 2.2 Efecto de los rayos X en brotes M1

Se estudió el efecto deletéreo del agente mutagénico en el desarrollo de los brotes M1 a través de observaciones periódicas luego de la irradiación. Las hojas que dieron origen a los brotes M1 fueron numeradas en sentido horario descendente del 1 al 8 (Fig. 3). Los brotes considerados para este análisis fueron aquellos que presentaron una longitud de 5-7 cm, provenientes de cada hoja señalizada en el segmento nodal. Los mismos fueron cortados y cultivados en bandejas multicelda utilizando un sustrato compuesto por vermiculita, perlita y turba (1:1:1) y hormona de enraizamiento (IBA, 250 ppm) a los 18, 35, 45 y 55 días pos-irradiación. Los brotes fueron cultivados en cámara de cría, con la identificación del número de hoja de la cual provenían y la dosis de radiación aplicada.



Figura 3. Segmento nodal mostrando la codificación de las hojas.

Se consideró también la presencia de malformaciones en hojas, flores y tallos. A las 4 semanas de cultivo, los segmentos M1 enraizados fueron transplantados a maceta N° 9 y cultivados en invernáculo. En dichas plantas M1, se contabilizaron las malformaciones del tipo de fusión de hojas, hojas-tallos y flores en la etapa de plena floración (20 flores abiertas/planta). Los datos fueron analizados estadísticamente mediante contrastes utilizando un modelo lineal generalizado (MLG) para estudiar las diferencias entre las dosis ( $\alpha = 0.05$ ) (SAS versión 8).

### 2.3 Tratamientos mutagénicos con rayos X

Se utilizó una radiación de 24 Gy como dosis base en función de los resultados obtenidos en 2.1 y se definieron dos tratamientos mutagénicos que contemplan formas diferentes de aplicación de los rayos X (Apéndice II):

- ◆ *Tratamiento A* (1 aplicación de rayos X): 24 Gy en un solo evento (segmentos nodales, **n**= 400).
- ◆ *Tratamiento B* (3 aplicaciones de rayos X): 8 Gy en tres eventos o en intervalos cada siete días u 8 Gy/ semana (segmentos nodales, **n**= 444).

El número de segmentos nodales irradiados (**n**) se determinó teniendo en cuenta la factibilidad del manejo del material pos-irradiación y en función de los recursos humanos disponibles y lugar físico en el invernáculo para su cultivo. En la figura 4 se presentan las etapas de cultivo de los segmentos nodales antes y posterior a la realización de los tratamientos con rayos X.

El número de brotes M1 desarrollados en cada tratamiento fue analizado estadísticamente a través del test Mann-Whitey ( $\alpha = 0.05$ ) (SAS versión 6) y la identificación de las mutantes putativas se hizo en la etapa de plena floración de las plantas M1V1 (ver Glosario) (Fig. 4c). Durante dicha etapa, las ramas con flores de fenotipo diferente al WT (ver Glosario) fueron seccionadas y cultivadas según la metodología descrita en 2.1 para el cultivo de segmentos nodales. Cada rama o segmento M1V2 se identificó con el número de la planta M1V1 de origen y el tratamiento mutagénico del cual provenía (Apéndice II). Posterior a ello se evaluó la estabilidad del fenotipo en tres ciclos sucesivos de propagación vegetativa. El número de mutantes en cada tratamiento se analizó estadísticamente a través del test Kruskal-Wallis ( $\alpha = 0.05$ ) (SAS versión 6) y se realizó una clasificación preliminar de las mutantes en tres clases fenotípicas según características morfológicas

de flor. Se analizaron las diferencias en las frecuencias de los fenotipos mutantes encontrados en cada clase a través del test Kastembaum y Bowman (1970) para los dos tratamientos.



Figura 4. Etapas en el cultivo de los segmentos nodales de *Calibrachoa* durante el proceso de mutagénesis inducida por radiación X. **a)** Cultivo de segmentos nodales en cámara de cría, **b)** Numeración de las hojas, **c)** Cultivo de plantas M1V1 en invernáculo, **d)** Plantas M1V1 en plena floración.

## 2.4 Caracterización de las mutantes

Las mutantes derivadas de los tratamientos mutagénicos fueron comparadas fenotípicamente con el WT y agrupadas artificialmente en 5 grupos (A, B, C, D y E) según características relevantes de la flor (color, tamaño y forma). A partir de ello se determinaron también subgrupos dentro de cada grupo:

- Grupo A: mutantes en el color de la flor. Subgrupos A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>, A<sub>5</sub> y A<sub>6</sub>.
- Grupo B: mutantes en la forma y en el color de la flor. Subgrupos B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>.
- Grupo C: mutantes en la forma de la flor. Subgrupos C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>.
- Grupo D: mutantes de menor tamaño que la flor WT. Subgrupos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>.
- Grupo E: mutantes de mayor tamaño que la flor WT. Subgrupo E<sub>1</sub>.

Las mutantes de flor fueron analizadas feno y genotípicamente

### 2.4.1 Análisis fenotípico:

◇ **Morfometría:** Se midieron 9 caracteres en la corola de la flor; largo y ancho del tubo corolino, diámetro mayor y menor de la corola, largo y ancho de los lóbulos superiores (lób. 1 y lób. 2) y ancho de garganta (Fig. 5). La medición se realizó en 15 flores tomadas al azar de cada clon mutante y el WT, utilizando un calibre digital (Mitutoyo). Los resultados fueron analizados a través de un ANOVA para cada carácter medido y la diferencia entre medias en cada grupo de mutantes a través de una prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). Se realizó además un análisis multivariado de componentes principales para determinar la separación de los grupos según los caracteres analizados (Statistica versión 6).



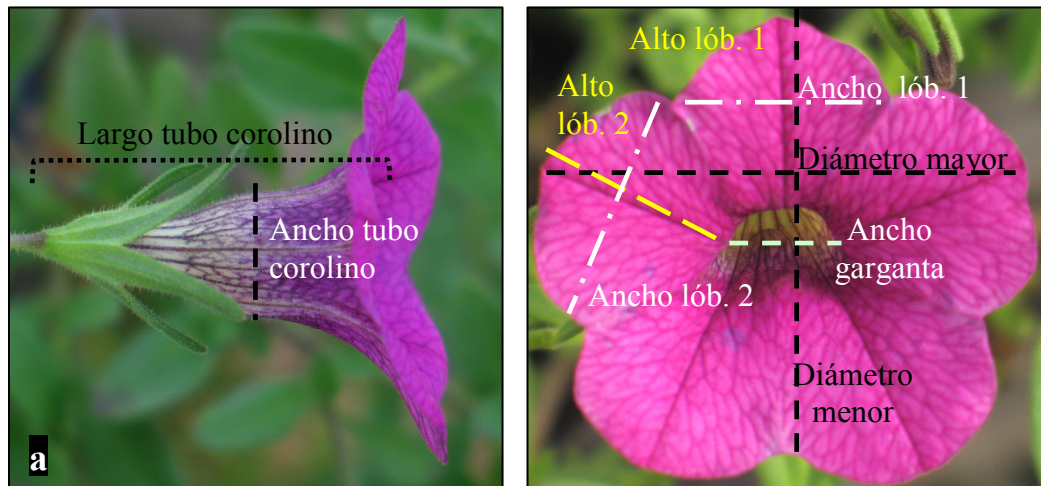


Figura 5. Medidas morfométricas en la flor de *Calibrachoa*. **a)** Largo del tubo corolino y ancho del tubo corolino, **b)** Diámetro mayor de la corola, diámetro menor de la corola, ancho de la garganta, alto del lóbulo 1, alto del lóbulo 2, ancho del lóbulo 1, ancho del lóbulo 2.

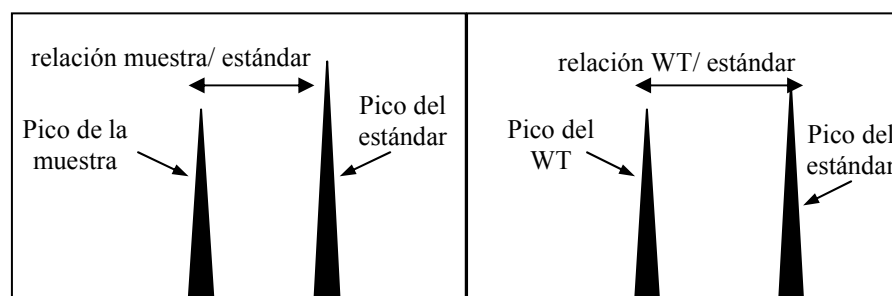
◇ Colorimetría: Se analizó el color de las flores mutantes y del WT a través de una carta de referencia de colores RHS (Royal Horticultural Society's Colour Chart). Se midieron además en diez flores tomadas al azar de cada fenotipo mutante y del WT, los valores de Hunter (1958); L, a y b; por lectura directa con un contador colorímetro (Minolta Chroma Meter CR-321). El valor L indica oscuridad o luminosidad del color y puede presentar valores de 0-100 (negro-blanco) y los valores a y b indican las direcciones del color. Los valores positivos de la coordenada a indican color rojo mientras que los negativos color verde y los valores positivos de b indican el amarillo y los negativos el color azul. Todas las mediciones se realizaron en la cara adaxial de la corola y los datos se analizaron estadísticamente a través de un análisis multivariado de componentes principales (Statistica versión 6).



#### 2.4.2 Análisis genotípico:

◇ Citometría de Flujo: Las plantas mutantes y el genotipo WT se analizaron a través de un densitómetro de flujo (Partec PA) para evaluar la posible presencia de genotipos aneuploides en los fenotipos mutantes obtenidos; para ello, también se utilizó un estándar interno *Hordeum vulgare* v. “New Golden”, según bibliografía citada para *Calibrachoa* (Mishiba *et al.*, 2000). Se utilizó como material vegetal hojas jóvenes en buen estado. Mediante una hoja de bisturí, se realizaron pequeños cortes en las hojas de forma transversal (chopeado) para la extracción en forma conjunta de los núcleos celulares de la muestra y del estándar, en una caja de Petri junto con 0.5 ml de buffer de extracción (0.1 M de ácido cítrico monohidratado y 0.5 % de tween 20). La suspensión fue filtrada a través de una malla de 50 µm, que selecciona partículas mayores al tamaño de los núcleos celulares; recolectándose la solución excedente en un tubo de hemólisis. A esta solución, se le adicionó 2 ml de buffer (0.4 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) con 4', 6-diamidina-2-fenilindol (DAPI, 4 mg/ml) e inmediatamente se realizó la medición en el densitómetro de flujo. Este aparato cuenta con una lámpara de mercurio; filtros KG1, BG38, UG1 que seleccionan la banda UV, un espejo dicróico, y un filtro barrera GG435 que colecta las bandas de fluorescencia del DAPI. Los picos de Intensidad Relativa de Fluorescencia (IRF) y los coeficientes de variación (CV) fueron recolectados por cada toma de datos y se calculó la relación muestra/estándar y la diferencia (**D**) según la fórmula:

$$D = \frac{(\text{relación muestra/estándar}) - (\text{relación WT/estándar})}{(\text{relación WT/estándar})} \times 100$$



Se analizó mediante un ANOVA la relación muestra/estándar para cada subgrupo de mutantes y el genotipo WT test de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) (Statistica versión 6) y la diferencia (**D**).

◇ Viabilidad del polen: Se analizó la viabilidad del polen en 9 fenotipos mutantes selectos, a través del método de Greissl (1989). Para ello se embebió polen fresco en una solución de sacarosa 0.5 M durante 15 minutos en un portaobjetos, luego se agregó una gota de diacetato de fluoresceína y ioduro de propidio dejándose actuar por 10 minutos y se observó el preparado en un microscopio de epifluorescencia (OLYMPUS BX 50) con la combinación de filtros de excitación-emisión de 330-385 nm y 420 nm, respectivamente. Los granos de polen de color verde intenso fueron considerados viables y los coloreados de rojo fueron considerados como inviables. Se analizaron al menos 300 granos de polen por fenotipo.

◇ Cruzamientos: Para el estudio de la autoincompatibilidad se realizaron cruzamientos controlados a los fines de determinar si la capa histogénica (L2) fue afectada (Tsukamoto *et al.*, 2002). Para ello, se realizaron auto-polinizaciones y diferentes combinaciones de cruzamientos. Las auto-polinizaciones se realizaron en los clones mutantes; en flores cerradas (pimpollo = 1,5 cm de largo) se colocó un ganchito de metal en la parte superior para evitar que la flor se abra y al cabo de dos días se sacudió el pimpollo para promover la polinización (Tsukamoto *et al.*, 2002) ( $n = 20$ ). Por otra parte, los cruzamientos dirigidos se realizaron en flores emasculadas en la última fase de pimpollo cuando todavía las anteras no estaban dehiscentes. La corola fue removida y se procedió a la polinización con polen fresco. Los cruzamientos fueron realizados entre las plantas mutantes y el WT y entre mutantes. Así mismo se realizaron cruzamientos entre las mutantes y un hermano entero del WT. Se utilizaron 6 flores por cada combinación de cruzamiento. Al cabo de 30 días, se contabilizó el número de frutos obtenidos, el porcentaje de fructificación y el número de semillas.

## 2.5 Evaluación de mutantes

A partir del análisis en 2.4 se seleccionaron mutantes con potencial ornamental y se evaluó la capacidad de brotado a través del número de brotes por segmento nodal en bandejas multicelda. Esta característica es de interés a los fines de seleccionar genotipos de arquitectura más compacta de forma temprana. También se evaluó la intensidad de floración a través del número de flores en dos condiciones de cultivo: en maceta y en cantero. Esta característica constituye uno de los principales objetivos de mejora en el género *Calibrachoa*, la selección de materiales de alta floración en cantero y/o en maceta.

### 2.5.1 Capacidad de brotado de segmentos nodales:

Se evaluó la capacidad de brotado en 10 mutantes en un contenedor de producción (bandeja multicelda, 30 x 50 cm). Los fenotipos mutantes elegidos pertenecen al subgrupo A1 -flores blancas con nervaduras-. Segmentos nodales de 7-8 cm de longitud fueron cortados de las plantas M1V3 y fueron cultivados en bandejas multiceldas. El sustrato utilizado para el cultivo fue una mezcla de vermiculita, perlita y turba en proporción 1:1:1 y se utilizó IBA (250 ppm) en su parte basal para homogeneizar el enraizado de los segmentos. El ápice de los segmentos fue removido para favorecer el crecimiento de los brotes axilares. El cultivo se realizó en cámara de cría con temperatura mínima controlada ( $15 \pm 2$  °C) y en condiciones de alta humedad o *mist*. Se evaluaron 27 segmentos por fenotipo. A los 30 días de cultivo se registró la capacidad de brotado a través del número de brotes axilares desarrollados que presentaban una longitud  $\geq 2$  cm. Se realizó un análisis estadístico con un MLG utilizando contrastes para estudiar diferencias entre las mutantes (SAS versión 8).

### 2.5.2 Floración en cantero y en maceta:

Tres mutantes con potencial ornamental fueron seleccionadas para este ensayo: la mutante 1 perteneciente al subgrupo C4 (flor de color fucsia) y las mutantes 2 y 3, pertenecientes al subgrupo A1 y A5 (flor blanca con nervaduras y flor violeta). Para ello, se recolectaron segmentos nodales de aproximadamente 7-8 cm de longitud de los materiales elegidos que fueron luego cultivados según la metodología de cultivo anteriormente descrita (ver 2.1). En la última etapa de cultivo, las plantas fueron ubicadas en invernáculo y al cabo de 60 días se colocaron en cantero o en maceta. Al comenzar el ensayo en las dos condiciones de cultivo, las plantas presentaban entre 4 a 5 ramas desarrolladas y sin flores abiertas.

**Cantero:** Se colocaron 10 plantas de cada mutante selecta en forma equidistante (distancia entre planta y planta = 40 cm) en un cantero a campo sin sombreado (irradiancia =  $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$ ,  $T_m = 14,5 \text{ }^\circ\text{C min}$  y  $35,9 \text{ }^\circ\text{C máx}$ ) protegido el suelo por un plástico negro o mulching con riego por cinta (Fig. 6a). Se aplicó semanalmente un producto comercial (Hakaphos rojo, N:P:K 18:18:18, 100 ppm) a través de riego por goteo para la fertilización de las plantas. Para el análisis de la floración se utilizó un cuadrante de metal (30 x 30 cm) como unidad de medida y se realizaron 3 tiradas de manera sucesiva en el cantero.

**Maceta:** Diez plantas de cada mutante fueron transplantadas a macetas de 16 cm de diámetro (Maceta N° 16) con un sustrato de pinocha, resaca y tierra en proporción 2:1:1 ubicadas aleatoriamente en el invernáculo (irradiancia =  $1200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$ ,  $T_m = 16,8 \text{ }^\circ\text{C min}$  y  $34,48 \text{ }^\circ\text{C máx}$ ) (Fig. 5b). El riego se realizó manual y se fertilizó semanalmente con un producto comercial al igual que el utilizado en cantero. Para la evaluación de la floración se eligieron cuatro plantas y cada planta representó la unidad de medida.

En ambas situaciones de cultivo se realizó el seguimiento de la floración a través de fotos seriadas cada 15 días (Canon PowerShot G6) contabilizándose el número de flores mediante el programa

*Image-tool*. Las flores consideradas para el análisis fueron las flores abiertas que no presentaban signos de senescencia. La primera toma de datos se realizó a los 7 días de comenzado el ensayo en el mes de octubre de 2008 y finalizó aproximadamente a los 150 días. Se utilizó como testigo de intensidad de floración un genotipo en proceso avanzado de mejora que presenta alto número de flores, cultivado conjuntamente con las mutantes seleccionadas para este ensayo.



Figura 6. Ensayo para evaluar intensidad de floración en cantero y en maceta de fenotipos mutantes selectos de *Calibrachoa*. **a)** Plantas en cantero, **b)** Plantas en invernáculo.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Dosimetría y estimación de la DLM

El número de brotes totales que se desarrollaron luego del ensayo de radiación con 0,15, 30 y 60 Gy; fue de 78, 156, 89 y 64, respectivamente. Las diferencias en el número de brotes desarrollados resultaron altamente significativas ( $p<0,0001$ ). En la figura 7a se presenta el porcentaje de brotes desarrollados en cada dosis y la disminución en el número de brotes con el aumento de la dosis; aspecto que también puede ser visualizado en la figura 7b. La estimación de la DLM resultó de 24 Gy tal como se observa en la figura 7a.

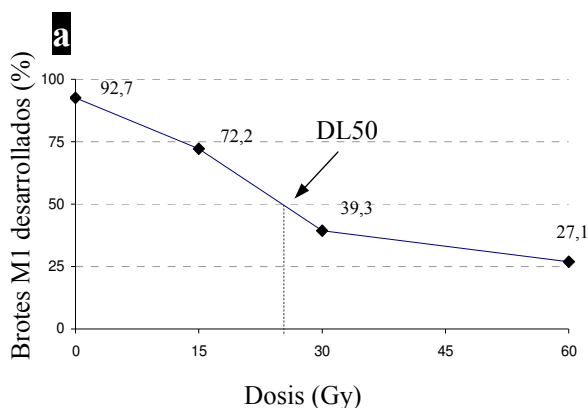


Figura 7. **a)** Brotos desarrollados (%) en los segmentos nodales del clon de *Calibrachoa*, tratados con 0, 15, 30 y 60 Gy de rayos X ( $\sim n=30$ ). La flecha indica la DLM=24 Gy, **b)** Efecto de la radiación X en el desarrollo de los brotes en los segmentos nodales.

### 3.2 Efectos de los rayos X en los brotes M1

En la figura 8 se presenta la dinámica de desarrollo de los brotes M1 en cada dosis de irradiación. El análisis se realizó a los 18, 35, 45 y 55 días pos-irradiación a través del seguimiento del número de brotes desarrollados en función de la posición de la hoja. Se observó un mayor número de brotes desarrollados en el control en comparación con cualquiera de las dosis de irradiación. En el control, las hojas apicales del segmento fueron las que mayor número de brotes desarrollaron y esto ocurrió a los 18 días; mientras que en las dosis de 15, 30 y 60 Gy, los brotes provenían mayoritariamente del sector medio y/o basal del segmento. A los 35 días, el control presentó mayor número de brotes desarrollados en las hojas del sector medio, mientras que para la dosis de 15 Gy resultó en el sector apical y el sector basal y para la dosis de 30 Gy en el sector basal. En la dosis de 60 Gy hubo escaso desarrollo de brotes. A los 45 días el mayor número de brotes se registró en el control, en el sector basal. En el resto de las dosis se observó un menor desarrollo en todas las posiciones, siendo a los 55 días el momento en que se registró un menor número de brotes en cada una de las dosis analizadas.

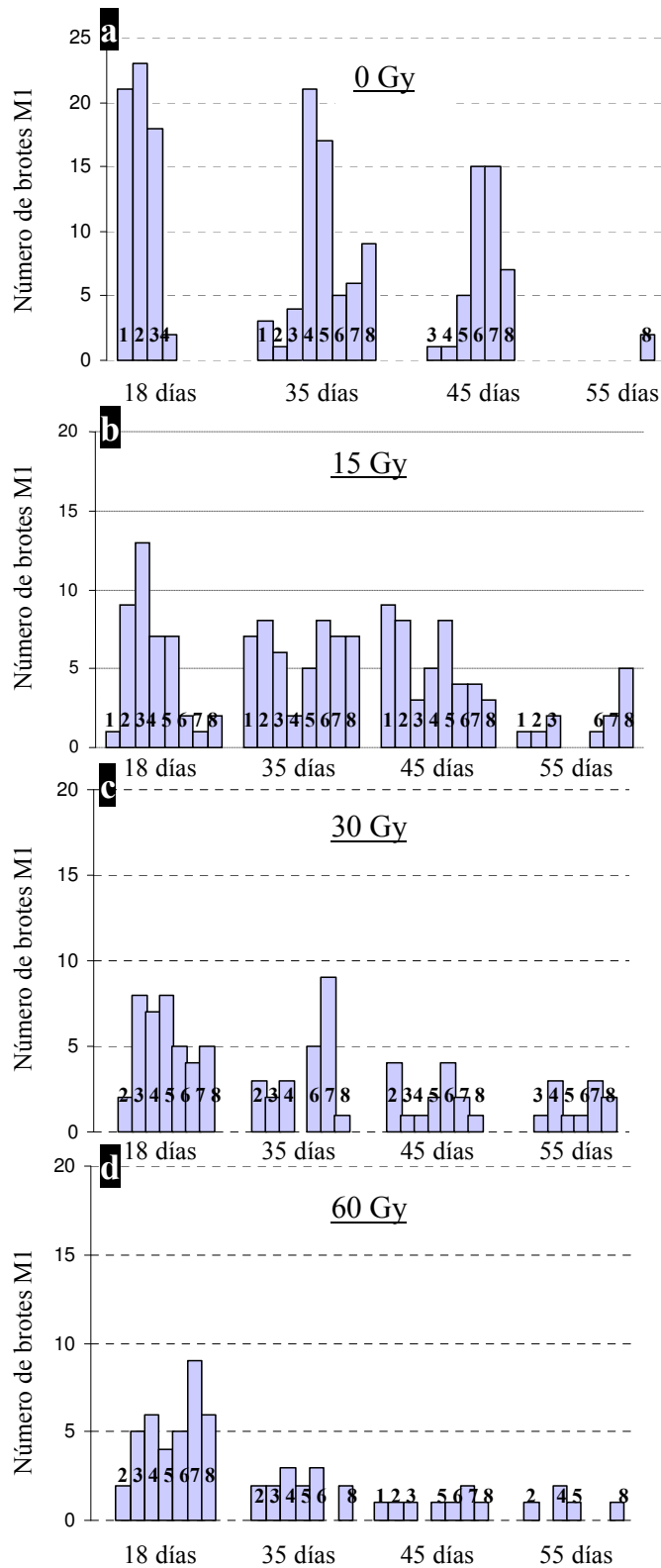


Figura 8. Número de brotes M1 desarrollados a los 18, 35, 45 y 55 días de evaluación pos-irradiación. **a)** control (0 Gy), **b)** 15 Gy, **c)** 30 Gy y **d)** 60 Gy. Los números de las columnas indican la posición del brote en el segmento nodal.



La evaluación del número total de brotes desarrollados (datos acumulados) por posición y por dosis de irradiación se presenta en la figura 9, en donde puede observarse que el control tuvo mayor o igual número de brotes acumulados en todas las posiciones; seguido por las dosis de 15, 30 y 60 Gy.

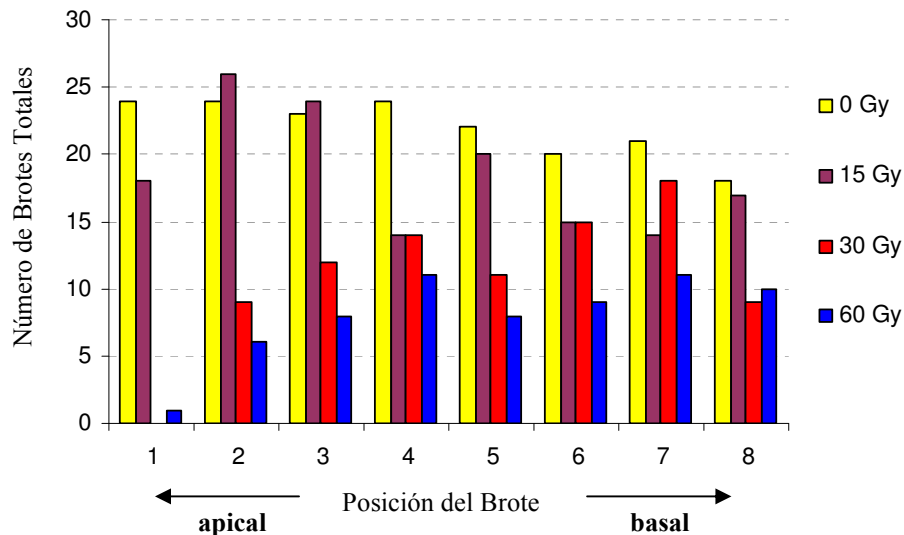


Figura 9. Número de brotes M1 acumulados, según la posición en el segmento nodal en las distintas dosis de rayos X (0, 15, 30 y 60 Gy).

En cuanto a los efectos letales producto de la irradiación X, se observaron necrosis en las axilas de las hojas donde se localiza el meristema de los brotes axilares, sectores *viridis* en los primordios de las hojas de los brotes M1 con superficies hundidas malformadas y malformaciones del tipo teratogénico en órganos como hojas y tallos (Fig. 10). En las flores también se presentaron órganos aberrantes (Fig. 11a) y algunas flores presentaron morfologías con un número anormal de piezas florales en pétalos, anteras y ovarios (Fig. 11b); aunque las flores sucesivas presentaron piezas de morfología normal o tipo WT.

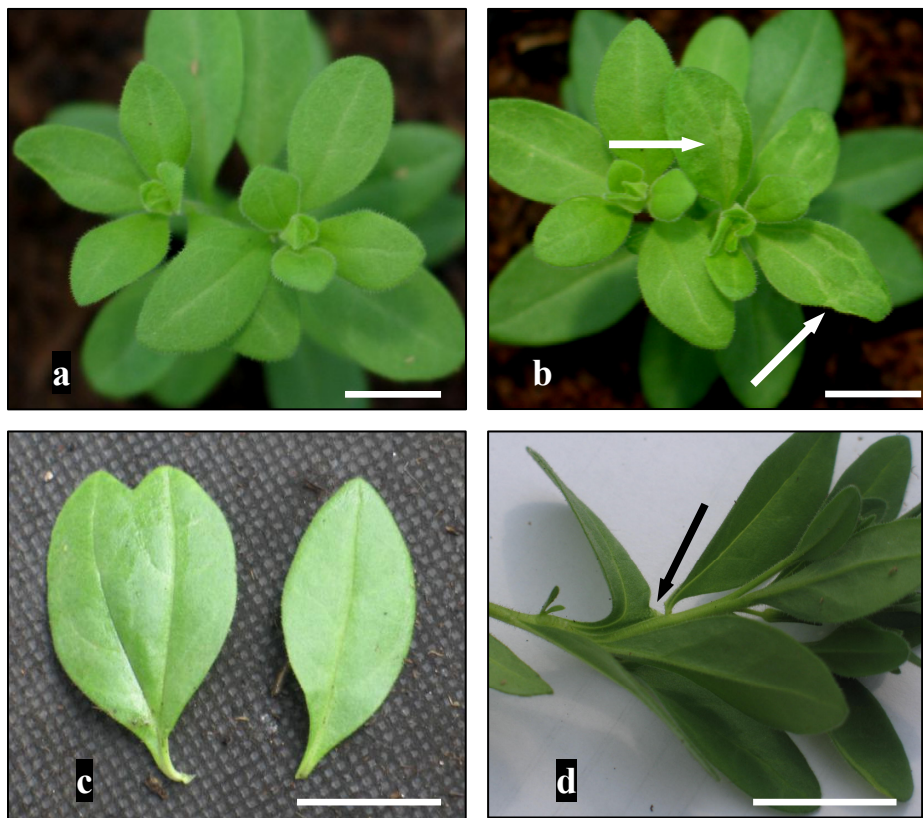


Figura 10. Malformaciones producidas por radiación X en *Calibrachoa*. **a)** Hojas de los brotes M0, **b)** Hojas de los brotes M1, nótese sectores *viridis* (flechas), **c)** Fusión de hojas en planta M1V1, **d)** Fusión de hojas al tallo en planta M1V1 (flecha). **Aumento:** Barra 1cm.

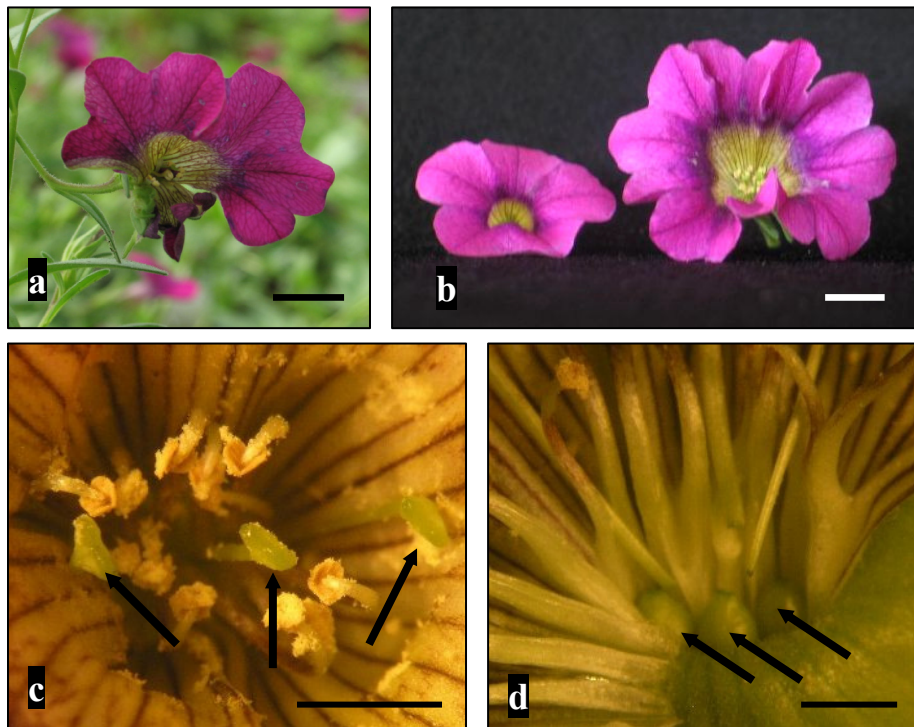


Figura 11. Efecto de la radiación X en flores de *Calibrachoa*. **a)** Flor anormal, **b)** flor WT (*izq.*) y flor de 12 lóbulos (*der.*). **Aumento:** Barra 1 cm; **c)** Detalle de la flor con tres estigmas (flechas) y **d)** Tres ovarios (flechas) con múltiples estambres. **Aumento:** Barra 0,5 cm

El número de malformaciones totales que se contabilizó para el control, 15, 30 y 60 Gy, resultó en 3, 11, 14 y 9, respectivamente (Fig. 12). Se encontraron diferencias significativas en el número de malformaciones obtenidas en cada dosis, cuando se comparó el control contra las dosis de 15 y 30 Gy ( $p<0.0206$ ,  $p<0.0131$ ), pero sin diferencias significativas con la dosis de 60 Gy.

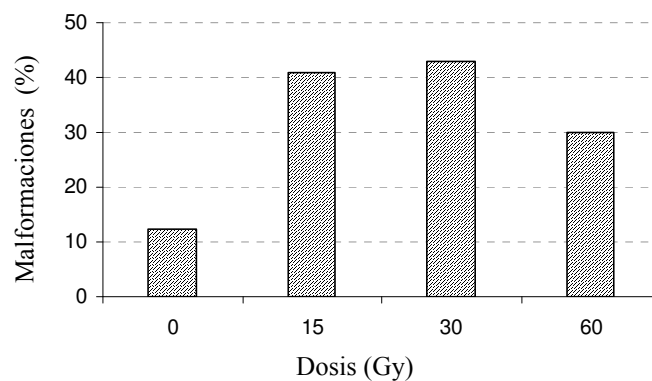


Figura 12. Malformaciones (%) en el clon de *Calibrachoa* en las dosis de irradiación a 0, 15, 30 y 60 Gy.

### 3.3 Tratamientos mutagénicos con rayos X

El número de brotes obtenidos luego de la aplicación de rayos X para el tratamiento de 1 aplicación (24 Gy) fue de 1151 y de 1523 para el tratamiento de 3 aplicaciones (8 Gy/semana) observándose diferencias significativas entre ellos (test Mann-Whitey;  $p<0,0274$ ) (Tabla 1). Ambos tratamientos posibilitaron el desarrollo aproximadamente de un 40 % de brotes M1 a partir de los brotes M0 tratados.

En la figura 13a se presenta el número total de brotes M1 obtenidos en función de la posición en el segmento nodal. Se observó que los valores mayores en el número de brotes se registraron en el

tratamiento de 3 aplicaciones para las posiciones más apicales del segmento; mientras que en el tratamiento de 1 aplicación el patrón fue diferente, encontrándose un menor número de brotes en las posiciones medias-basales.

En cuanto al número de mutantes obtenidas, ambos tratamientos produjeron mutantes putativas de flor. En la figura 13b se presenta el análisis según la posición del segmento. El mayor número de mutantes se obtuvo en el tratamiento B, principalmente en las hojas superiores o apicales.

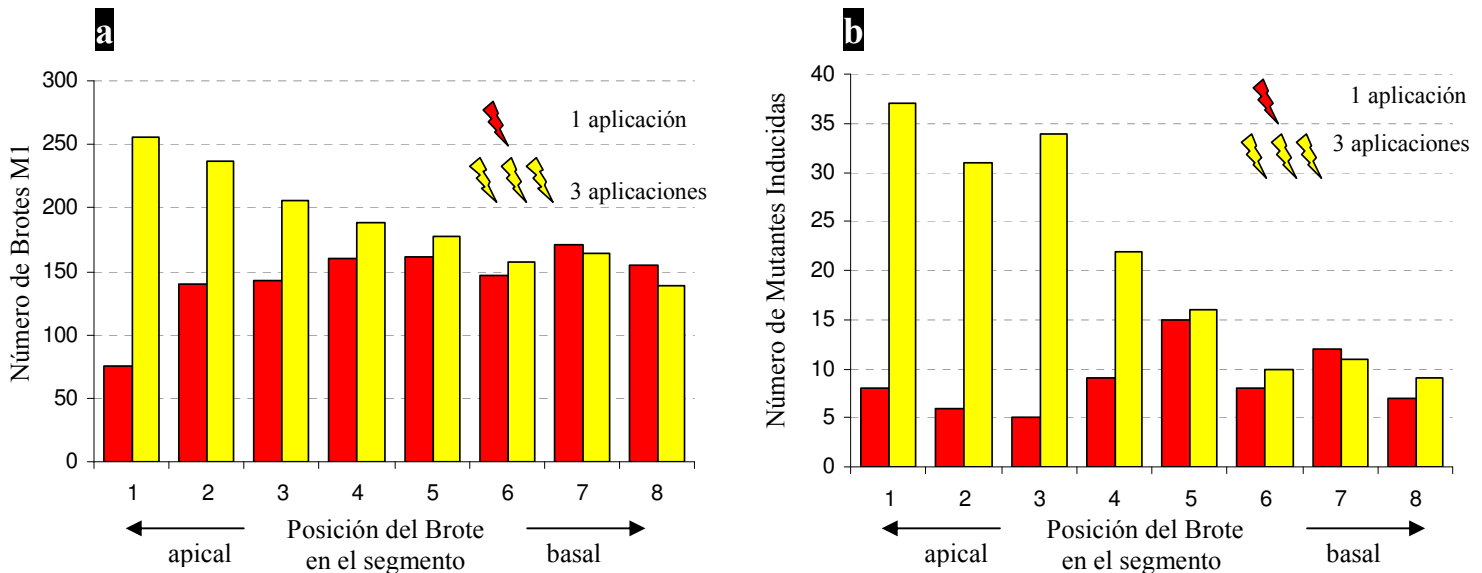


Figura 13. **a)** Número de brotes M1 desarrollados según la posición en el segmento nodal en el tratamiento de 1 aplicación y 3 aplicaciones de irradiación X, **b)** Número de mutantes de flor inducidas y derivadas de los tratamientos de irradiación de 1 y de 3 aplicaciones, según la posición en el segmento nodal.

En la evaluación de las plantas M1V1 en el periodo de floración se detectaron variaciones morfológicas en las flores, en algunas ramas de estas plantas (Fig. 14). Las plantas que presentaron ramas con flores fenotípicamente diferentes al WT fueron quiméricas para los fenotipos encontrados, con un total de 169 plantas M1V1 quiméricas.



Figura 14. Plantas M1V1 quiméricas para el color de flor en *Calibrachoa*. Las flechas indican las ramas de fenotipo diferente al WT. **Aumento:** Barra 4 cm.

Dichas mutantes de flor se clasificaron en tres categorías de acuerdo a los cambios conspicuos en el color, en la forma o en ambas características (Tabla 2). Con respecto al color, las corolas de las mutantes resultaron ser violeta, rosa o blanco (Fig.15). Las mutantes de forma presentaron morfologías de corola diferentes al WT como se muestra en la figura 16; y las mutantes de color y forma presentaron flores variegadas y corola tipo “estrella” (Fig. 17).

En la tabla 2 se presentan las frecuencias de aparición de las mutantes en las tres categorías mencionadas. La cantidad de mutantes fue significativamente menor ( $p < 0,001$ ) en el tratamiento A (1 aplicación) que en el tratamiento B (3 aplicaciones) según el test Kastembaum y Bowman (1970).





Figura 15. Flores de *Calibrachoa* (vista de frente). **a)** WT; **b), c)** y **d)** Mutantes de color. **Aumento:** Barra 1 cm.



Figura 16. **a), b), c), d)** Flores de *Calibrachoa* mutantes de forma. **Aumento:** Barra 1cm.

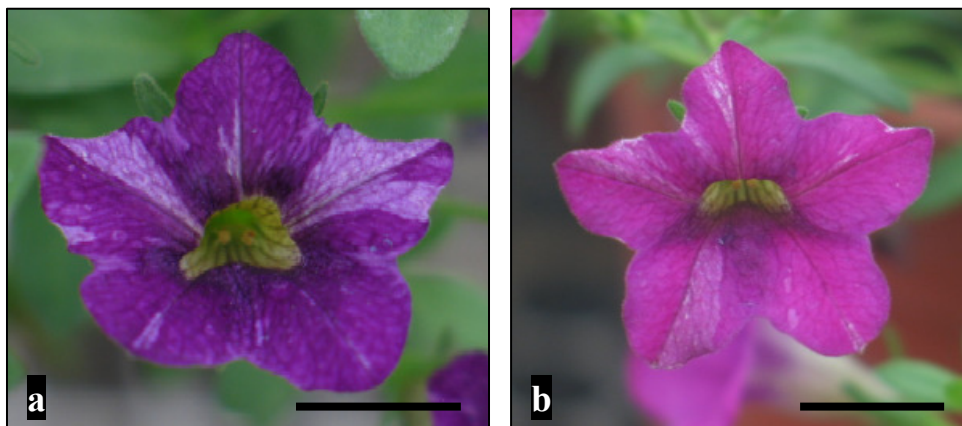


Figura 17. **a)**, **b)** Flores de *Calibrachoa* mutantes de color y forma. **Aumento:** Barra 1 cm.

La propagación agámica y sucesiva de estos sectores mutantes a partir de las plantas M1V1 (3 propagaciones vegetativas) permitió observar que las mismas mantuvieron su fenotipo en el 96 % de los casos. Sólo el 4% revirtió al WT en la generación M1V2.

#### 3.4 Caracterización de las mutantes

Las mutantes de los grupos y subgrupos detalladas en 2.4 fueron caracterizadas a través del tamaño y color de flor, presencia de genotipos aneuploides, viabilidad del polen y capacidad reproductiva de la parte femenina. A continuación se describen los análisis realizados.

### 3.4.1 Análisis fenotípico

Morfometría: Los 9 caracteres que fueron medidos en la corola se utilizaron para realizar un análisis exploratorio de componentes principales para los 5 grupos de mutantes especificados y para el fenotipo WT (Fig. 18). Este análisis se realizó en base a la matriz de correlación de las variables: largo y ancho del tubo corolino, diámetro mayor y menor de la corola, ancho de la garganta, largo y ancho del lóbulo 1 y 2. Dicho análisis reveló que el 95,73 % del total de la variación se encontró representada por las primeras dos componentes (Tabla 3). La componente principal 1 (CP1) describió los caracteres: diámetro de la corola (mayor y menor) y alto-ancho del lóbulo 1 y 2; y la componente principal 2 (CP2) describió el carácter ancho de la garganta.

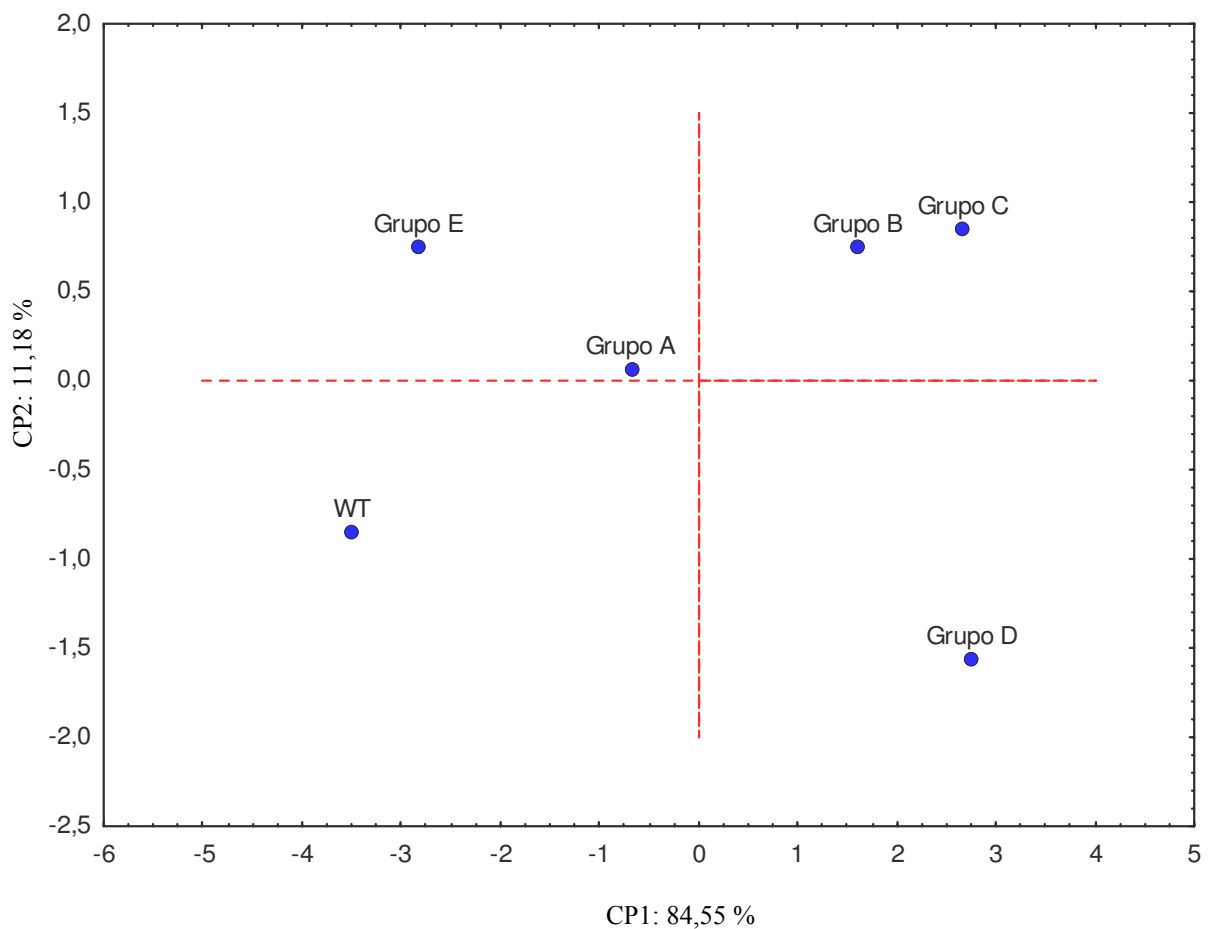


Figura 18. Diagrama de componentes principales basado en las medidas morfométricas de corola para los grupos mutantes (A, B, C, D, E) y el WT.



En la figura 19 se presenta cada carácter de la corola para cada grupo mutante y el WT. Como puede observarse, el carácter largo del tubo corolino fue similar en el grupo mutante E y el genotipo WT, aunque esto no resultó en los demás grupos mutantes los cuales presentaron valores significativamente menores que el WT. El carácter diámetro mayor y menor de la corola presentó un comportamiento similar en ambos caracteres en cuanto a su significancia para los genotipos analizados, siendo los grupos mutantes A, B, C y D los que tuvieron valores significativamente menores que el WT con la excepción del grupo E. En cuanto al carácter largo del lóbulo 2, los grupos que se asemejaron más al genotipo WT fueron los grupos A y E, mientras que el resto presentó valores menores. Las medidas de los subgrupos mutantes para los 9 caracteres medidos se detallan en la tabla 4.

Colorimetría: Los valores de Hunter (L, a y b) para color de flor se analizaron a través de un análisis de componentes principales. Dicho análisis se realizó para el grupo A con los subgrupos mutantes A1, A2, A3, A4, A5, A6; el grupo B con los subgrupos B1, B2 y los grupos C, D y E (Fig. 20a, b, c). En la figura 20a se presenta el análisis del Grupo A con un 95,51 % del total de variación explicada por las componentes 1 y 2. La CP1 especificó los tres valores de Hunter y la CP2 sólo intensidad del color rojo (Tabla 5). El Grupo B presentó un 88,5 % de la variación explicada por la CP1 para luminosidad e intensidad del rojo, y la CP2 para intensidad del amarillo (Fig. 20b). En la figura 20c se presentan los grupos C, D y E, con una variación del 88,49 %, explicadas por las CP1 y CP2.

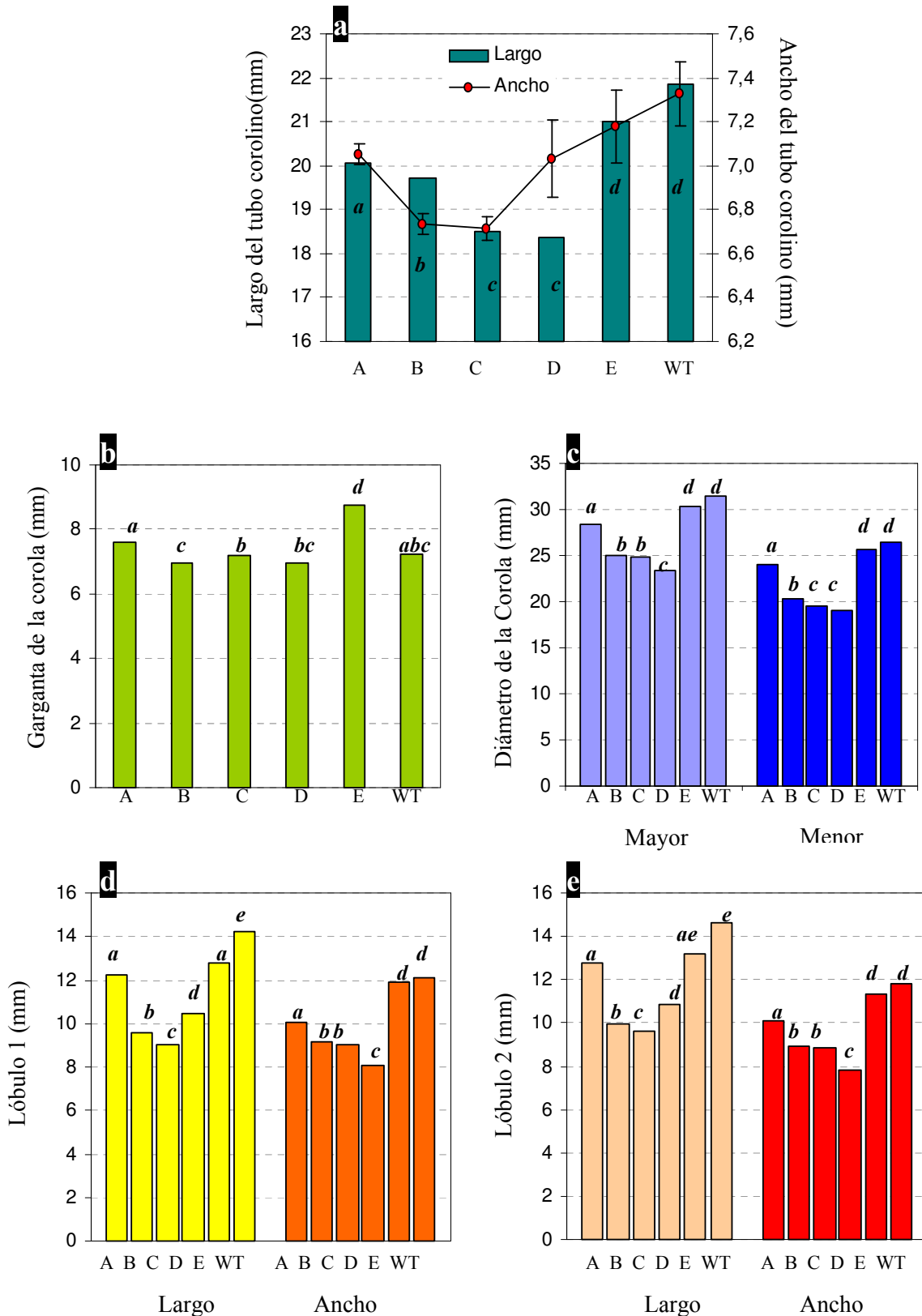


Figura 19. Caracteres morfométricos de la corola de la flor para los grupos mutantes A, B, C, D y E, y del fenotipo WT. **a)** Carácter largo y ancho del tubo corolino, **b)** Carácter ancho de la garganta de la flor, **c)** Carácter diámetro mayor y menor de la corola, **d)** y **e)** Caracteres largo y ancho de los lóbulos 1 y 2 de la corola. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos mutantes A, B, C, D, E y el WT (test Tukey,  $p < 0,001$ ).

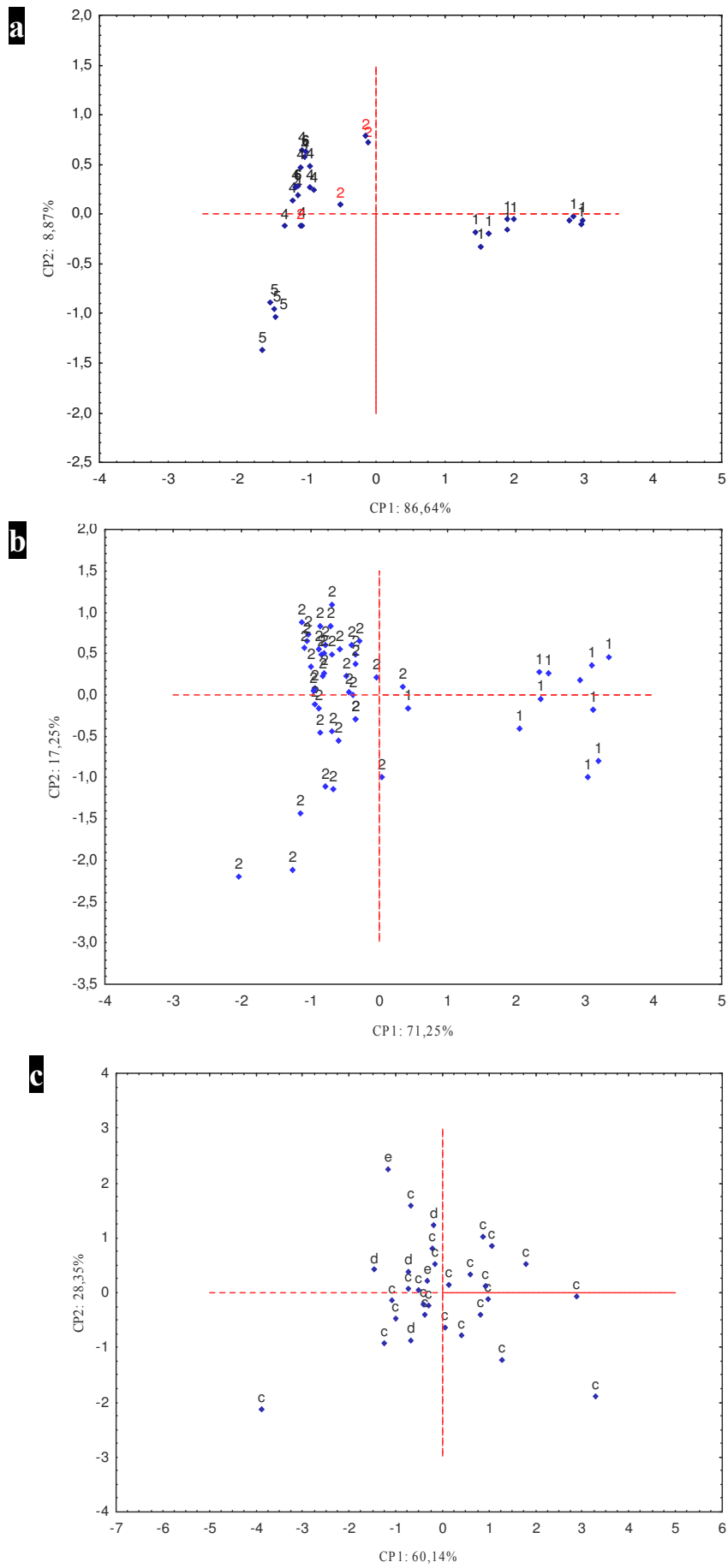


Figura 20. Diagrama de Componentes Principales basado en el color de flor por el sistema Hunter. **a)** Distribución de los subgrupos A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>, A<sub>5</sub> y A<sub>6</sub>, **b)** Distribución de los subgrupos B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>, **c)** Distribución de los Grupos C, D y E.

En la tabla 6 se describen y se agrupan los fenotipos mutantes según las características ornamentales más relevantes, y en la tabla 7 se detalla el número de mutantes derivadas en cada tratamiento mutagénico.

*Grupo A: Mutantes en el color de la flor*

Subgrupo A<sub>1</sub>: En este fenotipo se presenta un patrón de dibujo simétrico en la corola de la flor (Fig. 21a). El mismo se evidencia a través de la coloración o pigmentación del mesófilo que rodea a las nervaduras (Fig. 21b) en el sector central del lóbulo, mientras que en la unión entre lóbulo y lóbulo no hay pigmentación y por tanto no hay nervaduras marcadas.

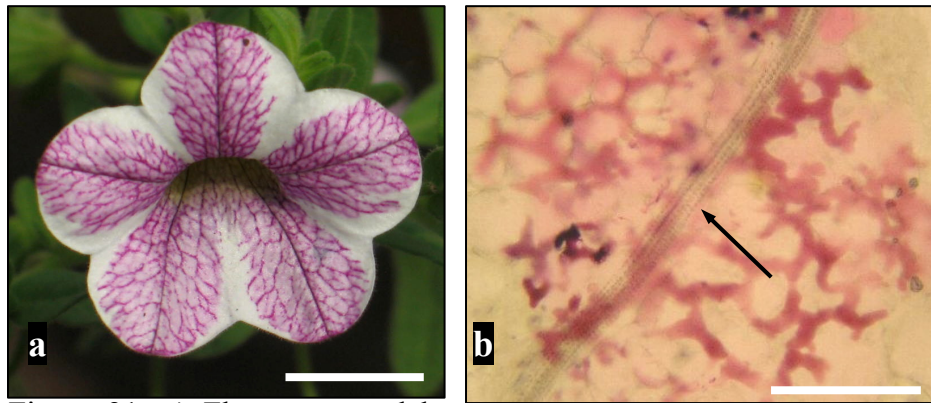


Figura 21. **a)** Flor mutante del subgrupo A<sub>1</sub> **Aumento:** Barra 1cm, **b)** Detalle del mesófilo pigmentado y el haz vascular (flecha). **Aumento:** Barra 10  $\mu$ m

También en este subgrupo se evidenciaron flores con sectores de color WT y flores con sectores completamente albinos (Fig. 22).



Figura 22. Flores del subgrupo A<sub>1</sub>. **a)** sectores WT (flechas), **b)** lóbulos albinos (flecha). **Aumento:** Barra 1 cm.

Subgrupo A<sub>2</sub>: El fenotipo de este subgrupo de corola rosada presentó un patrón de nervaduras muy similar al descrito en el subgrupo A<sub>1</sub> (Fig. 23).



Figura 23. Flor del subgrupo A<sub>2</sub>. **a)** vista adaxial, **b)** vista abaxial. Nótese las nervaduras pigmentadas (flecha). **Aumento:** Barra 1cm.

Subgrupo A<sub>3</sub>: Las flores de este fenotipo presentaron sectores albinos de diverso tamaño localizados de manera aleatoria en el limbo de la corola. Particularmente los sectores que abarcaron mayor superficie de corola evidenciaron según el sector comprometido, el patrón de nervaduras descrito en el tipo A<sub>1</sub> (Fig. 24c, d).



Figura 24. Flores del subgrupo A<sub>3</sub>. **a)** y **b)** sectores menores dispersos en el limbo de la corola, **c)** sector mayor en la zona del patrón de las nervaduras pigmentadas, **d)** sector mayor entre el borde de un lóbulo y el otro, nótese parte del patrón de nervaduras (flecha). **Aumento:** Barra 1cm.

Subgrupo A<sub>4</sub>: El fenotipo característico de este subgrupo presentó zonas heterogéneas en intensidad de color en el limbo de la corola. Dichas zonas presentaron bordes difusos sin una posición definida, dando un aspecto de “flor desteñida” o “senescente” (Fig. 25).

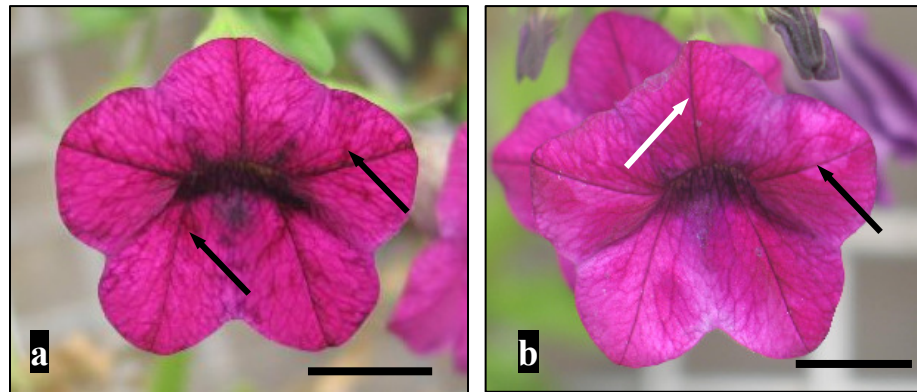


Figura 25. Flores del subgrupo A<sub>4</sub>. **a)** zonas de color fucsia intenso (flechas), **b)** zonas de color fucsia pálido (flecha negra) y zonas de color WT (flecha blanca). **Aumento:** Barra 1 cm.

Subgrupo A<sub>5</sub> y A<sub>6</sub>: Las flores para estos subgrupos presentaron colores homogéneos en toda la corola; violeta para el subgrupo A<sub>5</sub> y fucsia intenso para el subgrupo A<sub>6</sub>, como se observa en la figura 26.

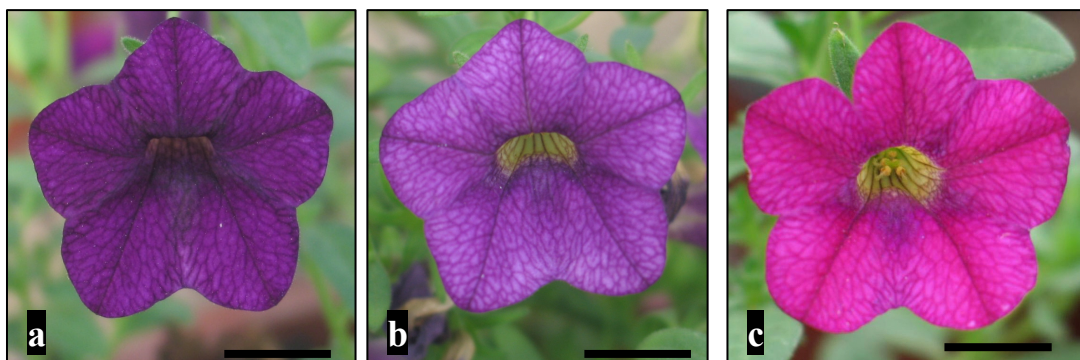


Figura 26. **a), b)** Flores del subgrupo A<sub>5</sub> y **c)** Flor del subgrupo A<sub>6</sub>. **Aumento:** Barra 1cm



*Grupo B: Mutantes en la forma y en el color de la flor*

Las flores de este grupo presentaron un fenotipo tipo “estrella” con lóbulos de ápice agudo y contorno rómbico y variegación en el color a modo de franjas de diversos tamaños. Se diferenciaron los subgrupos según el color de la flor (Fig. 27).

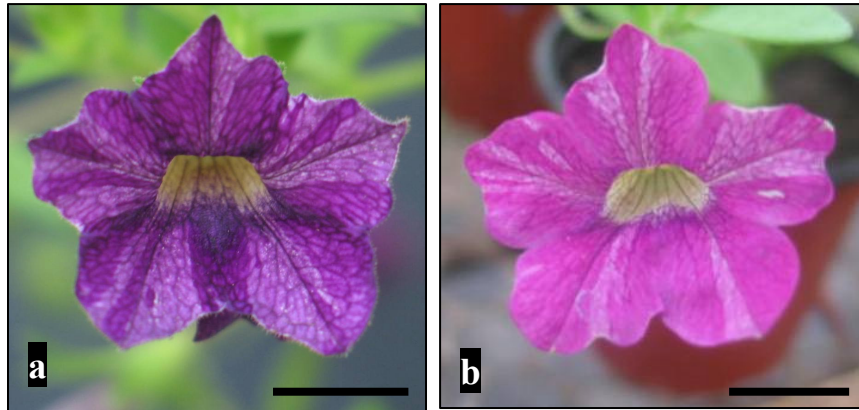


Figura 27. Flores del Grupo B. **a)** subgrupo B<sub>1</sub>, **b)** subgrupo B<sub>2</sub>. **Aumento:** Barra 1 cm.

Particularmente, en las flores del subgrupo B<sub>1</sub> se presentaron algunas reversiones al color WT. En la figura 28 se observan que las reversiones involucran al color de la flor y a la forma del lóbulo; aunque esto no siempre se evidencia porque depende del tamaño del sector afectado (Fig. 28b).

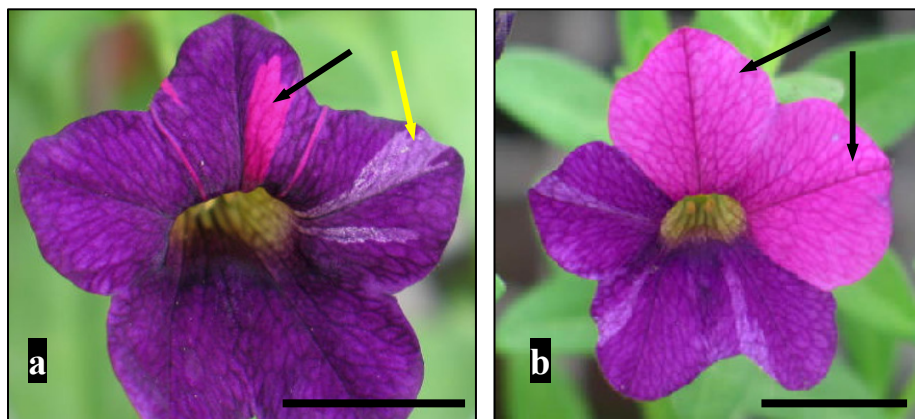


Figura 28. Flores del subgrupo B<sub>1</sub>. **a)** sector WT (flecha negra) y sector de color heterogéneo flecha amarilla), **b)** lóbulos de color y forma WT (flechas). **Aumento:** Barra 1 cm.

*Grupo C: Mutantes en la forma de la flor*

Las flores de este grupo presentaron corolas de lóbulos con ápice obtuso y contorno redondeado y los subgrupos se diferenciaron según el tamaño de la flor y el grado de división de los lóbulos (Fig. 29).

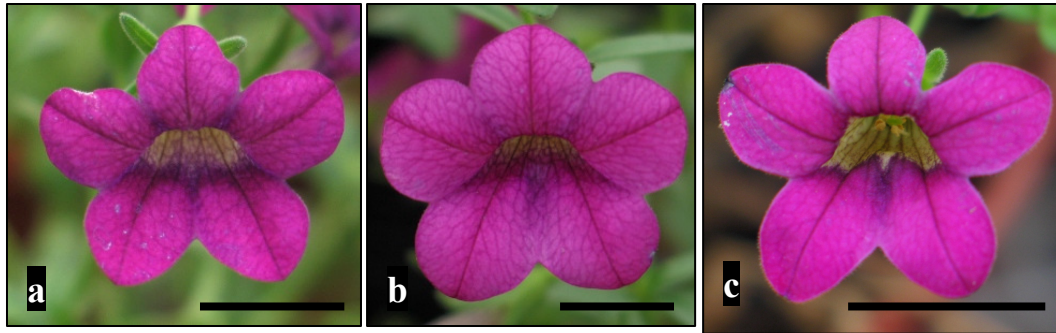


Figura 29. Flores del Grupo C. **a)** subgrupo C<sub>2</sub>, **b)** subgrupo C<sub>3</sub>, **c)** subgrupo C<sub>4</sub>. **Aumento:** Barra 1 cm.

*Grupo D: Mutantes de menor tamaño de flor que el WT*

En este grupo la morfología de la corola fue lo que diferenció el fenotipo de las flores, determinándose los subgrupos en base al tipo de ápice del lóbulo (Fig. 30).

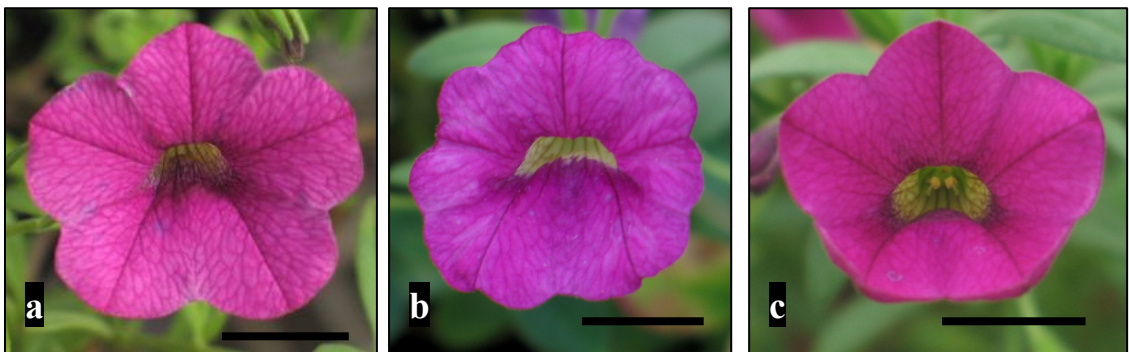


Figura 30. Flores de *Calibrachoa*. **a)** WT, **b)** Flor del subgrupo D<sub>1</sub>, **c)** Flor del subgrupo D<sub>2</sub>. **Aumento:** Barra 1 cm.

Las flores del subgrupo D<sub>1</sub> presentaron alta reversión de la forma de los lóbulos al WT, por lo que algunas plantas seleccionadas en la etapa M1V1 se perdieron en las diferentes propagaciones M1V2, M1V3.



*Grupo E*: Mutantes de mayor tamaño de flor que el WT

Este grupo de mutantes presenta un único fenotipo representada por un único subgrupo. La flor presenta garganta aplanada en su eje horizontal y lóbulos superiores curvados hacia atrás (Fig. 31).



Figura 31. **a)** Flor WT, **b)** Flor mutante de Grupo E.  
**Aumento:** Barra 1cm.

### 3.4.2 Análisis genotípico

Citometría de flujo: En la figura 32 se presenta un histograma típico de intensidad de fluorescencia relativa (IFR) obtenido en el ensayo. En dicha figura se observan 4 picos. El primer pico corresponde a las impurezas del material de análisis, el segundo y tercer pico corresponden a los núcleos en fase G1/G0 de la muestra y del genotipo estándar (*Hordeum vulgare* var. “New Golden”) respectivamente; y el último pico de menor altura corresponde a los núcleos en fase G2 del estándar. En dicho análisis se obtuvieron coeficientes de variación (CV) menores o igual al 5 % e IFR con valores relativos para la relación muestra/estándar de 0.36-0.38 (Tabla 8) encontrándose diferencias significativas entre los subgrupos B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>.

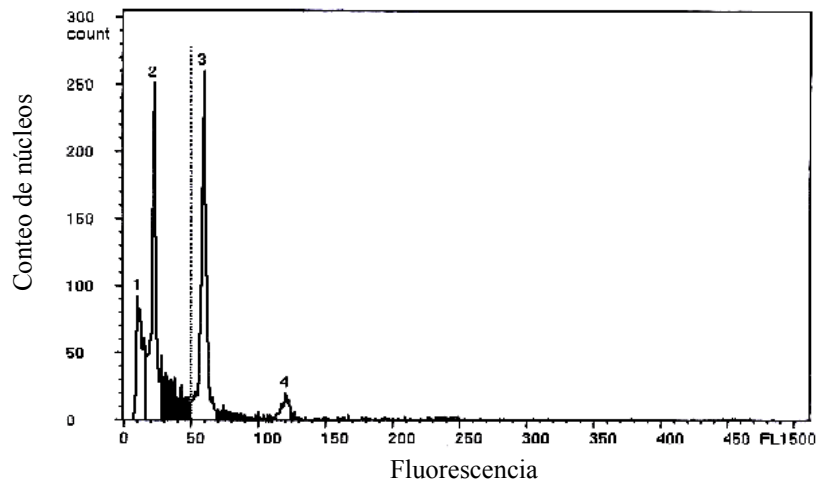


Figura 32. Histograma de intensidad relativa de fluorescencia (IRF) con DAPI -en unidades relativas-. Cuatro picos observados en el histograma: pico 1- impurezas de la muestra; pico 2- núcleos en fase  $G_0/G_1$  del genotipo mutante; pico 3- núcleos en fase  $G_0/G_1$  del estándar (*Hordeum vulgare* var. “New Golden”); pico 4- núcleos en fase  $G_2$  del estándar.

Viabilidad del polen: En la figura 33a se presentan los granos de polen teñidos según la técnica de Griessl para el género *Calibrachoa*. Los granos de polen coloreados de verde intenso son viables y los granos de polen coloreados de rojo, inviábiles.

En este análisis los genotipos mutantes evaluados presentaron en todos los casos una viabilidad menor al 50 %; al igual que el genotipo WT. En dicho análisis, se observó un único genotipo mutante con 100 % de granos de polen inviábiles.

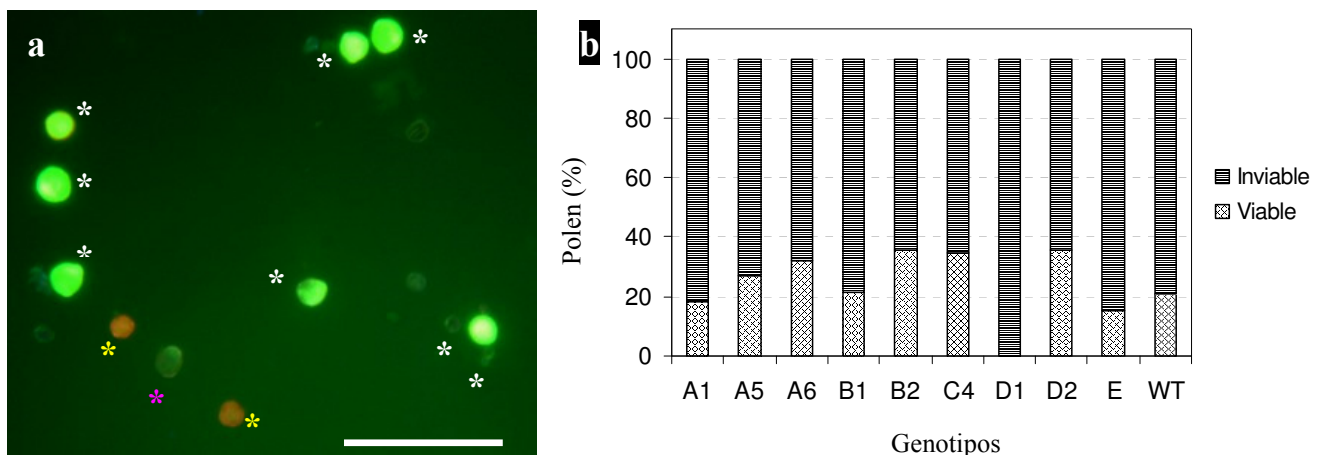


Figura 33. **a)** Granos de polen de *Calibrachoa* vistos con la tinción de Griessl (■: polen viable; ■: polen inviable, \* : polen subviable), **Aumento:** 10  $\mu$ m. **b)** Viabilidad del polen (%) en diferentes genotipos.

Cruzamientos: En la totalidad de los casos de auto-polinización de las plantas mutantes no hubo formación de frutos (auto-polinizaciones n = 48, % fructificación = 0); resultado que también fue observado en los cruzamientos dirigidos que se realizaron entre los genotipos mutantes (cruzamientos entre mutantes n = 58, % fructificación = 0) y entre los genotipos mutantes y el WT (Tabla 9). Sin embargo los cruzamientos realizados entre el genotipo mutante y un hermano entero del WT perteneciente a la misma filial produjeron frutos con semillas viables como se detalla en la tabla 9, salvo el caso de una mutante (genotipo D1) en la que no se produjeron frutos, ni semillas.

### 3.5 Evaluación de las mutantes

Se evaluó la capacidad de brotado y la floración en cantero y en maceta, eligiéndose para el análisis sólo aquellos fenotipos mutantes con características ornamentales superiores. En el caso de la capacidad de brotado, el análisis se realizó en fenotipos del subgrupo A1; mientras que en el ensayo para evaluar floración en maceta y en cantero, se eligieron fenotipos mutantes de diferentes colores de flor.

3.5.1 Capacidad de brotado: Los 10 fenotipos mutantes evaluados del subgrupo A1 presentaron un desarrollo de entre 2 y 3 brotes a los 30 días de evaluación. Los fenotipos mutantes 2 y 6 fueron los que presentaron entre 3 y 4 brotes desarrollados por segmento. Se encontraron diferencias significativas entre los fenotipos evaluados (Fig. 34). Cabe mencionar que el fenotipo 2 ha sido propuesto como un posible material para su registro en el Registro Nacional de Cultivares (Apéndice III).

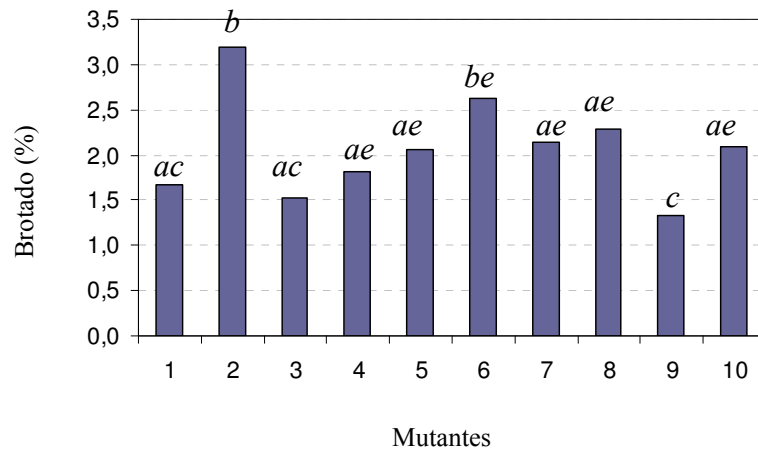


Figura 34. Fenotipos mutantes evaluados para la capacidad de brotado en segmentos nodales. Las letras diferentes indican diferencias significativas (Poisson,  $p < 0.005$ )

3.5.2 Floración en cantero y en maceta: En dicho análisis el número promedio de flores registrado a los 7 días de comenzado el ensayo fue de 67,16 flores/maceta y de 17,22 flores/parcela. En la figura 35 y en la tabla 10, se presentan el número de flores (datos acumulados) en los diferentes momentos analizados (días). En ambas condiciones de cultivo se presenta un momento de máxima floración a los 35 días que luego decrece en el tiempo. En cantero, la mutante 3 de flores color violeta, presentó un mayor decrecimiento en el número de flores posterior al pico de floración a los 35 días; mientras que las mutantes 1 y 2 tuvieron un comportamiento similar a lo largo del análisis en el número de flores. En maceta, la dinámica de floración presentó un pico máximo a los 35 días y otro a los 63 días (floración tardía) en las mutantes 1 y 3 analizadas. Es notable lo observado en la mutante 2, la cual, en esa condición de cultivo, no presentó una segunda floración como lo observado en las mutantes 1 y 3.

El genotipo utilizado como testigo o de referencia en el ensayo para comparar a las mutantes, presentó a los 35 días un alto número de flores que superó ampliamente a los genotipos

mutantes en cantero. En maceta, a los 63 días (floración tardía) el genotipo superó nuevamente en el número de flores a los genotipos mutantes.

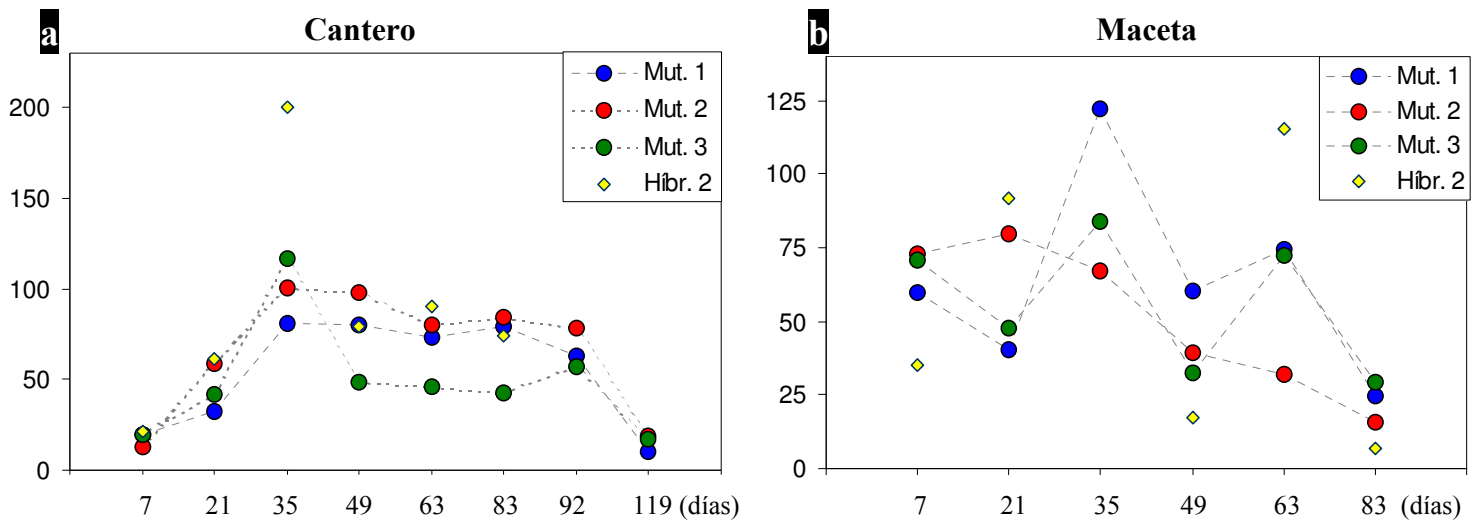


Figura 35. Número de flores de los clones mutantes obtenidos por radiación X en diferentes momentos de análisis. **a)** Cantero, **b)** Maceta.

### 3.6 Anexo-Tablas de Resultados

Tabla 1. Brotes M1 (Nº y %) desarrollados en los tratamientos A y B.

Tratamiento	Número de brotes irradiados	Número de brotes M1	Brotes M1 (%)
A (1 aplicación)	3200	1151	36
B (3 aplicaciones)	3552	1523*	43

\* ; Diferencia significativa entre los tratamientos A y B; a un  $p < 0,05$  (Test de Mann-Whitey)

Tabla 2. Número de mutantes de flor observadas en los tratamientos de rayos X.

Tratamiento	Mutantes Clases			MUTANTES TOTALES
	Color	Forma	Color + Forma	
A (1 aplicación)	10	8	9	27
B (3 aplicaciones)	25**	65**	52**	142
<b>TOTAL</b>	<b>35</b>	<b>73</b>	<b>61</b>	<b>169</b>

\*\* ; Diferencia significativa entre los tratamientos A y B; a un  $p < 0.01$  (Test de Birbaum y Kimball)

Tabla 3. Autovectores para nueve caracteres morfológicos de la corola de la flor en mutantes obtenidas por rayos X y del genotipo WT.

Carácter	CP1	CP2
Largo del tubo corolino	-0.897911	0.303535
Ancho del tubo corolino	-0.847478	-0.492346
Diámetro mayor de la corola	-0.986458	0.132100
Diámetro menor de la corola	-0.997211	-0.003641
Ancho de la garganta	-0.718835	0.557272
Alto del lóbulo 1	-0.920620	-0.379857
Alto del lóbulo 2	-0.911325	-0.383424
Ancho del lóbulo 1	-0.998375	0.149334
Ancho del lóbulo 2	-0.976988	0.173652

Tabla 5. Autovectores del análisis de componentes principales en las mutantes para color de flor.

Caracter	Grupo A		Grupo B		Grupo C, D, E	
	CP1	CP2	CP1	CP2	CP1	CP2
L	0.9545	0.0523	-0.8873	0.2691	-0.8961	-0.0945
a	-0.9126	0.3912	-0.8652	0.2859	-0.6014	0.7808
b	0.9247	0.3320	-0.7979	-0.6026	0.7996	0.4813

Tabla 6. Breve descripción de las mutantes inducidas en los tratamientos mutagénicos con rayos X, para color (RHS) y morfología de la corola. Las mutantes se representan en los subgrupos de mutantes.

Subgrupo	RHS		Características de las flores mutantes
A <sub>1</sub>	White	155C	Blanca con nervaduras pigmentadas
A <sub>2</sub>	Red Purple	72C	Rosa con nervaduras pigmentadas
A <sub>3</sub>	Red Purple	74A	Fucsia con sectores albinos
A <sub>4</sub>	Red Purple	74A	Fucsia con zonas heterogéneas de color
A <sub>5</sub>	Purple Violet	81A,B	Violeta
A <sub>6</sub>	Red Purple	74A	Fucsia intenso
B <sub>1</sub>	Purple Violet	81A	Variegada violeta
B <sub>2</sub>	Red Purple	74A	Variegada rosa
C <sub>1</sub>	Red Purple	74A	Pequeña
C <sub>2</sub>	Red Purple	74A	Pequeña de lóbulos marcados
C <sub>3</sub>	Red Purple	74A	Mediana de lóbulos poco marcados
C <sub>4</sub>	Red Purple	74A	Grande de lóbulos marcados
D <sub>1</sub>	Red Purple	74A	Pequeña de ápice emarginado
D <sub>2</sub>	Red Purple	74A	Pequeña de ápice cuspidado
E1	Red Purple	74A	Grande de ápice cuspidado

RHS. Carta de color

Tabla 7. Número de mutantes obtenidas en cada subgrupo para cada tratamiento

Subgrupos	Mutantes (N°)	
	Trat. A (1 aplicación)	Trat. B ( 3 aplicaciones)
A <sub>1</sub>	5	6
A <sub>2</sub>	----	4
A <sub>3</sub>	1	-----
A <sub>4</sub>	3	9
A <sub>5</sub>	1	4
A <sub>6</sub>	----	4
B <sub>1</sub>	5	6
B <sub>2</sub>	4	46
C <sub>1</sub>	----	2
C <sub>2</sub>	----	3
C <sub>3</sub>	1	29
C <sub>4</sub>	2	13
D <sub>1</sub>	3	8
D <sub>2</sub>	2	6
E <sub>1</sub>	----	2
TOTAL	27	142



Tabla 4. Media (mm) y error estándar para nueve caracteres morfométricos de corola en el WT y en los subgrupos de mutantes.

Genotipo	Largo del tubo corolino		Ancho del tubo corolino		Diámetro mayor de la corola		Diámetro menor de la corola		Ancho de la garganta		Largo del lóbulo 1		Largo del lóbulo 2		Ancho del lóbulo 1		Ancho del lóbulo 2		
	$\bar{x}$	EE	$\bar{x}$	EE	$\bar{x}$	EE	$\bar{x}$	EE	$\bar{x}$	EE	$\bar{x}$	EE	$\bar{x}$	EE	$\bar{x}$	EE	$\bar{x}$	EE	
WT	21.86 ± 0.19		7.33 ± 0.07		31.42 ± 0.38		26.39 ± 0.07		7.21 ± 0.13		14.23 ± 0.21		14.63 ± 0.15		12.13 ± 0.17		11.80 ± 0.25		
Grupo A																			
A1	20.67 ± 0.07		7.32 ± 0.04		29.22 ± 0.18		24.76 ± 0.16		7.95 ± 0.05		12.39 ± 0.08		12.99 ± 0.08		9.89 ± 0.08		10.21 ± 0.08		
A2	20.02 ± 0.14		6.73 ± 0.05		26.81 ± 0.21		22.23 ± 0.19		6.75 ± 0.07		11.14 ± 0.10		11.51 ± 0.09		9.90 ± 0.12		9.81 ± 0.11		
A3	20.82 ± 0.13		7.15 ± 0.07		28.24 ± 0.35		23.87 ± 0.39		7.97 ± 0.14		12.50 ± 0.21		12.75 ± 0.22		10.66 ± 0.13		9.99 ± 0.16		
A4	19.76 ± 0.08		7 ± 0.04		29.03 ± 0.18		24.55 ± 0.21		7.61 ± 0.05		12.57 ± 0.11		13.08 ± 0.11		10.48 ± 0.08		10.22 ± 0.08		
A5	18.89 ± 0.14		6.68 ± 0.05		26.86 ± 0.16		23.10 ± 0.14		7.50 ± 0.07		11.97 ± 0.10		12.49 ± 0.11		9.53 ± 0.09		9.67 ± 0.09		
A6	19.78 ± 0.16		6.81 ± 0.10		28.27 ± 0.28		24.42 ± 0.30		7.22 ± 0.14		12.52 ± 0.17		13.06 ± 0.18		10.59 ± 0.19		10.24 ± 0.18		
Grupo B																			
B1	19.94 ± 0.10		6.67 ± 0.05		24.94 ± 0.18		20.64 ± 0.15		6.73 ± 0.06		9.51 ± 0.11		9.81 ± 0.10		8.87 ± 0.08		8.87 ± 0.09		
B2	19.67 ± 0.06		6.79 ± 0.03		25.08 ± 0.10		20.32 ± 0.10		7.05 ± 0.04		9.74 ± 0.06		9.98 ± 0.06		9.24 ± 0.05		8.98 ± 0.05		
Grupo C																			
C1	18.78 ± 0.15		6.49 ± 0.07		22.11 ± 0.20		18.01 ± 0.17		6.27 ± 0.11		8.79 ± 0.13		9.03 ± 0.10		7.63 ± 0.16		7.75 ± 0.14		
C2	17.83 ± 0.13		6.71 ± 0.08		22.28 ± 0.29		16.49 ± 0.34		7.36 ± 0.13		7.44 ± 0.15		8.08 ± 0.16		7.87 ± 0.16		8.07 ± 0.16		
C3	18.45 ± 0.12		6.76 ± 0.04		25.21 ± 0.17		19.89 ± 0.18		7.13 ± 0.05		9.49 ± 0.11		10.06 ± 0.11		9.19 ± 0.08		8.95 ± 0.07		
C4	19.03 ± 0.11		6.66 ± 0.05		25.59 ± 0.18		20.29 ± 0.17		7.27 ± 0.07		9.61 ± 0.62		9.63 ± 0.11		9.54 ± 0.08		9.40 ± 0.08		
Grupo D																			
D1	14.25 ± 0.16		6.38 ± 0.09		21.65 ± 0.39		19.72 ± 0.28		5.13 ± 0.10		11.27 ± 0.26		11.71 ± 0.15		7.15 ± 0.18		6.89 ± 0.18		
D2	19.22 ± 0.12		7.19 ± 0.10		23.73 ± 0.30		18.96 ± 0.29		7.34 ± 0.13		10.30 ± 0.14		10.69 ± 0.16		8.33 ± 0.14		8.05 ± 0.17		
Grupo E																			
E	20.93 ± 0.11		7.16 ± 0.08		30.47 ± 0.21		25.75 ± 0.21		8.73 ± 0.10		12.84 ± 0.11		13.22 ± 0.10		11.91 ± 0.12		11.36 ± 0.10		

$\bar{x}$  . Media, EE. Error estándar.

Tabla 8. Intensidad Relativa de Fluorescencia (media y CV) obtenidas por densitometría de flujo (tinción con DAPI) en plantas WT y en plantas mutantes, utilizando como estándar *Hordeum vulgare* var. “New Golden”.

Genotipo	Muestra		Estándar		Muestra/Estándar	D
	$\bar{x}$	CV	$\bar{x}$	CV		
WT	22.99	6.12	61.42	3.23	0.374	----
A <sub>1</sub>	22.99	4.21	60.42	2.18	0.380	1.66
A <sub>2</sub>	23.99	4.41	62.50	2.41	0.383	2.53
A <sub>3</sub>	23.26	3.68	60.69	2.03	0.383	2.49
A <sub>4</sub>	23.51	3.89	61.70	2.46	0.381	1.83
A <sub>5</sub>	23.08	3.93	63.36	2.00	0.364	1.40
A <sub>6</sub>	24.54	4.31	64.06	1.79	0.383	2.46
B <sub>1</sub>	22.54	3.81	61.01	2.09	0.370**	-1.25
B <sub>2</sub>	22.91	3.72	61.59	2.23	0.372**	-0.53
C <sub>1</sub>	25.33	5.91	67.48	2.59	0.375	0.37
C <sub>2</sub>	23.31	3.22	63.56	2.36	0.367	-0.53
C <sub>3</sub>	25.07	3.79	64.86	2.41	0.387**	3.55
C <sub>4</sub>	24.47	3.22	66.61	1.75	0.367**	-1.84
D <sub>1</sub>	21.97	6.45	58.75	3.84	0.374	0.02
D <sub>2</sub>	23.14	5.74	61.61	3.19	0.376	0.50
E	22.33	5.24	58.11	3.30	0.384	2.72

$\bar{x}$  . Media

CV. Coeficiente de Variación.

\*\*; Diferencia significativa entre los genotipos a un  $p < 0.01$  (Test Tukey)

Tabla 9. Número de cruzamientos, porcentaje de fructificación y promedio de semillas obtenidas por cruzamientos entre las mutantes, el WT y el hermano WT.

Genotipo	WT				Hermano del WT			
	Cruz. (A)	Frutos (B)	B/A * 100	Semillas ( $\bar{x}$ )	Cruz. (A)	Frutos (B)	B/A * 100	Semillas ( $\bar{x}$ )
A1	90	0	0	0	77	56	72.73	61
A2	7	0	0	0	26	24	92.31	192
A4	18	0	0	0	68	58	85.29	175
A5	20	0	0	0	18	16	88.89	00
A6	-----*	-----	-----	-----	4	4	100	184
B1	13	0	0	0	6	6	100	5
B2	59	0	0	0	147	116	78.91	124
C1	6	0	0	0	-----	-----	-----	-----
D1	15	0	0	0	20	0	0	0
D2	-----	-----	-----	-----	27	23	85.19	128
E1	-----	-----	-----	-----	19	19	100	129

\*. Cruzamientos no realizados porque no había disposición de flores.

Tabla 10. Número de flores en condiciones de cantero y maceta.

Evaluación (días)	Cantero						Maceta					
	Mut. 1		Mut. 2		Mut. 3		Mut. 1		Mut. 2		Mut. 3	
	$\bar{x}$	DE	$\bar{x}$	DE	$\bar{x}$	DE	$\bar{x}$	DE	$\bar{x}$	DE	$\bar{x}$	DE
7	19.7	± 2.1	12.7	± 4.2	19.3	± 8.6	60.0	± 19.8	72.7	± 7.9	71.0	± 10.5
21	32.7	± 3.2	59.0	± 19	42.0	± 10	40.2	± 9.7	79.7	± 7.9	71.0	± 10.5
35	81.0	± 16.7	100.7	± 46.6	116.7	± 22	122	± 37.5	67.0	± 23.6	83.7	± 20.6
49	80.3	± 6.8	98.0	± 40.8	48.7	± 4.9	60.5	± 7.5	39.2	± 13.6	32.2	± 18
63	73.0	± 19.3	80.0	± 19.5	45.7	± 9	74.5	± 8.7	31.7	± 12.3	72.2	± 12.7
83	79.3	± 26.4	84.3	± 15	42.3	± 28.3	24.7	± 8.9	15.5	± 7	29.3	± 10.0
92	63.3	± 26.4	78.7	± 11.9	56.7	± 11.5	7.5	± 2.6	14.0	± 4	-----	-----
119	10.3	± 9.7	18.7	± 9.9	17.0	± 10.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----

$\bar{x}$ . Media

DE. Desvío Estándar

#### 4. DISCUSIÓN

A partir del objetivo planteado en este trabajo que fue el estudio de la radiación X como herramienta de mejora en plantas ornamentales particularmente en el género *Calibrachoa*, a continuación se discuten las diferentes etapas seguidas en la investigación para la inducción de mutaciones en la mejora del cultivo.

- ***Elección del material genético de partida, tipo de tejido y agentes mutagénicos***

La elección del material genético para la inducción de mutaciones es de fundamental importancia en el mejoramiento de plantas a través de mutagénesis. Para la elección del material genético en este trabajo se utilizó un material híbrido del género *Calibrachoa* obtenido del cruzamiento entre la especie nativa *C. excellens* y la variedad comercial “Callie Dark Blue”, elegido en base a sus buenas características ornamentales. Generalmente el material que se elige para la inducción de mutaciones en un programa de mejoramiento son cultivares de excelencia o materiales en proceso avanzado de mejora en los cuales se busca cambiar una o unas pocas características (Broertjes y Verboom, 1974). En cuanto al tipo de tejido elegido, las yemas axilares de los segmentos nodales resultan muy adecuadas para los ensayos mutagénicos porque permiten experimentar con gran cantidad de meristemas sumado a la facilidad en la manipulación y al manejo de los mismos. A su vez permite la realización de un manejo genealógico pos-irradiación de los brotes a través de la posición o la localización a lo largo del segmento, con la posibilidad de distinguir su origen en caso de obtenerse varias mutantes idénticas. Con respecto al mutágeno se prefirió utilizar un mutágeno físico de radiación ionizante, en este caso rayos X. Este tipo de radiación resulta apropiado para tratar yemas debido a que la penetración de la radiación X en el tejido es homogénea y suficiente y permite a su vez un adecuado control de la dosis (Briggs y

Constantin, 1977). Es importante aclarar aquí que la elección de un mutágeno físico con respecto a un mutágeno químico en el tratamiento de yemas resulta más favorable debido a la penetración como se mencionó anteriormente y a que los mutágenos químicos pueden presentar problemas de toxicidad (Prina, cp).

- ***Elección de la dosis***

El primer paso experimental para la inducción de mutaciones de manera artificial, es determinar una adecuada dosis de rayos X. El criterio de dosis que fue elegido en este trabajo fue la Dosis Letal Media (DLM) ó DL50. Dicha dosis es comúnmente utilizada en mutagénesis inducida cuando se trabaja por primera vez con un material experimental en el que se desea establecer una dosis que asegure afectar al material suficientemente como para inducir una frecuencia de mutaciones considerable pero que, por otro lado, no reduzca drásticamente la cantidad de material que sobrevive (Tulmann Neto y Latado, 2007; Fuchs, 2002). En este trabajo, el porcentaje de brotes desarrollados a los 60 días pos-irradiación fue el criterio tomado para estimar la DLM, observándose que el 50 % de los brotes sobrevivientes correspondieron a una dosis de 24 Gy. Dicho resultado está acorde con los estudios realizados en el género, en los que se observó que una dosis de 30 Gy fue una dosis efectiva para la inducción de fenotipos novedosos en flor (Schum, cp).

Es importante señalar que cuando se trabaja con mutágenos físicos del tipo de las radiaciones ionizantes (rayos X, neutrones), es habitual utilizar a la DLM como dosis de elección para los ensayos mutagénicos, ya que este tipo de mutágeno presenta habitualmente una alta correlación entre los efectos letales y los efectos mutagénicos que no siempre se cumple en el caso de mutágenos químicos, como por ejemplo la azida sódica (Prina y Favret, 1988). Esta correlación entre letalidad e inducción de mutaciones no siempre ocurre cuando se trabaja con mutágenos

químicos en los que generalmente la penetración en el tejido no resulta homogénea y el criterio de DLM como dosis de elección no es recomendable (Prina, 1989; Prina y Favret 1988). Sin embargo es importante mencionar que la relación entre letalidad de las plantas M1 y los efectos mutagénicos no es igual en todos los tipos de radiaciones ionizantes ni tampoco en los tipos de tratamientos, como se discute más adelante en este trabajo.

- ***Daños observados sobre los brotes M1***

Se observaron diversos efectos de la radiación X en las yemas de *Calibrachoa* tales como necrosis y/o malformaciones en el tejido. La radiación afectó también la dinámica del crecimiento y la viabilidad de los brotes. En este último caso el recuento detallado de los brotes con respecto a la posición en el segmento nodal en distintos momentos pos-irradiación evidencia un efecto diferencial para cada dosis. En el control sin irradiar a los 18 días (Fig. 8a) puede observarse una cierta dominancia del brotado en las posiciones más apicales del segmento (brotes 1 al 4) por sobre el resto de los brotes. Este tipo de desarrollo es el esperable en un tallo con dominancia apical, en el cual el crecimiento apical inhibe el crecimiento de las yemas laterales (Taiz y Zeiger, 2002). Para las dosis de irradiación de 15, 30 y 60 Gy se observó un comportamiento diferente. Las posiciones apicales fueron las más afectadas por la radiación, lo que retrasó considerablemente el desarrollo de los brotes, así como también su número, tanto en la dosis de 15 Gy como en las dosis mayores de 30 y 60 Gy (Fig. 8b,c,d). En esta última dosis se presentó a su vez una altísima letalidad en los brotes apicales. Por otro lado en las dosis mayores, los brotes ubicados en las posiciones 4 a 8 desarrollaron más rápido que el control no irradiado, superando ampliamente el número de brotes desarrollados en las posiciones apicales (1 y 2). Este cambio de dominancia relativa según la posición del brote puede compararse con lo que ocurre en la excisión del ápice (Taiz y Zeinger, 2002). El efecto diferencial según la posición de los brotes puede explicarse en base a una mayor

sensibilidad de los brotes apicales a las radiaciones ionizantes. Estos mismos resultan ser los más activos en el segmento nodal y tal como señala tempranamente Stadler (1930) los efectos deletéreos de los rayos X se intensifican en los tejidos fisiológicamente activos. Sin embargo diversos factores pueden estar influyendo en el efecto de las radiaciones ionizantes sobre el material tratado. Entre ellos, factores externos como temperatura, humedad, luz y/o factores intrínsecos del material como la constitución genética, estado metabólico del meristema, etc (Ahnström, 1977). Es importante aclarar que la constitución genética de los meristemas aquí tratados resulta igual en todos ellos porque devienen clonalmente del híbrido, sin embargo el estado metabólico de los mismos puede variar en el contenido de oxígeno, agua, hormonas, etc (Ahnström, 1977). El oxígeno y el agua son los principales factores que amplifican los efectos letales ya que por medio de la radiación se producen especies reactivas de oxígeno que toxifican a la célula y derivan en letalidad (Ahnström, 1977).

Desde el aspecto morfológico se observaron sectores verde claro (*viridis*) en las primeras hojas de los brotes M1 en las dosis de radiación de 15, 30, 60 Gy con cambios morfológicos como zonas hundidas. Estos sectores corresponden a mutaciones somáticas que según el número de células presentes en el meristema en el momento de la irradiación, ocuparán una mayor o una menor proporción en el tejido de la hoja desarrollada. Cuanto mayor sea el número de células iniciales en un meristema en el momento de la irradiación, los sectores mutados tendrán un menor tamaño en el órgano completamente desarrollado (Donini y Micke, 1984; Prina *et al.*, en prensa). La denominación *viridis* pertenece a un grupo heterogéneo caracterizado por su color verde-amarillento o verde-claro y deviene de una clasificación realizada por Gustaffson para distinguir clases de mutaciones clorofílicas en cebada (van Harten, 1998). En cebada se ha estudiado la influencia del genotipo en las frecuencias y en los espectros de mutaciones somáticas que se expresan en M1 para distintos mutágenos a través del uso de genes marcadores clorofílicos al

estado heterocigoto (Prina y Favret, 1988). En dicho trabajo se observó que en ausencia de estos marcadores al estado heterocigoto el espectro estuvo compuesto principalmente por sectores del tipo *viridis*, mientras que el espectro de mutantes cambió drásticamente en función de los marcadores presentes y del mutágeno utilizado (Prina y Favret, 1988). En las hojas de las monocotiledóneas estos sectores *viridis* se observan como estrías longitudinales mientras que en las dicotiledóneas se presentan como manchas cloróticas de forma irregular según el patrón de las nervaduras y obedece a la ontogenia de cada especie (Prina *et al.*, en prensa).

Ontogenéticamente, las hojas de las dicotiledóneas son el resultado de divisiones periclinares en células ubicadas en forma de anillo en la periferia del meristema apical (Esau, 1985). Resulta frecuente encontrar malformaciones en las hojas M1 de las dicotiledóneas después de los tratamientos con radiaciones ionizantes (Prina *et al.*, en prensa, Cortizo *et al.*, 2003). Los cambios morfológicos observados -hundimiento del sector- en asociación con sectores deficientes en clorofila pueden interpretarse como una consecuencia del tamaño diferente de las células que conforman el sector mutante (Martinez y Favret, 1991). Otras de las malformaciones observadas pueden ser interpretadas también como resultado de la muerte celular de las células no compensada por el crecimiento de las células vecinas tal como ocurre en el algodón (Prina *et al.*, en prensa). Por último, las malformaciones en la fusión de hojas y tallos observados en este trabajo pueden ser consecuencia en la irregularidad de las divisiones celulares como explica van Harten (1998).

En las flores también se presentaron formas aberrantes, aunque en la mayoría de los casos se observaron flores bien formadas. La aparición de flores con un mayor número de órganos puede relacionarse a duplicaciones en las células del meristema floral y no a una fusión de flores, ya que en este género, las flores se presentan solitarias en la axila de la hoja. Dichas malformaciones fueron de carácter transitorio y por ende no pudieron ser transmitidas a las subsiguientes generaciones de propagación vegetativa. En términos generales se puede decir que *a priori* es difícil



distinguir si el origen de algunas malformaciones se debió a efectos del tipo teratogénico o fueron verdaderas mutaciones en genes responsables de la formación de los órganos.

- ***Incidencia de las metodologías de irradiación sobre la letalidad y la inducción de mutantes (Tratamiento A= 1 aplicación; Tratamiento B= 3 aplicaciones)***

La relación entre letalidad e inducción de mutantes dependió de la metodología de radiación aplicada en el material experimental. El número de plantas M1V1 así como también la frecuencia de mutantes inducidas y el patrón de desarrollo de los brotes en función de la posición del segmento, difirió entre los dos tipos de tratamientos (Fig. 13). En el tratamiento de una sola aplicación o dosis completa (24 Gy), los brotes tuvieron un patrón de desarrollo muy similar al ensayo de la DLM para las dosis de 15 y 30 Gy, mientras que en el tratamiento de 3 aplicaciones o dosis fraccionada (8 Gy/semana) el desarrollo de los brotes resultó similar a la dosis de 0 Gy del ensayo. Es decir, las posiciones apicales 1, 2 y 3 del segmento nodal serían las posiciones que más se afectan con los rayos X y que resultan más sensibles a los efectos de los mismos. Por ende, el tratamiento de tres aplicaciones presentó un menor daño fisiológico que el tratamiento de 1 aplicación. La menor letalidad que se observó en la dosis fraccionada ha sido reportada y comprobada en muchos ensayos (van Harten, 1998). Estos resultados pueden explicarse a través del fenómeno de “recuperación”, explicado en base a los sistemas de reparación del ADN (Matsumura, 1964; Lea, 1955). Algunos autores indican que los sistemas de reparación de ADN actuarían en las intermitencias de los eventos de irradiación mejorando de esta manera la supervivencia de las células (van Harten, 1998; Schum y Preil, 1998; Tuteja *et al.*, 2001; Britt, 1999; Preuss y Britt, 2003). La radiación ionizante produce la desestabilización de la molécula de ADN a través de roturas de simple o doble cadena (Ahnström, 1977). Matsumura (1961) propone que la restitución de las roturas de simple cadena que ocurren durante el período de reposo

disminuiría la coexistencia de dos o más roturas adyacentes, evitando de esta forma la producción de numerosas aberraciones cromosómicas que sólo se originan por la ocurrencia de al menos dos roturas simultáneas, usualmente denominadas en inglés “two-hit aberrations”, para que puedan producirse uniones impropias entre los extremos rotos. La ocurrencia de fenómenos similares ha sido discutido largamente también en los casos en que las dosis se aplican en tasas altas o bajas, o si se hace irradiación crónica o aguda (Briggs y Konzak, 1977). van Harten (1998) señala que generalmente para aumentar la dosis de irradiación sin que se incremente proporcionalmente la letalidad es recomendable aplicar dosis iniciales pequeñas y reducir de esta forma los efectos a las exposiciones posteriores mayores. Esto fue estudiado en *Saintpaulia ionatha* donde se observó que dosis iniciales pequeñas de rayos X protegían a las hojas de los efectos letales de dosis posteriores mayores (Broertjes, 1972). Según Schum (2003) este tipo de dosis fraccionada permitiría aumentar la dosis total, obteniéndose una buena regeneración y una mayor tasa de mutación. Por lo tanto los efectos diferenciales entre los tratamientos mutagénicos dependerán de los mecanismos de reparación del ADN propios de la especie, del genotipo tratado, así como también de los intervalos de tiempo entre cada irradiación y las condiciones intrínsecas y extrínsecas del material como fue mencionado anteriormente.

- ***Formación y crecimiento de los sectores mutantes en las plantas quiméricas M1V1***

La selección de las mutantes para caracteres de color y forma de flor hace que se requiera de un sector mutado lo suficientemente grande como para que el cambio que fue inducido pueda ser visualizado y por ende seleccionado. Una célula que ha mutado por sucesivas divisiones mitóticas originará un clon celular que crecerá rodeado de clones celulares de otra constitución genética, sean WT u otros clones portadores de otras mutaciones (Prina *et al.*, en prensa). Generalmente las plantas que derivan de la primera generación mutagenizada a partir de órganos multicelulares como las

yemas, semillas, etc; representan quimeras complejas en donde la célula mutada debe competir con las células WT por el espacio. Estas quimeras están formadas por sectores mutantes de diverso tamaño con un fondo genético común. El éxito de una célula mutada dependerá entonces de la capacidad para dividirse y de generar un clon celular durante la diplofase en competencia con el resto de los clones celulares que formarán la planta adulta (Prina *et al.*, en prensa). La competencia entre células somáticas se la llama comúnmente selección diplóntica (Gaul, 1964) o selección intra-individual o intra-somática por Kaplan (D'amato, 1965). Adicionalmente a lo que ocurre en la semilla, los meristemas en los órganos vegetativos se presentan estratificados en capas concéntricas que crecen de manera más o menos independiente cubriendo un cuerpo central no diferenciado (teoría del *tunica –corpus*) (Esau, 1985). Una célula mutada localizada en su capa de origen (L1, L2, L3) originará un clon celular que ocupará en principio sólo una parte de esta capa (quimera mericlinal) y mientras las células mutadas se dividan por mitosis formando las siguientes generaciones celulares, el clon celular aumentará de tamaño y llegará a ocupar toda la capa originándose una quimera periclinal. Las capas celulares L1, L2 y L3 darán origen a distintos órganos: la capa histogénica L<sub>1</sub> originará a las células epidérmicas, la capa L<sub>2</sub> originará a las gametas y la capa L<sub>3</sub> originará el sistema vascular (Lineberger, 2008). Es importante señalar que una mutante para un determinado carácter sólo se expresará cuando se ubique en la capa correspondiente; es decir, una mutación que inhiba la síntesis del pigmento de la flor se observará sólo si este cambio se localiza en las células de la capa L1. Cabe mencionar que las células epidérmicas presentan una estricta conservación en el linaje de sus células y se considera a la epidermis uno de los tejidos más estables en la planta (Lolle y Pruitt, 1999). Un requerimiento básico para el mejorador que trabaja en inducción artificial de mutaciones, particularmente en especies de propagación vegetativa, es la de incrementar el área mutada para que pueda aplicarse la selección. Este propósito puede lograrse con podas sucesivas de los sectores WT favoreciendo que

el área mutada se amplíe o sea cada vez mayor (Tulmann Neto y Latado, 2007). En este aspecto las plantas de reproducción sexual presentan un panorama diferente. El pasaje a través de las gametas unicelulares hace que no se observen plantas quiméricas en la generación M2 salvo para el caso de los genes localizados en los cloroplastos o en mitocondrias (Prina *et al.*, en prensa) o para el caso de mutantes de genética inestable que producen *per se* nueva variabilidad (Prina *et al.*, 2009). Durante la formación de las gametas existe un filtro muy estricto a nivel haploide llamado selección haplónica por el cual la mayoría de las mutantes recesivas deletéreas son expuestas y eliminadas (Swaminathan, 1977). Este mecanismo también actúa eliminando aberraciones cromosómicas de gran tamaño que a pesar de haber superado el filtro de la selección diplónica a nivel somático no resultan viables durante la meiosis y se pierden tal como ocurre en el polen irradiado de la especie *Arabidopsis thaliana* (Naito *et al.*, 2005). En este aspecto, las plantas de multiplicación vegetativa sin recombinación sexual, posibilitan el mantenimiento de combinaciones heterocigotas favorables así como también de interacciones intra- e inter-génicas (dominancia y epistasis) que de otra forma se perderían a través de la reproducción sexual.

- ***Estudio de las mutantes de flor en plantas M1V1 -recuento, aislamiento y clasificación de mutantes-***

En este trabajo la variabilidad generada en los tratamientos mutagénicos para características ornamentales en mutantes de flor resultó de suma importancia por la gama de formas y colores que se generaron. Es importante señalar que las mutantes observadas corresponden a mutaciones somáticas, es decir mutaciones que ocurren en tejidos somáticos y son multiplicadas por mitosis sin una fase de reproducción sexual. Como ya fue mencionado anteriormente, el espectro de mutantes

inducidas que puede observarse, mantenerse y por consecuencia utilizarse en las plantas de propagación vegetativa resulta muy diferente al de las plantas de propagación por semilla. Para ello varios factores deben considerarse al respecto: 1- Influencia del mutágeno: La frecuencia de las mutaciones somáticas en relación a las germinales es muy diferente según el mutágeno utilizado. Los rayos X tienen una mayor capacidad de inducir mutaciones expresadas a nivel somático que los mutágenos químicos (Prina y Favret, 1988). 2- Influencia del genotipo: La constitución genética heterocigota del material experimental puede tener una influencia notable en la frecuencia y en el espectro de las mutaciones somáticas inducidas (Prina y Favret, 1988). 3-Influencia del tipo de selección, haplónica o diplónica: La aplicación de un tratamiento mutagénico en un meristema multicelular es de esperar que origine un tejido u organismo quimérico; es decir, formado por células con más de una constitución genética (Prina *et al.*, en prensa, Tilney y Basset 1963). Las mutaciones se originan a nivel de células individuales y la formación de plantas quiméricas implica una competencia entre los distintos clones celulares.

En el presente trabajo la aparición de individuos quiméricos en las plantas M1V1 es un resultado esperado y acorde a la constitución multicelular de los meristemas tratados. Los fenotipos mutantes se observaron sólo en sectores de las plantas M1V1 con flores WT y flores de fenotipo novedoso (Fig. 14). La posibilidad de multiplicar la rama de fenotipo novedoso de la primera generación (M1V1) resulta una ventaja en las especies de multiplicación vegetativa con respecto a aquellas que sólo se pueden propagar por semilla. Al respecto, Schum y Preil (1998) remarcan la ventaja que representa la posibilidad de la selección de mutantes en las plantas M1V1 con respecto a las plantas de propagación por semilla en el tiempo de mejora.

Los fenotipos mutantes fueron seleccionados y clasificados en base a las características de flor descritos en 3.4 (color y forma). El fenotipo A1 además de la variegación clonal originada en el quimerismo de la planta M1V1 presentó variegación del tipo posicional. Este tipo de variegación

ocurre por una expresión diferencial de la célula según su posición o localización en el tejido. Este efecto puede estar dado en el fenotipo descrito, por la posición de la célula con respecto a las nervaduras y/o con respecto a si la célula mutante se ubica en la zona central o en los laterales del lóbulo. Los patrones de variegación posicional en la corola son frecuentemente observados en diversas especies y la explicación más difundida se relaciona a una expresión diferencial en la biosíntesis de los pigmentos que con frecuencia es controlada por genes regulatorios. Un ejemplo de esto es el del gen *An12/an12* que produce un patrón de variegación posicional con respecto a las nervaduras en la flor de *Petunia* denominado “venation pattern” (Martin y Gerats, 1993) ó en mutantes de *Arabidopsis thaliana* “reticulata” con patrones de distribución de los pigmentos clorofilicos en las nervaduras de las hojas (González-Bayon *et al.*, 2006). En monocotiledóneas las mutantes posicionales más comunes corresponden a aquellas que presentan diferente pigmentación clorofílica entre la base y el extremo superior de la lámina de la primera hoja, designadas por Gustafsson (1948) como discontinuas y del grupo *virido-albina* (van Harten, 1988). También en dicho fenotipo se presentaron flores con sectores de ambos colores sugiriendo una composición quimérica en sus tejidos (Fig. 22a). Dichos sectores se localizan a lo largo del radio de la corola, con un patrón esperable de crecimiento para los clones celulares que la forman. Esto permite suponer que en las flores en donde se observaron sectores clonales indicativos de quimerismo, el meristema presentaba más de una célula al momento de la irradiación. Por otro lado, puede verse que algunos de los sectores mutados ocupan más de una flor indicando que estas se originaron en una misma célula inicial. Es interesante notar que la distribución de los clones celulares marcados por la mutación sugiere una primera etapa de crecimiento durante la ontogenia de la flor en donde los clones celulares se encuentran desordenados y que cuando se definen los destinos celulares en el tejido, los linajes celulares mutados y normales quedan mezclados de manera irregular. Por otro lado es importante señalar que la expresión de la variegación posicional típica del subgrupo A1 no

se altera cuando la mutante ocupa sólo un pequeño sector clonal. El patrón se cumple estrictamente y no se encuentra influenciado por el genotipo de las células vecinas, sean otras células mutantes o células WT. Por último, en el caso de las flores de la figura 22b, los lóbulos inferiores completamente albinos se interpretan como la ocurrencia de una mutación adicional que elimina totalmente la síntesis de pigmentos antociánicos en ese sector.

Las flores mutantes del subgrupo A<sub>2</sub> se caracterizaron nuevamente por tener un patrón posicional respecto de las nervaduras de manera muy similar al del subgrupo A<sub>1</sub>, aunque en dicho caso el color de fondo fue rosa pálido a diferencia del fondo albino del subgrupo A<sub>1</sub> (Fig. 23). Esto puede explicarse por la acción de un gen de similar acción al del subgrupo A<sub>1</sub> pero que sólo suprime parcialmente la expresión de los pigmentos antociánicos.

Por otra parte, las mutantes del subgrupo A<sub>3</sub> (Fig. 24) se caracterizaron por presentar sectores mutantes del tipo clonal de muy diverso tamaño distribuidos de forma irregular en el limbo de la corola. Este patrón de variegación sugiere ser quimérico y de alta inestabilidad genética; sugiriendo la acción de un elemento móvil activado por la irradiación como argumenta Walbot en maíz (1988). Es interesante notar que en algunos sectores, particularmente los de mayor tamaño (Fig. 24d) se puso de manifiesto el patrón de variegación posicional de similar tipo al descrito en el subgrupo A<sub>1</sub>. Esto sugiere que el gen que está siendo afectado sea el mismo o de similar efecto que el del subgrupo A<sub>1</sub>, pero que en vez de ser afectado por una mutación estable esta siendo afectado por la inserción de un elemento móvil activado por la irradiación. Generalmente las radiaciones producen la rotura y el rearreglo de los cromosomas de manera aleatoria, como ocurre cuando hay presencia de transposones (Gustfsson y Ekberg, 1977b). Este tipo de fenotipo resulta de interés porque permite estudiar el crecimiento de la epidermis en la flor. El tamaño del sector es indicativo del momento en el que se produjo la mutación durante la ontogénesis de la flor. El crecimiento de la epidermis en la flor ocurre desde el ápice hacia la base (Bewley *et al*, 2000) con lo cual sectores

pequeños indican que la mutación ocurrió tardíamente durante el desarrollo de la flor mientras que sectores grandes indican que la mutación ocurrió tempranamente. En este aspecto no sólo el tamaño del sector sino también la posición que ocupa en el limbo da indicios del momento en el que se expresa el evento mutacional y por ende sectores ubicados cerca de la garganta de la flor se originaron más tempranamente que los sectores ubicados cerca de la parte distal de la corola. En *Petunia* (Martín y Gerats, 1993) el estudio de genes involucrados para la síntesis de los pigmentos florales determinó que los pétalos derivan de dos anillos independientes de células meristemáticas localizadas en el borde de la corola; uno de los anillos desarrolla la epidermis adaxial y el otro la epidermis abaxial. Los sectores internos de forma oval revelan que fueron originados de células que mutaron luego de que se separaron del meristema marginal con un número limitado de divisiones luego de la mutación y los sectores que se originaron en células que mutaron cuando aún integraban el anillo meristemático llegaron hasta el margen de la corola presentando morfología triangular con la base sobre el margen de la flor. Otro ejemplo de un comportamiento similar a lo expuesto es el de la mutante *speckled* de *Ipomoea nil* (Japanese morning glory) descrito por Abe *et al.* (1997). La mutante presenta una variegación en las flores del tipo clonal que se encuentra relacionada al gen *speckled* (DFR-B) el cual produce ocasionalmente flores con sectores coloreados sobre un fondo albino por el elemento *Tpn1* que se traspone. La frecuencia y el *timing* de la mutación producto del trasposon durante el desarrollo del pétalo, determina los patrones de variegación (Inagaki *et al.*, 1994). El fenotipo A3 en este trabajo presenta un comportamiento similar a lo expuesto anteriormente y a lo estudiado en *Antirrhinum*, *Zinnia* y *Mirabilis* (Spitters *et al.*, 1975; Epperson y Clegg, 1987; Smith *et al.*, 1988), con un esquema de desarrollo en la epidermis de un alto grado de inestabilidad genética.

En el subgrupo A<sub>4</sub> se agruparon las mutantes que presentaron manchas con diferentes intensidades de color sin mostrar un dibujo sugerente de linaje celular, ni una posición definida con respecto a



las nervaduras o a las diferentes partes de la corola. Por lo antedicho, estas manchas no corresponderían a sectores de diferente constitución genética ni a efectos posicionales relacionados con el desarrollo, sino más bien a efectos de tipo fisiológico. Este fenotipo hace recordar a lo que sucede en el proceso de senescencia a través del cual se dispara un mecanismo particular de muerte celular programada, en la que no hay pérdida de nutrientes sino que hay una re-localización de los mismos en otra parte de la planta (Thompson *et al.*, 2002). La senescencia ocurre naturalmente, pero puede estar inducida prematuramente en respuesta a diferentes tipos de estrés por ejemplo el ambiental (Thompson *et al.*, 2002). La mutante que fue descrita en este trabajo sugiere tener una especie de senescencia anticipada en la corola de la flor.

Las flores del subgrupo A<sub>5</sub> (Fig. 26a,b) presentaron flores de color violeta homogéneo en toda la corola y pigmentación en las nervaduras como se observa en el fenotipo WT. Las flores del subgrupo A<sub>6</sub> también fueron de color homogéneo pero en este caso de color fucsia intenso (Fig. 26c). Con respecto al color de las flores, el pH vacuolar es uno de los reguladores de color que más antiguamente se conoce (Yu *et al.*, 2006). Estudios en el género *Calibrachoa* revelaron que las diferencias en el pH vacuolar del tejido corolino sería el responsable del cambio de color en las flores (Waterworth y Griesbach, 2001; Murakami *et al.*, 2004). En este aspecto los pigmentos antocianicos presentan diferentes rangos de color en soluciones de pH diferente. A pH alcalino, el espectro de absorción de las antocianinas como la cianidina y la delphinidina vira hacia mayores longitudes de onda dando un color más oscuro (Mol *et al.*, 1998). En estudios de células epidérmicas del botón floral de *Ipomoea* se observó que el cambio del color rojo-púrpura del pimpollo al color azul en flor abierta, se debe principalmente a un incremento del pH vacuolar de 6.6 a 7.7 (Asen *et al.*, 1979; Spelt *et al.*, 2002). En el género *Petunia* se observó que las mutantes recesivas en los *loci* ph1 y ph7 regulan el pH celular y producen flores más azules por un

incremento del mismo (Houwelingen *et al.*, 1998). El color de las flores en *Calibrachoa* depende de factores como la calidad y cantidad de antocianidinas y del pH del tejido.

En el Grupo B las mutantes presentaron patrones de variegación clonal de muy diverso tamaño con sectores distribuidos en forma irregular en el limbo de la corola, sugiriendo que la mutante inducida tendría una alta inestabilidad genética. En este sentido el fenotipo presentó características similares al subgrupo A3 por su patrón de variegación; pero adicionalmente al cambio de pigmentación hubo también cambios morfológicos en el contorno y en el ápice de los lóbulos (Fig. 28). El subgrupo B1 presentó sectores mutantes en dos tonos de violeta, además de sectores de color (fucsia) y forma WT (Fig. 28b). El subgrupo B2 presentó sectores mutantes de color rosa sobre un fondo de color rosado. Similarmente a lo que se propone para el subgrupo A3; se supone que la irradiación habría provocado la activación de elementos móviles como fue anteriormente mencionado. A pesar de la alta inestabilidad que sugiere el patrón de variegación observado en todos los casos, los sectores mutantes presentaron asociadas determinadas características de pigmentación y de morfología que hace hipotetizar la posibilidad de que el gen mutado esté afectando tanto la pigmentación como la morfología del lóbulo de la corola. Efectos pleiotrópicos de este tipo han sido comúnmente también observados en mutantes clorofílicas de cebada (Martinez y Favret, 1991).

La diversidad en las formas y en los tamaños de las mutantes correspondientes a los grupos C, D y E, demuestra la posibilidad de variar la morfología de las flores sin cambiar su color (Figs 29, 30 y 31). Este aspecto también se ha observado en los géneros *Gladiolus*, *Bouganvillea*, *Hibiscus*, *Pelargonium* y *Gerbera* entre otros (Datta, 2005; Schum y Preil, 1998). En relación a ello, las mediciones realizadas para los diferentes caracteres de corola sustentan la variabilidad generada en la forma del lóbulo y en el tamaño de flor, siendo el diámetro mayor y el diámetro menor de la flor los caracteres que pueden ser considerados como principales para realizar una distinción

morfométrica entre las flores en cuanto a tamaño. Con respecto a los colores de las flores obtenidas en las mutantes, los mismos variaron entre el violeta, pasando por el fucsia y rosa, hasta el blanco. Es importante mencionar que el color rosa y el color violeta son los colores que presentan las flores de los genotipos parentales del híbrido. La aparición de esta gama de colores en las mutantes podría estar indicando que el genotipo irradiado presenta una constitución heterocigota para el color de la flor. A diferencia de esto, en otros trabajos se encontró que la irradiación de genotipos que presentaban color de flor fucsia o rosa, originaron una gama de colores entre el marrón, naranja, blanco, rojo, amarillo; como en el género *Dendranthema x grandiflorum* (Schum y Preil, 1998). Con respecto a los mecanismos involucrados en la determinación del color final de una flor, se postula la presencia de deleciones lo que originaría *knock outs* génicos resultando en alelos de expresión recesiva (van Harten, 1998) o bloquear diferentes etapas durante la biosíntesis de los flavonoides resultando en el fenotipo encontrado (Nakatsuka *et al.*, 2005). Las mutaciones que originen alelos recesivos en genes que estaban al estado homocigota dominante no se manifestarán en las plantas de la generación M1V1, ni en los individuos derivados vegetativamente de la misma. Sin embargo, sí podrán expresarse aquellas mutaciones, que sin originar un alelo funcional, afecten el alelo dominante de un gen al estado heterocigota, como es el caso del color en el híbrido irradiado. Ejemplos en cebada de la influencia de marcadores clorofílicos con diferente expresión, recesivos o de expresión semidominante y su relación con diferentes tipos de mutágenos pueden encontrarse en el trabajo presentado por Prina y Favret (1988).

- ***Propagación vegetativa y estabilización de los fenotipos mutantes***

En el proceso de mejora a través de mutaciones inducidas, la estabilidad del fenotipo encontrado se evalúa en por lo menos tres propagaciones vegetativas sucesivas (M1V1,...V2 y V3) en donde las características fenotípicas iniciales observadas o por las cuales se diferenció el material debe

conservarse (Tulmann Neto y Latado, 2007). Es importante mencionar que pueden aparecer quimeras periclinales anteriormente no observadas que son “destapadas” durante las sucesivas propagaciones vegetativas (van Harten, 1998). En dicho trabajo los fenotipos encontrados resultaron en quimeras periclinales y no se encontraron fenotipos novedosos posterior a la primera evaluación en las plantas M1V1. Otro aspecto que se encuentra vinculado a la estabilidad del fenotipo es la reversibilidad al fenotipo WT del material seleccionado. En relación a esto, en este trabajo las características de los fenotipos encontrados fueron conservadas en casi el 95% teniendo una muy baja reversión al WT en ciertos fenotipos, lo cual hace suponer que los materiales presentan una alta estabilidad.

- ***Evaluación de las mutantes desde aspectos relativos al genotipo***

Una consecuencia muy frecuente en el uso de la radiación X es la producción de aberraciones cromosómicas que pueden derivar en la generación de genotipos aneuploides (van Harten, 1998; Gustafsson y Ekberg, 1977a). Este tipo de genomas representan un material muy valioso para estudios citogenéticos tales como el estudio de la evolución de los cromosomas, manifestación fenotípica de la pérdida y ganancia de cromosomas, etc (Doležel *et al.*, 2007). En este trabajo se utilizó la técnica de citometría de flujo para detectar posibles aneuploides en las mutantes generadas por los tratamientos (Kawara *et al.*, 1999). La técnica ha sido favorable para detectar cromosomas individuales en arroz (Pfosser *et al.*, 1995), individuos monosómicos en *Triticum aestivum* (Lee *et al.*, 1997), *Asparagus officinalis* (Ozaki *et al.*, 2004) y *Humulus* (Sesek *et al.*, 2000), entre otros.

En este trabajo los valores de intensidad relativa de fluorescencia (muestra/estándar) obtenidos (IRF= 0.36-0.38) presentaron rangos de valores acordes con los obtenidos en estudios previos para el género por Misihiba *et al.* (2000) y se obtuvieron diferencias significativas en la relación

muestra/estándar entre los subgrupos B1, B2, C3 y C4, y por tanto también en las distancias (**D**). Sin embargo los altos valores en los coeficientes de variación obtenidos (CV) no resultaron ser los esperados para determinar precisiones en la muestra ya que para la detección de genotipos aneuploides es recomendable tener CV de 1 o 2 % (Loureiro, 2007, Suda 2004). Sin embargo es menester mencionar que la técnica es una aproximación tentativa a la presencia de genotipos aneuploides y la sospecha de la presencia de tener aneuploides debe ser corroborada o verificada por estudios citológicos (Loureiro, 2007). Cabe mencionar que numerosos factores pueden afectar la calidad de la muestra reflejado en el CV, como la condensación de la cromatina durante el proceso de tinción con DAPI, el desarrollo y el estado metabólico de la muestra y del estándar, la composición citosólica de las células, etc (Doležel y Bartos, 2004), con lo cual se debiera realizar mayores análisis en este aspecto.

Otro factor que se tuvo en cuenta desde el aspecto reproductivo fue la viabilidad del polen en mutantes con potencial ornamental. La radiación reduce la capacidad reproductiva a través del retardo de la floración, la producción de flores sin estructuras reproductivas, la producción de polen infértil, el aborto de embriones, etc (Sparrow, 1961) y en la gran mayoría de los casos la esterilidad inducida en las gametas se debe a las aberraciones cromosómicas mayoritariamente inversiones que se producen (Gaul, 1977; Gustafsson y Ekberg, 1977b). En dicho trabajo se detectó una mutante con 100 % de inviabilidad en los granos de polen. En las plantas ornamentales la esterilidad en las flores es un carácter favorable ya que la duración de la flor es mayor como ha sido observado en flores de *Verbena*, en las que mutantes estériles presentaron un periodo de floración tres veces mayor que el control (Abe *et al.*, 2009). Es importante mencionar que el análisis de viabilidad del polen permite evaluar a las mutantes desde el aspecto reproductivo con vistas a ser incluidas en futuros planes de mejora. Sumado a ello también se tuvo en cuenta la capacidad reproductiva de las mutantes en su parte femenina. Los cruzamientos dirigidos pudieron informar acerca de las capas

histogénicas afectadas. La capa histogénica responsable de originar los órganos reproductivos en el meristema es la capa L2 (Lineberger, 2008). Los cambios genéticos que se produzcan en la misma son los únicos que pueden ser transmitidos a la siguiente generación sexual a través de las gametas y en las plantas de propagación por semilla las mutaciones germinales serán detectadas en la generación M2 de autofecundación (van Harten, 1998; Prina *et al.*, en prensa). En *Calibrachoa*, tal como ocurre en otros géneros pertenecientes a la familia de las solanaceas se presenta una auto-incompatibilidad gametofítica (Tsukamoto *et al.*, 2002, Robbins *et al.*, 2000). Dicha auto-incompatibilidad es determinada por las gametas y particularmente por el genotipo haploide del locus *S* del polen (Bewley, 2000). Estudios en poblaciones naturales de *Petunia axillaris* han reportado la ruptura del mecanismo de auto-incompatibilidad por medio de una mutación que afecta a los granos de polen (Tsukamoto *et al.*, 2003). Sin embargo en este trabajo de tesis la no obtención de frutos en las autofecundaciones de las plantas mutantes y en los cruzamientos dirigidos con el genotipo WT sugieren que estaría activo el mecanismo de auto-incompatibilidad y que no fue afectado por la radiación. Los cruzamientos dirigidos entre las mutantes y un hermano entero del WT revelan que las mutantes son fértiles en su parte femenina con la producción de frutos y semillas. Sin embargo una mutante del subgrupo D1, en la cual el cruzamiento no produjo formación de frutos y por ende tampoco semillas presenta esterilidad en su parte femenina y masculina, como se mencionó anteriormente. Stadler (1930) menciona en estudios de maíz tratado con radiación X que la esterilidad puede presentarse tanto en la parte masculina como en la femenina.

- ***Evaluación de mutantes en relación a su potencialidad ornamental***

Finalmente, con el objetivo de conocer otros aspectos relacionados al potencial ornamental se evaluó la arquitectura de la planta y la intensidad de floración. La compactidad es una de las

características que definen el valor ornamental en las plantas en maceta. Una mayor compacidad está directamente relacionada a una alta ramificación y un menor largo de entrenudos. En este sentido la técnica de mutagénesis ha sido utilizada para ampliar la variabilidad genética con el objetivo de seleccionar genotipos compactos para un cultivo en maceta sin la necesidad de aplicar retardadores de crecimiento de naturaleza tóxica y ecológicamente no deseados (Schum y Preil, 1998). En este aspecto se han generado mutantes de entrenudos más cortos y/o con mayor número de ramas por nudo como en *Zinnia*, *Lantana depressa*, *Kalanchoe*, *Tibouchia* (Venkatachalam y Jayabalan, 1991; Broertjes y van Harten, 1998; Schum, 2005) estando la ramificación en una planta definida genética y ambientalmente (Simons *et al.*, 2006; Rosin *et al.*, 2003). En este estudio se pudo detectar una mutante que desarrolló entre 3 a 4 brotes axilares en una bandeja multicelda que comúnmente se utiliza en la producción de esquejes, superando a otras de las mutantes evaluadas y al clon WT que presenta 2 brotes como fue observado por Facciuto *et al* (2009). Dicha mutante será evaluada como planta en maceta en ensayos futuros.

Otro de los atributos importantes en las plantas ornamentales es la capacidad de floración o intensidad de floración, la cual se evaluó en dos formas de cultivo (en maceta y en cantero). Estas dos formas de cultivo representan dos situaciones reales que sirven para evaluar el comportamiento y el potencial del material, sumado al hecho de que el seguimiento de la floración es una indicación del período en el que pueden ser utilizadas las plantas por el sector productivo y por el consumidor (Nau, 2006). Los materiales mutantes evaluados presentaron una mayor fluctuación en el número de flores producidas en el cultivo en maceta que en el cultivo en cantero. Este hecho puede deberse a que las condiciones ambientales en el cultivo bajo invernáculo son de mayor control y protección que en el cantero y por lo tanto esto puede favorecer una floración tardía a los 63 días en las mutantes 1 y 3, hecho que no fue observado en el cultivo a campo. En cuanto a los materiales evaluados, el genotipo mutante 2 presentó un comportamiento muy similar en una y en otra

condición (Fig. 5a,b) y que a pesar de que no se realizó un estudio de interacción genotipo-ambiente, podría llegar a ser un material que se encuentra poco influenciado por el ambiente o de comportamiento homogéneo en diversos ambientes. La evaluación de las mutantes con el clon de referencia o testigo sirvió para comparar los materiales mutantes seleccionados, aunque estos últimos presentaron un menor número de flores en promedio que el clon de referencia. En general los materiales presentaron un comportamiento muy similar a dicho clon en cuanto a la dinámica de la floración. Este aspecto es muy importante en las plantas ornamentales cuando se evalúan los materiales en ensayos como *field trail* y/o *pot trail*, en los que es necesario una homogeneidad en el *timing* de la floración para que puedan todos los materiales puedan ser comparados, evaluados y categorizados por los mejoradores en un mismo momento (Bennett P, 2005).



## 5. CONCLUSIONES

- 1- La elección de la DLM como dosis base para la realización de los tratamientos mutagénicos resultó muy efectiva ya que permitió efectivamente la recuperación del material, obteniéndose gran cantidad de material experimental mutagenizado con un alto número de mutantes inducidas al mismo tiempo.
- 2- Por otro lado; la diferencia observada en los efectos letales de una misma dosis de rayos X aplicada de dos formas distintas (1 aplicación ó 3 aplicaciones), indica que el concepto de DLM es una aproximación tentativa a través de la cual se puede inducir cambios en el material irradiado.
- 3- Las diferencias observadas en las distintas posiciones del brote para los efectos deletéreos de los rayos X, fue interpretada en base a las diferencias fisiológicas que existen entre las posiciones, siendo los brotes apicales los que presentaron mayor sensibilidad a los rayos X con respecto a los brotes basales. Esto es atribuido a que los brotes apicales se encuentran más activos fisiológicamente por el fenómeno de dominancia apical, y por tanto el efecto letal del mutágeno en los mismos es mayor.
- 4- En este trabajo la letalidad celular inducida por los tratamientos con radiaciones ionizantes pudo ser utilizada para originar nueva variabilidad a partir de yemas, el reemplazo de una capa por otra de diferente constitución genética puede tener consecuencias fenotípicas.
- 5- El tratamiento de dosis fraccionada resultó el tratamiento de menor efecto letal y mayor número de mutantes inducidas. En dicho tratamiento, existiría una recuperación de los efectos deletéreos de los rayos X, que traducidos en pequeños cambios, dan como resultado un número mayor de mutantes.

- 6- Las mutantes obtenidas fueron para características de flor y por tanto de fácil evaluación visual. Los cambios fenotípicos conspicuos permitieron clasificarlas en distintos grupos y subgrupos.
- 7- La aparición de los fenotipos parentales en el color de las flores mutantes (color rosa o violeta) hace conjeturar la presencia de genes en estado heterocigota en el espectro de las mutaciones somáticas. Estas diferencias en el color de flor se explicarían a través de las diferencias en el pHs vacuolar de la célula según el genotipo.
- 8- La obtención de plantas con variegación clonal (plantas quiméricas) permitió evaluar la evolución de los sectores mutantes a través del tamaño y dibujo de los mismos. Las mutantes del subgrupo A3 y del grupo B, resultaron sumamente interesantes; ya que a partir de las mismas se hipotetiza la activación de elementos móviles que sería evidenciado por la presencia de sectores clonales de muy diverso tamaño originados en distintos momentos del desarrollo.
- 9- La alta frecuencia de aparición del fenotipo estrella, no observado en los clones parentales; hace pensar que se trata de un genotipo con un alelo mutante de expresión dominante o semidominante. La presencia de este patrón de variegación posicional en forma estable (subgrupo A1) o altamente inestable (subgrupo A3) hace pensar que el mismo gen podría haber sido afectado de forma diferente en uno y otro caso, por una mutación estable en el primer caso o por un elemento móvil en el segundo.
- 10- Queda por tanto demostrado que tratamientos mutagénicos con rayos X en yemas del género *Calibrachoa* permite obtener mutantes con potencial valor ornamental en diversas características de flor, como variantes de coloración homogénea o variegadas (con patrones clonales, posicionales o sin patrones definidos) asociadas o no a cambios de la morfología.

## APÉNDICE I

El material utilizado en este trabajo se obtuvo a partir del cruzamiento dirigido entre la especie *Calibrachoa excellens* (Cod: 20030924H1) y la variedad comercial “Dark Blue”. Ambos padres forman parte de la colección de *Calibrachoa* que se conserva *in vivo* en el Instituto de Floricultura (IF) INTA-Castelar.

El código 20030924 H1 de la especie de *Calibrachoa excellens* es un código interno del IF que describe el año, el mes y el día de recolección del material, seguido por una letra la cual se asocia al lugar físico de la recolección (código de ubicación o parada) y un número correlativo relacionado a la colecta de dicha parada. Este código es único de cada material recolectado.

Las plantas de la colección se mantienen *in vivo* en invernáculo con control de temperatura mínima (15° C) y periódicamente se realizan tareas de mantenimiento como podas, cambio de sustrato y propagación vegetativa para el rejuvenecimiento del material. Dentro de las prácticas de manejo se realiza una fertilización semanal con un producto comercial (Hakaphos rojo) que contiene N:P:K 18:18:18 a la concentración de 100 ppm. El sustrato que se emplea para el cultivo de segmentos nodales en cámara de cría presenta los siguientes componentes: vermiculita (mineral químicamente inerte, absorbente de humedad), perlita (material inerte) y turba rubia (material orgánico rico en carbono) en proporción 1:1:1. En el cultivo de plantas en maceta se utiliza pinocha (mezcla de hojas o acículas de pino deciduas), resaca (residuo vegetal de río originado bajo condiciones anaeróbicas) y tierra; presentando el sustrato una conductividad de 0,324 S/cm y un pH de 5,1 - 5,6.

## APÉNDICE II

La mutagénesis es el proceso a través del cual se inducen las mutaciones, entendiéndose a la mutación como un cambio heredable en la constitución idiopática del tejido esporofítico o gametofítico de una planta, no causado por recombinación génica o segregación (van Harten, 1998 Poner otra cita). La mutagénesis inducida generalmente provoca alteraciones en los cromosomas como fragmentaciones, deleciones, inversiones, duplicaciones, translocaciones, fusiones, cambios en el número de cromosomas, sustitución de bases nucleotídicas, etc.

Los agentes mutagénicos más utilizados son de naturaleza química y/o física. Entre los mutágenos químicos, los más conocidos son la colchicina ( $C_{22}H_{25}NO_6$ ), el EMS (Etil-metano-sulfonato) y la SA (ázida sódica) entre otros. Entre los mutágenos físicos se encuentran los rayos X, rayos  $\delta$ , neutrones, partículas  $\beta$ , partículas  $\alpha$ , protones y deuterones. En la tabla 1 se presentan algunas de las principales propiedades de los mutágenos físicos.

Tabla 1. Propiedades de los diferentes tipos de radiación en la mutagénesis artificial.

Tipo de Radiación	Fuente	Descripción	Penetración en el Tejido*
Rayos X	Máquina de rayos X	Radiación electromagnética	Desde milímetros hasta algunos centímetros
Rayos $\delta$	Radioisótopos y Reactores nucleares	Radiación electromagnética similar a los rayos X	Muchos centímetros
Neutrones (low, fast y térmicos)	Reactores nucleares y aceleradores	Partícula sin carga levemente más pesada que el protón, no visible excepto a través de la interacción con el núcleo en el material que atraviesa	Muchos centímetros
Partículas $\beta$ , Electrones rápidos, Rayos catódicos	Radioisótopos y aceleradores	Electrón (+ o -) de menor ionización que la partícula $\alpha$	Hasta algunos milímetros
Partículas $\alpha$	Radioisótopos	Núcleo de Helio alta ionización	Pequeña porción de un milímetro
Protones, Deuterones†	Reactores nucleares y aceleradores	Núcleo de Hidrógeno	Hasta algunos centímetros

\*La penetración depende de muchas variables; se asume al tejido de la planta con una densidad media.

†Núcleo pesado de un isótopo de hidrógeno (del Manual on Mutation Breeding, 1977)

## Etapas en el mejoramiento de plantas a través de mutagénesis inducida por radiación X:

### 1) *Determinación de la Dosis Letal media en el material experimental*

Uno de los primeros pasos en mutagénesis para la inducción artificial de mutaciones es realizar ensayos preliminares para cuantificar el efecto letal del mutágeno (Fereol *et al.*, 1996). Los ensayos de radiosensibilidad son la base para planificar y programar los tratamientos mutagénicos. El efecto letal del mutágeno se determina luego de que el material experimental fue expuesto a diferentes dosis de radiación (dosimetría).

La Dosis Letal Media (DLM) es la dosis en la cual el 50% del tejido sobrevive ( $N^\circ$  de tejido vivo /  $N^\circ$  total de tejido irradiado) y se estima a través de la tasa de germinación en semillas, producción de propágulos, desarrollo de brotes, regeneración de callos, etc; pos-irradiación. El retardo en la división mitótica puede ser tomado también como parámetro de radiosensibilidad en etapas tempranas de división de la célula (Ahnström, 1977). Generalmente la dosis de radiación que más se utiliza en tratamientos mutagénicos con radiación X es la DLM.

### 2) *Inducción de Mutantes*

En el mejoramiento por inducción artificial de mutantes, dosis óptimas de radiación serían aquellas que generaran una alta tasa de mutación con un bajo daño fisiológico (Fuchs, 2002). Los tratamientos de irradiación más utilizados en los programas de mutagénesis son la irradiación aguda (*acute dose*) en el cual la dosis se aplica en una sola exposición a la tasa de dosis más alta; y la irradiación crónica en la que la dosis es administrada en el tiempo a la tasa de dosis menor (e.j. dosis total de 100 Gy a la tasa de dosis de  $1\text{Gy} \cdot \text{día}^{-1}$ ). La dosis fraccionada (*split dose*) es un tipo de irradiación crónica que se administra en intervalos de tiempo a modo de dosis divididas. Este tipo de dosis llevan a la ocurrencia del fenómeno de “recuperación” en el cual el daño biológico se reduce marcadamente a través de la activación de mecanismos de reparación del ADN durante las intermitencias o intermisiones de radiación (van Harten, 1998).

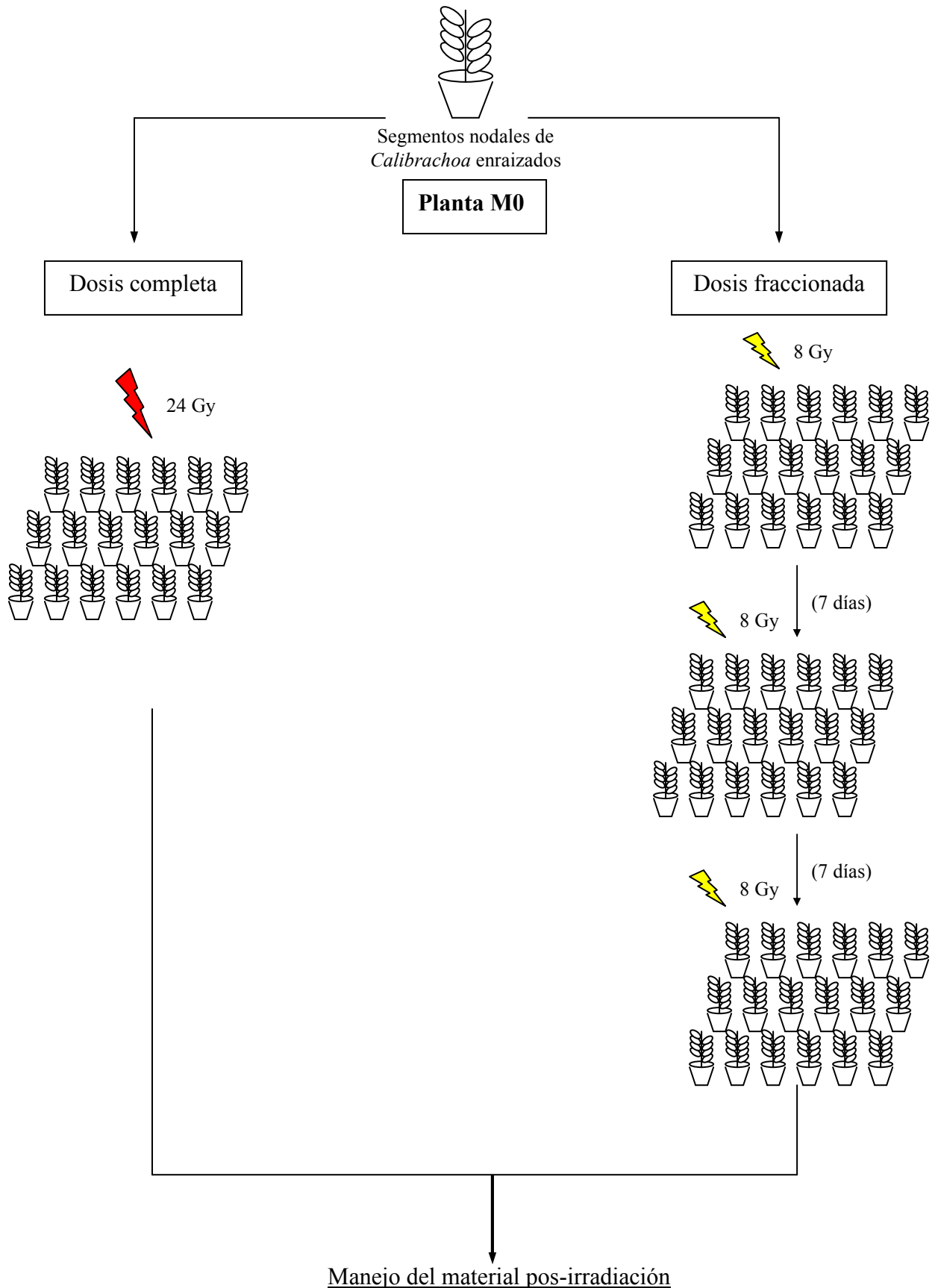
### 3) *Identificación de las mutantes putativas*

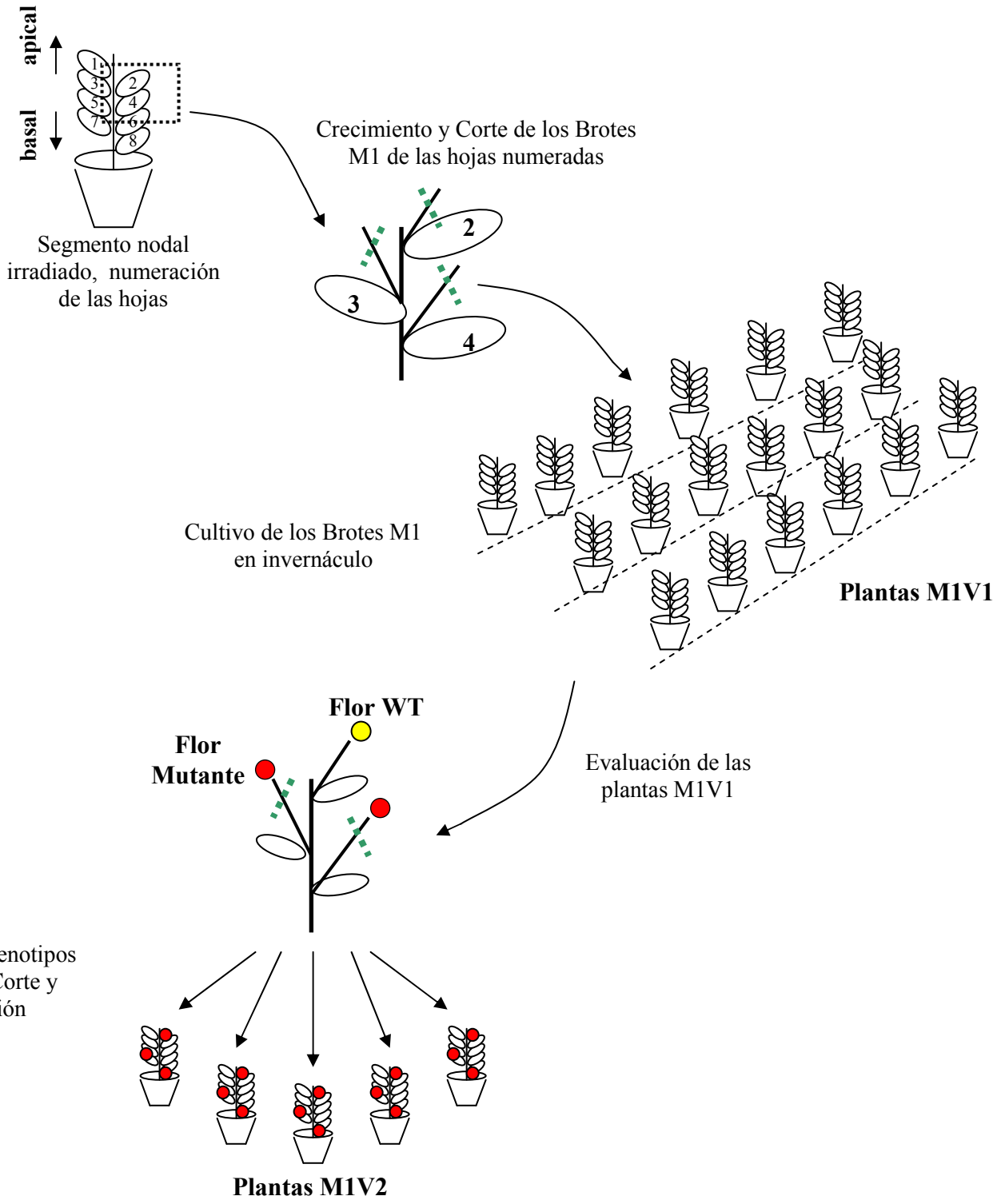
Posteriormente al tratamiento mutagénico, la identificación y la selección de las mutantes se realiza en base a los objetivos planteados en el plan de mejoramiento (Tulmann Neto y Latado, 2007) sea en la búsqueda de nueva variabilidad para un determinado carácter como color de flor, hábito de crecimiento, resistencia a patógenos o herbicidas, etc. En los cultivos de propagación agámica, las mutantes somáticas son identificadas tempranamente en la generación M1V1; es decir que la identificación de las mutantes se realiza en las plantas de la primera propagación vegetativa (V1) a partir de las plantas que fueron irradiadas (M1). Generalmente la identificación se realiza en plantas M1V1 quiméricas, debido a la constitución multicelular del tejido que fue tratado en los tratamientos mutagénicos. Luego de la identificación de la/las ramas de fenotipo diferente, en el caso de las plantas de propagación vegetativa, estas mismas deben ser propagadas agámicamente o separadas de la planta quimérica para que pueda evaluarse la estabilidad del fenotipo encontrado.

### 4) *Evaluación de la estabilidad de las mutantes*

A partir de la identificación de las mutantes inducidas artificialmente, se debe hacer una evaluación de estabilidad durante por lo menos tres propagaciones vegetativas sucesivas; en donde las características fenotípicas deben mantenerse y ser conservadas; ya que pueden aparecer quimeras periclinales que son “destapadas” durante las diferentes propagaciones vegetativas u ocurrir reversiones al fenotipo WT; por lo que, el seguimiento constante de los materiales debe realizarse diariamente.

Esquema de irradiación (tratamientos) y manejo del material pos-tratamiento para la inducción de mutantes







### APÉNDICE III

Se presenta en este anexo el descriptor elaborado para el género *Calibrachoa* y los datos del clon seleccionado “Wagülen rosa” a los fines de su inscripción en el Registro Nacional de Cultivares, INASE.

Para obtener el Título de Propiedad, la nueva variedad debe reunir los siguientes requisitos: debe ser diferente, homogénea y estable; debe cumplir con la condición de novedad (comercial) y contar con una denominación adecuada. Tanto la información que se solicita como el análisis de la misma tienden a verificar el cumplimiento de estas condiciones y requisitos(<http://www.inase.gov.ar/tikiwiki/tiki-dex.php?page=inseRNPC>).

La nueva variedad a presentar debe demostrar ser diferente a todas las variedades que se encuentran en el mercado en, al menos, una característica. También debe presentar estabilidad genética, es decir no manifestar cambios en las sucesivas multiplicaciones.

Para cumplimentar estos requisitos se deben completar los siguientes documentos:

- 1- *Declaración Jurada de solicitud de inscripción;*
- 2- *Anexo I;* Datos del Solicitante.
- 3- *Anexo II;* Descripción de la variedad;
- 4- *Anexo III;* Fundamentación de la Novedad;
- 5- *Anexos IV a, IV b y IV c;* correspondientes al pocedimiento para el mantenimiento de la pureza varietal; origen genético-método de obtención e historia del mejoramiento de la variedad; y condición OGM de la variedad, respectivamente.

**REGISTRO NACIONAL DE LA PROPIEDAD DE CULTIVARES  
Y REGISTRO NACIONAL DE CULTIVARES**

**DESCRIPTOR DE: Calibrachoa**

**NOMBRE PROPUESTO: Wangülen rosa**

**La siguiente descripción corresponde a observaciones efectuadas en:**

**PROVINCIA: Buenos Aires**

**LOCALIDAD: Hurlingham**

**LATITUD: 58° 39' Oeste**

**LONGITUD: 34° 4' Sur**



**01. PLANTA: PORTE**

**1**

- 1 : ERECTO                   {SUNBELBU}
- 2 : TREPADOR                {SUNBEKUBU}

**02. (\*) PLANTA: ALTURA**

**7**

- 1 :
- 2 :
- 3 : BAJA                    {LAZZPERSA}
- 4 :
- 5 : INTERMEDIA            {SUNBELPI}
- 6 :
- 7 : ALTA                    {SUNBELBU}
- 8 :
- 9 :

**03. (\*) (+) BROTE: LONGITUD**

**8**

- 1 :
- 2 :
- 3 : CORTO                 {SUNBELBU}
- 4 :
- 5 : MEDIO                 {LAZZPERSA}
- 6 :
- 7 : LARGO                 {KLEC00070}
- 8 :
- 9 :

**04. (\*) LIMBO: LONGITUD**

**8**

- 1 :
- 2 :
- 3 : CORTO                 {KIECABUL}
- 4 :
- 5 : MEDIO                 {KLEC00070}
- 6 :
- 7 : LARGO                 {SUNBELCHIPI}
- 8 :

9 :

05. (\*) LIMBO: ANCHURA

9,46  
(mm)

1 :

2 :

3 : ESTRECHO

4 :

5 : MEDIO {LAZZPERSBON}

6 :

7 : ANCHO {SUNBELKUOPI}

8 :

9 :

06. (+) LIMBO: FORMA DEL APICE

2

1 : AGUDO ESTRECHO {KLEEC00070}

2 : AGUDO ANCHO {SUMBELCHIPI}

3 : OBTUSO

07. (\*) LIMBO: VARIEGADO

1

1 : AUSENTE

2 :

3 :

4 :

5 :

6 :

7 :

8 :

9 : PRESENTE

08. (\*) SOLO VARIEDADES NO VARIEGADOS  
LIMBO: COLOR VERDE DEL HAZ

5

1 :

2 :

3 : CLARO {SUNBELKUOPI}

4 :

5 : MEDIO {SUNBELCHIPI}

6 :

7 : OSCURO

8 :  
9 :

**09. PECIOLO: LONGITUD**

1

1 : AUSENTE O MUY CORTO  
2 :  
3 : CORTO  
4 :  
5 : MEDIO  
6 :  
7 : LARGO  
8 :  
9 :

**10. PEDICELO: LONGITUD**

3

1 :  
2 :  
3 : CORTO {SUNBELBU}  
4 :  
5 : MEDIO {SUNBELKUBU}  
6 :  
7 : LARGO {SUMCALI 01}

**11. (\*) (+) SEPALO: LONGITUD**

5

1 :  
2 :  
3 : CORTO {SUNBELKUOPI  
  
4 :  
5 : MEDIO {SUNBELKUBU}  
6 :  
7 : LARGO {SUNBELPI}  
8 :  
9 :

**12. (\*) (+) SEPALO: ANCHURA (PARTE LARGA NO SOLDADA)**

5

1 :  
2 :  
3 : ESTRECHO { SUNBELPI }  
4 :  
5 : MEDIO { SUNBELKUBU }  
6 :  
7 : ANCHO {KLEC99R14}  
8 :  
9 :

**13. SEPALO: PIGMENTACION ANTOCIANICA**

**1**

1 : AUSENTE {SUNBELKUHO}  
2 :  
3 :  
4 :  
5 :  
6 :  
7 :  
8 :  
9 : PRESENTE {LAZZPERSA}

**14. (\*) FLOR: TIPO**

**1**

1 : UNICO  
2 : DOBLE

**15. (\*) (+) FLOR: DIAMETRO**

**5**

1 :  
2 :  
3 : PEQUEÑO {SUNBELBU}  
4 :  
5 : MEDIO {SUMCALI}  
6 :  
7 : GRANDE {KLEC99R14}  
8 :  
9 :

**16. (+) FLOR: GRADO DE LOBULADO**

6

1 :  
2 :  
3 : DEBIL  
4 :  
5 : MEDIO  
6 :  
7 : FUERTE  
8 :  
9 :

**17. (\*)LOBULO DE LA COROLA:NUMERO DE COLORES DE LA PARTE SUPERIOR (EXCLUYENDO LOS NERVIOS)**

1

1 : UNO  
2 : DOS  
3 : MAS DE DOS

**018. (\*)LOBULO DE LA COROLA: COLOR PRINCIPAL DE LA PARTE SUPERIOR**  
RHS COLOR {INDICAR NUMERO DE REFERENCIA Y COLOR}

W 155C

**019. (\*)SOLO PARA VARIEDADES BICOLORES Y MULTICOLORES**  
**LOBULO DE LA COROLA: COLOR SECUNDARIO DE LA PARTE SUPERIOR (como para 17)**

RHS COLOR {INDICAR NUMERO DE REFERENCIA Y COLOR}

**020. SOLO PARA VARIEDADES MULTICOLORES**  
**LOBULO DE LA COROLA: COLOR TERCARIO DE LA PARTE SUPERIOR (como para 17)**

RHS COLOR {INDICAR NUMERO DE REFERENCIA Y COLOR}

**021. (\*)LOBULO DE LA COROLA: EVIDENCIA DE LOS NERVIOS DE LA PARTE SUPERIOR**

1

1 : AUSENTE O MUY DEBIL        {SUNBELKUHO}  
2 :  
3 : DEBIL                        {SUNBELKUBU}  
4 :  
5 : MEDIA                        {LAZZPERSA}  
6 :  
7 : FUERTE                      {KLEC00070}  
8 :  
9 : MUY FUERTE

**022. LOBULO DE LA COROLA: COLOR PRINCIPAL DE LA PARTE INFERIOR**  
RHS COLOR {INDICAR NUMERO DE REFERENCIA Y COLOR}

W 155C

**023. (+)LOBULO DE LA COROLA: FORMA DEL APICE**

1 : CUSPIDADO  
2 : REDONDEADO  
3 : TRUNCADO  
4 : EMARGINADO

**024. (+) TUBO DE LA COROLA: LONGITUD MAXIMA**

5

1 :  
2 :  
3 : CORTO  
4 :  
5 : MEDIO



6 :  
7 : LARGO  
8 :  
9 :

025. (+)TUBO DE LA COROLA: COLOR PRINCIPAL DE LA PARTE INTERNA

RHS COLOR {INDICAR NUMERO DE REFERENCIA Y COLOR}

**W 155C**

026. TUBO DE LA COROLA: EVIDENCIA DE LOS NERVIOS DE LA PARTE INTERNA

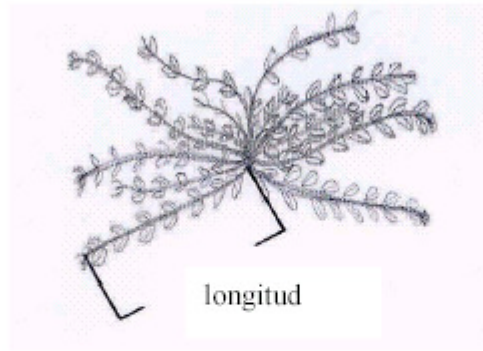
**1**

1 : AUSENTE O MUY DEBIL  
2 :  
3 : DEBIL  
4 :  
5 : MEDIO

6 :  
7 : FUERTE  
8 :  
9 : MUY FUERTE

---

Ad. 3: Brote: longitud



Ad. 6: Limbo: forma del ápice



1  
agudo estrecho



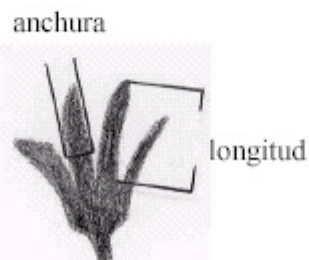
2  
agudo ancho



3  
obtusó

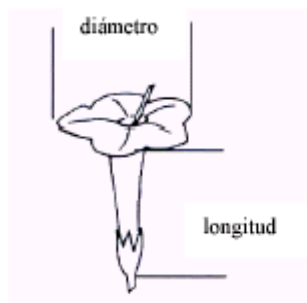
Ad. 11: Sépalo: longitud

Ad. 12: Sépalo: anchura

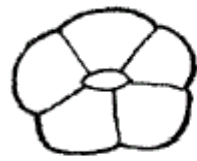


Ad. 15: Flor: diámetro

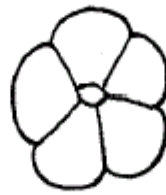
Ad. 24: Tubo de la corola: longitud máxima



Ad. 16: Flor: grado de lobulado



3  
débil



5  
medio



7  
fuerte

Ad. 23: Lóbulo de la corola: forma del ápice



1  
cuspidado



2  
redondeado



3  
truncado



4  
emarginado

## 7. Bibliografia

**Abe T, Yoshida S, Fukunishi N, Ryuto H, Suzuki K (2009)** The Ion-Beam breeding makes great success in plant business.

[http://accelconf.web.cern.ch/AccelConf/c04/data/CYC2004\\_papers/19B2.pdf](http://accelconf.web.cern.ch/AccelConf/c04/data/CYC2004_papers/19B2.pdf)

**Abe Y, Hoshino A, Iida S (1997)** Appearance of flower variegation in the mutable speckled line of the Japanese morning glory is controlled by two genetic elements. *Genes Genetics Syst.* 72:57-62

**Ahloowalia BS, Maluszynski M (2001)** Induced mutations- A new paradigm in plant breeding. *Euphytica*. Vol 118 (7)

**Ahnström G (1977)** Radiobiology. En: Manual on Mutation Breeding. 2° edition. International Atomic Energy Agency. pp:21-29

**Ando T, Nomura M, Tsukahara J, Watranabw H, Kokubun H, Tsukamoto T, Hashimoto G, Marchesi E, Kitching IJ (2001)** Reproductive Isolation in Native of *Petunia sensu* Jussieu (Solanaceae). *Annals of Botany* 88: 403-413

**Ando T, Kokubun H, Watanabe H, Tanaka N, Yukawa T, Hashimoto G, Marchesi E, Suárez E, Basualdo I (2005)** Phylogenetic Analysis of *Petunia sensu* Jussieu (Solanaceae) using Chloroplast DNA RFLP. *Annals of Botany* 96: 289-297.

**Asen S, Stewart RN, Norris JH (1979)** Pelargonidin 3-di (p-hydroxybenzoyl) rutinoside-7-glucoside from flowers of *Campanula*. *Phytochemistry* 18, 1251-1252.

**Bennet PJ (2005)** Ohio State University Extension Gateway Learning Gardens 2005 Herbaceous Ornamental Field Trail Results. Eds. Chatfield JA, Draper EA, Dyke DE, Bennet PJ, Boggs JF. The Ohio State University. OARDC

- Bewley DJ, Hempel FD, McCormick S, Zambryski P (2000)** Reproductive Development. En: B. Buchanan, W. Goltsmen, R. Jones, Eds. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists.
- Briggs RW, Constantini MJ (1977)** Radiation types and radiation sources. En: Manual on Mutation Breeding. 2° edition. International Atomic Energy Agency. pp:7-20
- Briggs RW, Konzak CF (1977)** Objects and methods of treatment. En: Manual on Mutation Breeding. 2° edition. International Atomic Energy Agency. pp:33-39
- Britt AB (1999)** Molecular genetics of DNA repair in higher plants. Trends in plant science. Vol 3 N° 1 pp 20-25.
- Broertjes C (1968)** Mutation breeding of vegetatively propagated crops. Proc. 5 th Eucarpia Congr. (Milan, Italy): 139-165
- Broertjes C (1976)** Mutation breeding of autotetraploid Achimes cultivars. En: Improvement of Vegetatively Propagated Plants and Tree Crops through Induced Mutations (Proceeding Second FAO/IAEA Research Coordination Meeting, Wageningen, The Netherlands), pp1-12. IAEA-TEDOC-194. Vienna: IAEA
- Broertjes C, van Harten AM (1988)** Applied Mutation Breeding for Vegetatively Propagated Crops. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York Tokio.
- Broertjes C, Verboom H (1974)** Mutation Breeding of *Alstroemeria*. *Euphytica* 23: 39-44.
- Cortizo S, Padovan A, Simón G, Bartoloni N, Frayssinet N (2003)**. Daño Fisiológico producido por radiaciones gamma en *Cissus rhombifolia* cv Mandaina. En: Floricultura en la Argentina-Investigación y Tecnología de Producción. Eds. L Mascarini, F Vilella, E Wriugh. Facultad de Agronomía-Universidad de Buenos Aires. Argentina.
- D'amato F (1965)** Chimera formation in mutagen-treated seeds and diplontic selection. En: The use of induced mutations in Plant Breeding. Proc. Meet FAO/IAEA, Roma, pp. 3-16

- D'amato F (1986)** Spontaneous mutations and somaclonal variation. En: Nuclear Techniques and In Vitro Culture for Plant Improvement. Proc. FAO/IAEA Symposium, Vienna 1985. IAEA, Vienna pp 3-10.
- Datta SK, Chakrabarty D (2005)** Classical Mutation Breeding and Molecular Methods for Genetic Improvement of Ornamentals. En: S. K. Datta, Eds. Role of Classical Mutation Breeding. pp 260-303
- Doležel J, Bartos J (2004)** Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genoma Size. *Annals of Botany* 95:99-110
- Doležel J, Greilhuber J, Suda J (2007)** Flow Cytometry with Plants: an Overview. Capítulo 3. En: J Dolezel, J Greilhuber y J Suda, Eds. Flow Cytometry with Plant Cells –Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes. pp 41-65
- Donini S, Micke (1984)** En: Posição da gem axilar e a indução de mutação em mudas de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev), Adames AH, Latado RR, Camargo NM, Tulmann Neto A. [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-90161999000400022](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90161999000400022)
- Epperson BK, Clegg MT (1987)** Instability at the flower locus in the morning glory. *Journal Heredity* 78:345-352
- Esau K (1985)** Anatomía Vegetal. Ed. Omega.
- Facciuto G, Pannunzio MJ, Coviella MA, Bologna P, Soto S, Imhof L, Borja M (2009)** *Calibrachoa* Breeding Advances in Argentina. *Acta Horticulturae* 813: 121-126.
- Fereol L, Louis S, Luce L (1996)** Effects of gamma radiation on in vitro plantlets of *Alpinia purpurata*. *Journal of Horticultural Science* 71(2): 243-247.
- Fuchs M, González V, Castroni S, Díaz E, Castro L (2002)** Efecto de la radiación Gamma sobre la diferenciación de plantas de caña de azúcar a partir de callos. *Agronomía Tropical* 52(3):311-323

- Fujii T, Matsubara S (1958)** Radiosensitivity in plants I. Determination of LD-50 in cultivated plants (Preliminary report). National Institute of Genetics, Japan Vol. 33 No.12, 299-397.
- Gaul H (1964)** Mutations in Plant Breeding. *Radiation Botany*. Vol 4: 155-232
- Gaul H (1977)** Sterility. En: Manual on Mutation Breeding. 2° edition. International Atomic Energy Agency. pp:96-97
- Gennarelli MC, Hagiwara JC, Tosto D, Álvarez MA, Borja M, Escandón AS (2009)** Genetic transformation of *Calibrachoa excellens* via *Agrobacterium rhizogenes*. Changing morphological traits. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 84(3) 305-311.
- Greissl R (1989)** Vitality analysis of monadic and polyadic pollen grains using optical contrast-fluorescence microscopy. *Scientific and Technical Information* 15:180-184
- Gustafsson A, Ekberg I (1977a)** Genome Mutations. En: Manual on Mutation Breeding. 2° edition. International Atomic Energy Agency. pp:108-176
- Gustafsson A, Ekberg I (1977b)** Chromosome mutations: Changes in chromosomes, generally without alteration of chromosome number. En: Manual on Mutation Breeding. 2° edition. International Atomic Energy Agency. pp:108-176
- Hagiwara JC, Kato A, Mori M, Miyajima I (2002)** Obtención de poliploides en *Calibrachoa pygmaea* mediante el uso de colchicina in vitro. 1<sup>er</sup> Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales. Buenos Aires 13-16 de noviembre 2002.
- Horn W (2002)** Breeding Methods and Breeding Research. En: Alexander Vainstein, Ed. Breeding for Ornamentals: Classical and Molecular Approaches. Kluwer Academic Publishers. pp: 47-83
- Houwelingen Av, Johzuka-Hisatomi Y, Iida S (1998)** Analysis of flower pigmentation mutants generated by random transposon mutagenesis in *Petunia hybrida*. *Plant Journal* 13: 39-50

- Hunter RS (1958)** Photoelectric color difference meter. *Journal Optical Society of America* 48:985-995.
- Inagaki Y, Hisatomi Y, Suzuki T, Kasahara K, Iida S (1994)** Isolation of a *Supresor-Mutator/Enhancer*-like Transposable Element, *Tpn1*, from Japanese Morning Glory Bearing Variegated Flowers. *The Plant Cell*, Vol 6:375-383
- Jain MS (2006)** Mutation-Assisted Breeding for Improving Ornamental Plants. *Acta Horticulturae* 714: 85-98.
- Kastembaum MA, Bowman KO (1970)** Tables for determining the statistical significance of mutation frecuencies. *Mutation Researh* 9: 527-579
- Kawara S, Takata M, Takehara K (1999)** En: Doležel J y Bartos J., Eds. Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. *Annals of Botany* 95: 99-110
- Kessler JK (2002)** 2002 Summer Trial Garden Result.  
[http://www.aces.edu/departament/com\\_veg/trials/raymond1.html](http://www.aces.edu/departament/com_veg/trials/raymond1.html)
- Kirk JTO, Tilney-Bassett RAE (1978)** The Plastids. Elsevier, North-Holland, Amsterdam.
- Lea DE (1955)** Actions of Radiation on Living Cells. The University Press, Cambridge, pp. 416
- Lee JH, Yen Y, Arumugabathan K, Baenziger PS (1997)** En: Doležel J, Suda J., Eds. Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. pp 51
- Lindley J (1951)** Fitografía o de las Reglas que deben observarse al describir y denominar plantas. Traducida por Rothe J. E. Tucumán, Argentina.
- Lineberger D.** Portions of flower Derived from L-I, L-II and L-III Layers of the Apical Meristem.  
<http://generalhorticulture.tamu.edu/tisscult/Chimeras/chimera.html>
- Lolle SJ, Pruitt RE (1999)** Epidermal cell interactions: a case for local talk. Reviews *Trends in Plants science* Vol 4, N° 1



- Loureiro JCM (2007)** Flow Cytometric Approaches to study plant Genome. Tesis Doctoral presentada en la Universidad de Aveiro, Departamento de Biología, Portugal.
- Maluszynski M (2001)** Officially Released Mutant Varieties- The FAO/IAEA Database. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 65:175-177
- Maluszynski M, van Zarten L, Ashri A, Brunner H, Ahloowalia B, Zapata FL, Weck (1995)** Mutation Techniques in Plant Breeding. IAEA-SM-340/29, Vienna, pp 489-504
- Mandal AKA, Datta SK (2005)** Combination of classical and modern methods for the development of new ornamental varieties. En: S. K. Datta, Ed. Role of Classical Mutation Breeding.
- Martin C, Gerats T (1993)** Control of Pigment Biosynthesis Genes during Petal Development. *The Plant Cell*, Vol 5, 1253-1264.
- Martínez AE, Favret EA (1991)** Morphogenetic and anthocyanin synthesis differences in two albino barley types. *Journal of Genetics & Breeding* 45: 59-66
- Matsumura S (1961)** Dose Rate and RBE for Radiation Induced Mutations in Plants. *The Japanese Journal of Genetics* VI Suppl 36, pp. 65-67.
- Matsumura S (1964)** Relation between radiation effects and dose rate of X-and gamma rays in cereals. *The Japanese Journal of Genetics* Suppl 40, pp. 1-11.
- Mishiba K, Ando T, Mii M, Watanabe H, Kokubun H, HashimotoG, Marchesi E (2000)** Nuclear DNA Content as an Index Character Discriminating Taxa in the Genus *Petunia sensu* Jussieu (Solanaceae). *Annals of Botany* 85:665-673
- Mol J, Grotewald E, Koes R (1998)** How genes paint flowers and seeds. *Trend in Plant Science* 3,212-217

- Murakami Y, Fukui Y, Watanabe H, Kokubun H, Toya Y, Ando T (2004).** Floral coloration and pigmentation in *Calibrachoa* cultivars. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 79 (1): 47-53.
- Nakatsuka T, Nishihara M, Mishiba K, Yamamura S (2005)** Two different mutations are involved in the formation of white-flowered gentian plants. *Plant Science* 169: 949-958
- Naito K, Kusaba M, Shikazono N, Takano T, Tanaka A, Tanisaka T, Nishimura M (2005)** Transmissible and Nontransmissible Mutations Induced by Irradiating *Arabidopsis thaliana* Pollen With  $\gamma$ -Rays and Carbon Ions. *Genetics* 169: 881-889.
- Nau J (2006)** Cultivar Testing-America's trial gardens. En: Eds. Anderson N. O. Flower Breeding and Genetics; pp 65-79.
- Ozaki Y, Narikiyo K, Fujita C, Okubo H (2004)** En: Doležel J, Suda J., Eds. Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size, p 51
- Pérez de la Torre M, Hagiwara J, Heinz R, Escandón AS (2009)** Análisis de la variabilidad genética del género *Calibrachoa* mediante microsatélites anclados. VII Simposio REDBIO Argentina 2009 y II Congreso Internacional REDBIO Argentina. Rosario, Santa Fé.
- Preuss SB, Britt AB (2003)** A DNA-Induced Cell Cycle Checkpoint in *Arabidopsis*. *Genetics* 164:323-334.
- Prina AR (1989)** Consideraciones sobre la aplicación eficiente de la mutagénesis inducida en fitomejoramiento. *Mendeliana*, 9 (1): 5-49.
- Prina AR (1993)** La Mutagénesis Inducida en el Mejoramiento Vegetal. *Boletín de Genética Instituto de Fitotécnica* 17: 9-22.
- Prina AR (1996)** Mutador-Induced Cytoplasmic Mutants in Barley: Genetic Evidence of Activation of a Putative Chloroplast Transposon. *The Journal of Heredity*. 87: 385-389.

- Prina AR, Favret EA (1988)** Influence of Marker Genes on the Expression of Somatic Mutations in Barley. *Journal of Heredity* 79: 371-376.
- Prina AR, Landau MA, Colombo N, Jaureguiualzo M, Arias MC, Rios RD, Pacheco MA (2009)** Genetically Unstable Mutants as Novel Sources of Genetic Variability: The Chloroplast Mutator Genotype in Barley as a Tool for Exploring the Plastid Genome. En: *Induced Plant Mutations in the Genomics Era*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. Ed. Q.Y. Shu. pp 255-256.
- Psoffer M, Amon A, Lelley T, Heberleborgs E (1995)** En: Doležel J, Suda J., Eds. *Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size*, p 51
- Robbins TP, Harbord RM, Sonneveld T, Clarke K (2000)** The Molecular Genetics of Self-incompatibility in *Petunia hybrida*. *Annals of Botany* 85: 105-112.
- Rosin FM; Hart JK, van Onckelen H, Hannapel D (2006)** Suppression of a Vegetative MADS Box Gene of Potato Activates Axillary Meristem Development. *Plant Physiology*. Vol. 131, pp. 1613-1622
- Schum A (2003)** Mutation Breeding in Ornamentals: An Efficient Breeding Method? *Acta Horticulturae* 612: 47-60.
- Schum A, Preil W (1998)** Induced Mutations in Ornamental Plants. En: Jain S M, Brar D S, Ahloowalia B S., Eds. *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*. Kluwer Academic Publishers. Gran Bretaña.
- Sesek P, Sustar-Vozlic J, Bohanec B (2000)** En: Doležel J, Suda J., Eds. *Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size*, p 51
- Simons JL, Napoli CA, Janssen BJ, Plummer KM, Snowden KC (2006)** Analysis of the DECREASED APICAL DOMINANCE Genes of *Petunia* in the Control of Axillary Branching. *Plant Physiology* Vol 143, pp. 697-706

- Smith MAL, Spaner LA, Cowen RKD (1988)** Image analysis to quantify the expression of an unstable allele. *Journal Heredity* 79: 147-150
- Sparrow AH, Pond V (1956)** Some cytogenetics and morphogenetic effects of ionizing radiations on plants.
- Sparrow AH (1961)** En: Manual on Mutation Breeding. 2° edition. International Atomic Energy Agency.
- Spelt C, Quattrocchio F, Mol J, Koes R (2002)** ANTHOCYANIN of Petunia Controls Pigment Synthesis, Vacuolar pH and Seed Coat Development by Genetically Distinct Mechanisms. *The Plant Cell*, Vol 14; 2121-2134
- Spitters CJT, Vosselman L, Engeis JMM, van Kester WMM, Zeven AC (1975)** Investigations of the inheritance of flower variegation in *Mirabilis jalapa* LV1. Genetic system of flower variegation and speculation about its existence. *Euphytica* 24: 323-332
- Stadler LJ (1930)** Some Genetic Effects of X-Ray in Plants. *The Journal of Heredaty* 21: 3-19.
- Stehmann JR (1999)** Estudos taxonômicos na tribo Nicotianeae G. Don (Solanaceae): revisão de *Petunia* Jussieu, das espécies brasileiras de *Calibrachoa* La Llave and Lexarza e o estabelecimento do novo gênero *Petuniopsis* Stehmann and Semir. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Stehmann JR y Semir J (1997)** A new species and new combinations in *Calibrachoa* (Solanaceae). *Novon* 7: 417-419. Suarez E, Nishiyama K, Facciuto G, Escandón A, Soto S, Hagiwara JC, Mata D, Miyayima I, Kobayashi N (2003) The Horticulture development Project INTA-JICA. *V International Symposium on New Floriculture Crops*. Iguazu-Fall. Brasil.
- Stehmann JR, Semir J (2005)** New species of *Calibrachoa* and *Petunia* (Solanaceae) from subtropical South America. En: Keating RC, Hollowel V e Croat TB, Eds. A Festschrift for

- Willian G. D'arcy: the legacy of a taxonomist. (Monographs in systematic botany from the Missouri Botanical Garden 104). Missouri Botanical Garden, St. Louis, pp 341-348.
- Suda J (2004)** An employment of flow cytometry into plant biosystematics. Tesis Doctoral presentada en: Faculty of Science, Department of Botany, Charles University in Prague.
- Swaminathan MS (1977)** The detection of induced mutation. En: Manual on Mutation Breeding. 2° edition. International Atomic Energy Agency. pp:138-141
- Taiz L, Zeiger E (2002)** Plant Physiology. Third Edition. Sinauer Associates, Inc.
- Tilney-Bassett, R A E (1963)** The structure of periclinal chimeras. *Heredity*, 18, 265–285.
- Thompson JE, Wang TW (2002)** Molecular genetics of flower senescence. En: Alexander Vainstein, Ed. Breeding for Ornamentals: Classical and Molecular Approaches. Kluwer Academic Publishers.
- Tulmann Neto A, Latado RR (2007)** Indução de mutação: ampliação da variabilidade genética para o melhoramento de ornamentais. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental* Vol. 13: 2131-2140.
- Tsukamoto T, Ando T, Takahashi K, Omori T, Watanabe H, Kokubum H, Marchesi E, Kao T (2003)** Breakdown of Self-Incompatibility in a Natural Population of *Petunia axillaris* Caused by Loss of Pollen Function. *Plant Physiology*. Vol 131, pp. 1903-1912
- Tsukamoto T, Ando T, Watanabe H, Kokubum H, Hashimoto G, Sakazaki U, Suárez E, Marchesi E, Oyama K (2002)** Differentiation in the status of self-incompatibility among *Calibrachoa* species (Solanaceae). *Journal Plant Research* 115:185-193.
- Tuteja N, Singh MB, Misra MK, Bhalla PL, Tuteja R (2001)** Molecular Mechanisms of DNA Damage and Repair: Progress in Plants. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 36(4): 337-397. CRS Press LLC
- van Harten AM (1998)** Mutation Breeding-Theory and Practical Applications. Ed. Cambridge.

- van Harten AM (2002)** Mutation Breeding of Vegetatively Propagated Ornamentals. En: Alexander Vainstein, Ed. *Breeding for Ornamentals: Classical and Molecular Approaches*. Kluwer Academic Publishers. pp 105-127
- Venkatachalam P, Jayabalan N (1991)** Induction of mutants in *Zinnia elegans* Jacq. *Mutation Breeding News.* :38-10
- Villanova I, Soto S, Pannunzio MJ, Coviella MA, Hagiwara JC, Bologna P, Facciuto G, Imhof L, Borja M (2009)** Impact of Ornamental Native Plants in the Argentinean Floriculture Sector: a Field Trial Survey on calibrachoa Selected Clones. *Acta Horticulturae* 813: 285-292.
- Watanabe H, Ando T, Tsukamoto T, Hshimoto G, Marchesi E (2001)** Cross-Compatibility of *Petunia exserta* with Other *Petunia* taxa. *Journal of the Japanese Society for Hosticultural Science*. Vol 70 N° 1 pp 33-40.
- Waterworth RA, Griesbach RJ (2001)** The Biochemical Basis for Flower Color in *Calibrachoa*. *HortScience* 36 (1):131-132.
- Wijsman HJW, De Jong JH (1985)** On the Interrelationships of certain species of *Petunia* IV. Hybridization between *P. linearis* and *P. calycina* and nomenclatorial consequences in the *Petunia* group. *Acta Bot. Neerl* 34(3): 337-349.
- Wijsman HJW (1990)** On the Interrelationships of Certain Species of *Petunia* VI. New Names for the Species of *Calibrachoa* Formerly Included Into *Petunia* (Solanaceae). *Acta Bot. Neerl.* 39 (19), pp.101-102.
- Walbot V (1988)** Reactivation of the Mutator transposable element system following gamma irradiation of seeds. *Gen. Genet.*, 212: 259-264

**Yu O, Matsuno M, Subramanian S (2006)** Flavonoid Compounds in Flowers: Genetic and Biochemistry. En Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology. Vol 1. Global Science, UK, pp 282-291.