
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
GRADO EN BIOTECNOLOGÍA



TRABAJO FIN DE GRADO

Inducción y evaluación de mutantes de alcachofa tolerantes a salinidad

Aída Costa Ortiz

Tutores: José Manuel Pérez Pérez

Antonio José López Pérez.

Biología vegetal

Curso 2014-15

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es contribuir a la mejora genética de alcachofa mediante la búsqueda de mutantes tolerantes a la salinidad. Dicho trabajo consta de dos líneas de investigación. En primer lugar trata de estudiar el efecto a concentraciones crecientes de salinidad sobre plantas previamente mutadas. Por otro lado, una segunda parte en la que se establecen varias líneas de mutantes de alcachofa *in vitro*, mediante el uso del mutágeno etilmetanosulfonato (EMS), con previo cálculo de CL50, y el sometimiento de estas a un estrés salino extremo. Ambas líneas concluyen en un punto común, la evaluación y selección de mutantes tolerantes a salinidad. En los resultados del trabajo se muestra una evidencia de cómo los mutantes seleccionados destacan por seguir un normal desarrollo a elevadas concentraciones de NaCl, siendo incluso mejor que los datos más óptimos obtenidos con plantas control en un medio a 0 mM de NaCl.

PALABRAS CLAVE: estrés salino, mejora genética, cultivo *in vitro*, alcachofa.



ABSTRACT

The aim of this paper is to contribute to the genetic improvement of artichoke by finding salt tolerant mutants. This work consists of two lines of research. First part in which the effect of increasing concentrations of mutated plants salinity on previously studied. The second part is the establishment *in vitro* of artichoke mutant line, for it the mutagen ethyl methane sulfonate (EMS) used, with previous calculation of CLD50, and subjecting these to an end salt stress. Both lines end in a common point, the evaluation and selection of salinity tolerant mutants. In work results evidence of how the selected mutants include follow a normal development to high concentrations of NaCl, being even better than the most optimal data with control plants in half at 0 mM NaCl it is shown.

KEY WORDS: salt stress, genetic improvement, *in vitro* culture, artichoke.

ÍNDICE GENERAL

	Página
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. Objeto de estudio	8
1.2. Cultivos de tejidos mediante micropropagación <i>in vitro</i>	8
1.2.1. Fases en micropropagación <i>in vitro</i>	
1.3 Estrés salino	11
1.3.1 Estrés salino y sus efectos sobre la planta	
1.3.2 Mecanismos moleculares en respuesta al estrés salino	
1.4 Conclusiones	13
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	14
2.1. Mutagénesis al azar	14
2.2. Mutagénesis con EMS	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Material vegetal	16
3.2. Primer estudio: estrés salino en <i>Calicó</i> a concentraciones crecientes de salinidad	16
3.3. Segundo estudio: estrés salino en <i>Romanesco</i> a niveles extremos de salinidad	19
3.3.1. Determinación de DL50	
3.3.2. Mutagénesis al azar con EMS	
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1. Comportamiento de las líneas mutantes de <i>Calicó</i> bajo estrés salino.....	24
4.1.1. Comportamiento de la línea control no mutada en <i>Calicó</i> .	
4.1.2. Comportamiento de la línea control no mutada en <i>Calicó</i> .	

4.1.3.	Regeneración de brotes laterales en mutantes <i>Calicó</i> seleccionados	
4.1.4.	Composición mineral de planta control NM y planta mutada seleccionada bajo estrés salino	
4.2.	Comportamiento de las líneas mutantes de <i>Romanesco</i> bajo estrés salino.....	33
4.2.1.	Comportamiento de la línea control no mutada en <i>Romanesco</i>	
4.2.2.	Comportamiento de las líneas mutadas en <i>Romanesco</i>	
5.	CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA	36
6.	BIBLIOGRAFÍA	37



ÍNDICE TABLAS

	Página
Tabla 1. Composición del medio de cultivo de propagación	16
Tabla 2. Concentración de NaCl para cada nivel de estrés salino y conductividad.....	18
Tabla 3. Desarrollo vegetativo de las líneas control y mutantes en función de la concentración de NaCl en el medio de cultivo.	28
Tabla 4. Resultados (valor P al 95% de confianza) de ANOVA multifactorial comparando el desarrollo vegetativo de las plantas control con cada una de las líneas mutantes y para cada nivel de NaCl	28
Tabla 5. Planta mutante seleccionada como tolerante a salinidad.....	29
Tabla 6. Número de brotes laterales en plantas control y plantas mutantes seleccionadas bajo estrés salino.	29
Tabla 7. Composición de macronutrientes en las líneas Calicó mutadas seleccionadas.	30
Tabla 8. Composición de macronutrientes en las líneas control Calicó no mutadas.....	30
Tabla 9. Composición de micronutrientes en las líneas Calicó mutadas seleccionadas...	31
Tabla 10. Composición de micronutrientes en las líneas control Calicó no mutadas.....	31

ÍNDICE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mecanismo de la ruta SOS para el mantenimiento de la homeostasis iónica...	12
Figura 2. Producto final tras la alquilación que el EMS causa sobre la guanina.....	15
Figura 3. Simulación de la concentración creciente de 0 a 120mM que se preparó para cada una de las líneas mutantes de Calicó.....	17
Figura 4. Simulación de la concentración creciente de 0 a 120mM que se preparó para hacer la línea control de Calicó sin mutar.....	17
Figura 5. Relación entre la conductividad eléctrica del medio salino y la concentración de NaCl.....	18
Figura 6. Porcentaje de brotación en función de la concentración de EMS.....	20
Figura 7. Morfología de los explantos a distintas concentraciones de EMS en el estudio de la CL50.....	21
Figura 8. Esquema del proceso de mutagénesis.....	22
Figura 9. Media de las alturas y desviación estándar en planta control no mutada.....	24
Figura 10. Media de las alturas y desviación estándar en plantas de la línea CM914-1.....	25

Figura 11. Media de las alturas y desviación estándar en plantas de la línea CM914-14(1)	26
Figura 12. Media de las alturas y desviación estándar en plantas de la línea CM914-28(1).....	26
Figura 13. Media de las alturas y desviación estándar en plantas de la línea CM914-28(3).....	27
Figura 14. Media de las alturas y desviación estándar en plantas de la línea CM914-29(1)	27
Figura 15. Concentración de sodio en las plantas (% en materia seca) para cada concentración de NaCl.....	32
Figura 16. Crecimiento de planta control Romanesco bajo estrés salino.....	33
Figura 17. Efecto de la salinidad en planta Romanesco.....	34
Figura 18. Crecimiento de plantas mutantes de Romanesco bajo estrés salino	34
Figura 19. Ejemplo de planta Romanesco seleccionada bajo estrés salino	35

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Objeto de estudio

El objetivo de este trabajo es la búsqueda de mutantes tolerantes a la salinidad en alcachofa. El objeto de estudio es la compuesta *Cynara cardunculus*, comúnmente conocida como alcachofa o alcaucil. Dos variedades serán empleadas para dicho estudio, en la primera línea de trabajo se hará uso de la variedad *Calicó* y en la segunda línea de la variedad *Romanesco*.

Existen diversas formas de propagación de esta hortaliza. La más común es mediante zuecas o óvulos, a partir de partes del rizoma de la planta que portan yemas viables, pero recientemente la opción del cultivo *in vitro* ha mostrado mejores resultados. Con la técnica de cultivo *in vitro* seguida por el investigador Antonio José López Pérez, se obtienen plantas libres de enfermedades, mucho más vigorosas, con mayor altura y más productivas, lo cual se traduce en una reducción de los costes, y ganancias en garantías de calidad, uniformidad y una mayor productividad. El principal problema en la producción agrícola que afecta al cultivo en campo de alcachofa es la composición y calidad de los suelos, los cuales presentan niveles salinos que pueden ser tóxicos para la planta y provocar grandes pérdidas en los cultivos.

Se conoce que la presencia de altos niveles en suelos de NaCl causa en la planta un estrés salino y otros efectos negativos pero aún no están establecidos los mecanismos moleculares específicos que controlan la respuesta a este estrés, por ello su estudio ayudaría a comprenderlos y poder trabajar sobre ellos para optimizar los cultivos y la tasa de viabilidad.

1.2 Cultivos de tejidos mediante micropropagación *in vitro*

La reproducción vegetativa por zuecas presenta diversos problemas, que derivan del carácter perenne del cultivo y de la multiplicación vegetativa del material (Basnizki & Zohary, 1994). Entre estos inconvenientes pueden mencionarse: operaciones de plantación excesivamente laboriosas y caras; "marras" o fallos de plantación con unas pérdidas de un 10% de las plantas, y que económicamente pueden valorarse en 1,9 millones de euros; decaimientos vegetativos que afectan considerablemente a la producción, atribuibles tal vez a complejos problemas de etiología viral; alta tasa de variación somática que provoca la aparición de plantas fuera de tipo (menos productivas y menos precoces).

Toda esta problemática asociada a la multiplicación vegetativa de la alcachofa, podría solucionarse mediante la renovación del material vegetal y el desarrollo de variedades comerciales de producción anual propagadas mediante plantas obtenidas por cultivo *in vitro* principalmente.

Frente a estos problemas, la micropropagación es una poderosa herramienta para la clonación y propagación de plantas hortícolas (Chu y Kurtz, 1990). Las técnicas de micropropagación aumentan la escala y la velocidad de producción y permiten obtener un producto más saludable. La micropropagación *in vitro* ofrece ventajas para el sector productor como son: plantas vigorosas, con buen desarrollo vegetativo; ausencia de enfermedades; homogeneidad en el desarrollo de la plantación; escaso número de marras o incremento de la producción. Según Pécaut y col. (1983), las plantas de alcachofa obtenidas por micropropagación mostraron un rendimiento superior (30 %) al de plantas propagadas vegetativamente. Además se constató un mayor desarrollo vegetativo, siendo las plantas obtenidas por cultivo *in vitro* más altas y con hojas más grandes, ausencia de “marras” (fallos), uniformidad en el desarrollo y en la entrada en producción.

Dado que últimamente están introduciendo y alcanzando gran importancia una serie de variedades comerciales de color morado o violeta con destino a la exportación, poco conocidas comercialmente en el mercado español, pero de gran aceptación para la exportación, se hace necesario estudiar y poner a punto la técnica para producir material de propagación propio, capaz de competir en calidad y sanidad con el que actualmente se importa.

El cultivo de tejidos vegetales se ha convertido en una herramienta importante para la propagación de plantas. Tal vez el mayor problema de la técnica sea la transferencia de las plántulas *in vitro* a condiciones *ex vitro*, ya que la tensión del proceso de trasplante da lugar a altas tasas de mortalidad (Puthur y col., 1998). Así, las plantas micropropagadas expuestas y desarrolladas en un microambiente optimizado, muestran un fenotipo que es más frágil que el de las plantas cultivadas de forma tradicional. Por ello, suele ser necesario una aclimatación antes de su traslado a los semilleros para mejorar la supervivencia (Schultz, 2001). Esto incluye la reducción de la humedad relativa hasta un mínimo del 70 % y del nivel de luz protegiéndolas de la radiación solar directa.

1.2.1 Fases en micropropagación *in vitro*

En general, en los protocolos de micropropagación se diferencian cuatro fases: Inicio del cultivo (I); proliferación o multiplicación de los brotes (II); enraizamiento (III) y Aclimatación (IV). En la fase I, se parte de brotes jóvenes obtenidos de plantas seleccionadas en campo, a los que se les retiran las hojas externas hasta obtener unos explantos de 2 – 3 cm de longitud. La esterilización se realiza sobre una solución de NaClO, aunque algunos autores aplican además un tratamiento con 0,5 g/l de HgCl₂ (Tavazza et al., 2004). Así mismo, es frecuente el uso de ácido cítrico y ácido ascórbico (100 – 150 mg/l) para evitar la oxidación de los brotes. Nuestra propia experiencia aconseja usar estos antioxidantes durante la fase de esterilización así como el posterior lavado de los brotes con agua destilada estéril.

En cuanto a los nutrientes utilizados en la confección del medio de cultivo, existe un gran consenso en el uso de las sales MS (Murashige y Skoog, 1962) en su formulación original (Arce y col., 2004) o bien con modificaciones (Pécaut y col., 1983; Brutti y col., 2000; Tavazza y col., 2004).

Los reguladores del crecimiento son una parte fundamental que debe ser estudiada con detenimiento. Se han descrito diferentes combinaciones para las fases de inicio y proliferación (Fortunato, 1981; Ancora y col., 1981; Pécaut y col., 1983; Pécaut y Martin 1993; Draoui y col., 1993). Dentro de la variabilidad encontrada en la literatura, los reguladores del crecimiento más ampliamente utilizados son: 6-bencil aminopurina (BAP); kinetina (K) y 2-inositol pirofosfato (2iP) en el grupo de las citoquininas; así como ácido indolacético (AIA) y ácido naftalenacético (ANA) en el grupo de las auxinas. No obstante, es preciso señalar el uso de ácido giberélico (GA3) por algunos autores. La kinetina es la citoquinina más empleada en los diferentes protocolos, combinada con AIA, ANA o bien GA3. Nuestra experiencia también confirma el efecto positivo de K tanto en la fase de inicio del cultivo como en la de proliferación. No obstante, hay un gran rango en la concentración de uso (0,1 – 10 mg/l) que indica claramente la necesidad de optimizar la dosis de trabajo para cada variedad lo que, por otra parte, suele ser la tónica general en los protocolos de cultivo *in vitro*: Dentro de una misma especie, la dosis efectiva para una determinada variedad o cultivar no suele ser igualmente efectiva en otra variedad o cultivar.

Actualmente el cultivo *in vitro* de la alcachofa no es un obstáculo, si bien el éxito en la fase de enraizamiento es muy variable. Nuestra propia experiencia arroja resultados de enraizamiento entre el 17 – 67 %, con diferencias significativas entre distintos cultivares tales como *Blanca de Tudela*, *Romanesco*, *Calicó* y *Salambó* (Romero, 2012). No obstante, es necesario realizar estudios para la optimización de las fases de enraizamiento y posterior aclimatación. Otros autores (Tavazza y col., 2004) describen tasas de enraizamiento del 90 % utilizando AIA (10 mg/l) durante una semana y transfiriendo después los brotes a medio sin reguladores del crecimiento. Pécaut y col., (1983) destacan la necesidad de oscuridad en la fase de enraizamiento entre otros factores con un 70 % de planta enraizada en 40 días. También se ha descrito la utilización de vitaminas, ANA, ciclodextrinas, carbón activo, o sales con AIA, GA3 más ANA (Morel y Wetmore, 1951; Brutti y col., 2000; Bigot y Foury, 1984; Morzadec y Hourmant, 1997). En cuanto a la fase de aclimatación la literatura no aporta datos relevantes y parece que no se le da gran importancia. No obstante, esta fase es crucial en todo sistema de regeneración y multiplicación de plantas *in vitro*. Una mala metodología en la fase de aclimatación puede suponer la pérdida de la eficiencia y eficacia de todo el protocolo.

1.3 Estrés salino

1.3.1 Estrés salino y sus efectos sobre la planta.

Existen variaciones genéticas en tolerancia a la sal, y el grado de tolerancia a la sal varía con osmótico, toxicidad y desbalance nutricional. El estrés las especies de plantas y variedades, que se basan en los distintos mecanismos fisiológicos y bioquímicos, y su grado de expresión, que pueden tener las plantas. Así se podría hacer una clasificación en la que la alcachofa encajaría en una categoría de tolerancia moderada ante la salinidad, especialmente durante el estado vegetativo. No obstante, su rendimiento y calidad se ve altamente afectada por motivos de salinidad, como resultado de tres efectos negativos principales. El primer efecto es un estrés osmótico que causa déficit hídrico, una disminución en la absorción de agua por las raíces y un aumento en la pérdida de agua en las hojas, derivando en cambios fisiológicos como; interrupción de las membranas, desequilibrio de nutrientes, menor capacidad antioxidante (ROS), disminución de la actividad fotosintética, y disminución de la abertura estomática. Por otro lado, la presencia de NaCl en el suelo, tendrá un efecto hiperiónico, es decir, tanto el Na⁺

como el Cl^- tenderá a acumularse, pudiendo llegar a altos niveles de toxicidad. Por último, la acumulación de Na^+ inhibe la absorción de otros nutrientes como pueden ser los iones K^+ , que es un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo. Cabe comentar que otro de los efectos causados por un medio salino, es el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno que provocaran daños oxidativos en diversos componentes celulares tales como proteínas, lípidos y ADN, interrumpiendo funciones celulares vitales de las plantas.

1.3.2 Mecanismos moleculares en respuesta al estrés salino

En respuesta al estrés salino, existen distintos mecanismos fisiológicos y bioquímicos que tratan de reducir los efectos negativos que este puede causar en la planta. Se basan en el mantenimiento de la homeostasis iónica y la compartimentación, el transporte y captación de iones, biosíntesis de osmoprotectores y solutos compatibles, activación enzimas antioxidantes, síntesis de poliaminas, generación de óxido nítrico (NO) y la modulación hormonal.

Una alta concentración de la salinidad se traduce en una acumulación de sodio en las plantas. En su mayoría, dicha acumulación se concentra en las partes jóvenes de las hojas, en células de tejidos aéreos donde queda interno en la vacuola (Bhaskar and Bingru, 2014). El mecanismo que entonces está implicado en esta regulación de homeostasis del ion sodio es la ruta bioquímica SOS (Figura 1).

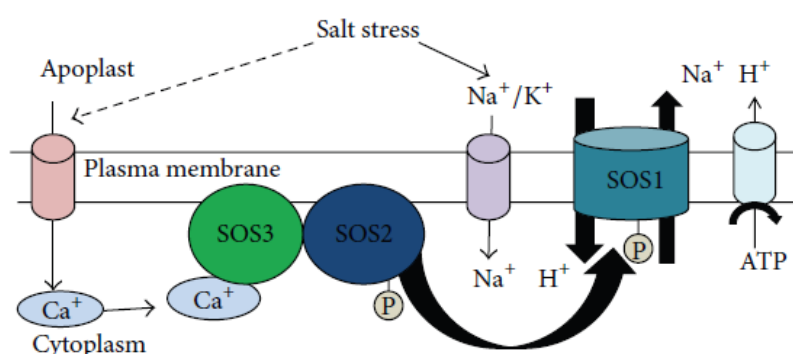


Figura 1. Mecanismo de la ruta SOS para el mantenimiento de la homeostasis iónica. (Bhaskar and Bingru, 2014)

Ninguna planta tolera alta concentración de sal en su citoplasma, para controlar esto niveles, el ión Na^+ se transporta a compartimentos como a la vacuola por el antiportador Na^+ / H^+ . La vía SOS, está implicada en la homeostasis de iones de señalización y tolerancia a la sal.

Consiste en tres proteínas principales; SOS1, SOS2 y SOS3. SOS3 está implicado en la unión de Ca^{2+} . SOS 2 en su C-terminal contiene un motivo FISL (también conocido como dominio NAF), de 21 aminoácidos. El Ca^{2+} interactúa con la proteína de unión de SOS3 y este con SOS2 que codifica una serina / treonina quinasa que fosforilara a SOS1 en uno de sus dominios, y lo activa. SOS1 codifica un antiportador Na^+/H^+ de la membrana plasmática que regula el flujo de salida del Na^+ . También facilita el transporte de larga distancia de Na^+ desde la raíz hasta el brote. SOS1 confiere tolerancia a la sal y regula la homeostasis del pH, el tráfico de membrana de la vesícula, y funciones vacuola. SOS1 provoca un aumento en el flujo de salida del Na^+ del citoplasma a la vacuola, reduciendo así los niveles y disminuyendo la toxicidad causada por la acumulación de Na^+ . La sobreexpresión de SOS1 confiere entonces tolerancia a la sal. Así, con el aumento en la concentración de Na^+ hay un fuerte aumento en el nivel intracelular de Ca^{2+} , que con su unión a SOS3, modula la homeostasis intracelular de Na^+ con el conjunto de proteínas SOS. La bomba de protones del tonoplasto, V-ATPasa, se encarga de acidificar el medio interno de la vacuola introduciendo protones al lumen en contra de gradiente. La actividad de esta bomba, activa a un intercambiador de sodio/protones (Na^+/H^+). Este transportador, es un mecanismo clave en la tolerancia de la planta a la salinidad puesto que evita la excesiva acumulación de sodio en el interior de la célula (Barkla et al., 1995). Se trata de un antiportador que media el transporte activo secundario utilizando la energía electroquímica del gradiente originado por la acumulación de los protones, para mantener los gradientes transmembránicos. Existen varios genes de la familia NHX que se relacionan con la estimulación de la actividad del intercambiador Na^+/H^+ . De esta familia de genes, sólo un gen, AtNHX1, ha sido caracterizado y se demostró que media el transporte tanto de sodio como de potasio con afinidades similares y que juega un papel importante en el control del pH y de la osmorregulación del organelo donde se exprese, más que en la acumulación de sodio. Se concluye que una alta actividad en este transportador viene estimulada por la sobre-expresión de la proteína AtNHX1 (Venema et al., 2002).

1.4 Conclusiones

La salinidad puede afectar negativamente a las plantas en forma de estrés osmótico, toxicidad por acumulación de iones y reduciendo la disponibilidad de nutrientes. La presencia de altas concentraciones de sodio disminuye la absorción de potasio y se relaciona con un déficit de calcio. De modo que el cultivo de plantas en ambientes salinos implica una nutrición deficiente de la planta que se traduce en un menor desarrollo vegetativo y una menor productividad.

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

2.1 Mutagénesis al azar

Mutagénesis puede definirse como el proceso por el cual se produce una alteración en el material genético de un organismo (genotipo) que puede manifestarse alterando las características externas o internas de dicho organismo (fenotipo). Del mismo modo, mutágeno es toda sustancia o factor, de naturaleza química o física, capaz de inducir mutaciones en un organismo. Cuando dicha alteración da lugar a un fenotipo viable, es posible estudiar las características del individuo para, en una última fase, seleccionar aquellos variantes (mutantes) de interés. Los fenómenos de mutación pueden darse de manera espontánea en la naturaleza, pero los investigadores en mejora genética han desarrollado técnicas de inducción de mutagénesis tanto por métodos químicos (EMS, MMS, Colchicina) como físicos (Rayos X, Rayos γ). Los mutágenos, tanto de origen químico como físico, se caracterizan por causar cambios aleatorios en el ADN nuclear o de orgánulos citoplasmáticos (ADN plastidial).

La inducción de mutación en plantas es una metodología afectivamente aplicada en programas de mejora vegetal con variedades propagadas tanto por semillas como vegetativamente, donde los genes son alterados mediante tratamientos en los cuales se emplean semillas u otras partes de la planta. Existen numerosos ejemplos de la utilización de agentes mutagenizantes en variedades de plantas ornamentales, plantas medicinales, hortícolas y oleaginosas (Datta S.K., 2009). Entre otros casos de éxito, se pueden destacar los obtenidos en programas de mejora de cítricos (Du Plouy et al., 1992; Froneman et al., 1996; Starrantino et al., 1988) otros frutales (Sanada T., 1994) patata (Li H. Z. et al., 2005) mediante la aplicación de rayos γ y principalmente. Sin embargo, en algunos casos se ha utilizado con éxito la mutagénesis química (Mensah J.K. et al., 2009; Copecký y Vagera, 2005; Dhanavel D. et al., 2008) e incluso se ha descrito como la aplicación de mutágenos químicos ha dado mejores resultados en cuanto a eficacia y eficiencia en la recuperación de mutantes (Begum T. y Dasgupta T., 2010). Según estos autores, el uso de EMS al 0,5% fue el tratamiento más efectivo para inducir mutaciones tras el análisis de la tercera generación de plantas. Pero es en ornamentales donde más se han aplicado las técnicas de

mutagénesis. De hecho, según Jain S.M. (2006) de las 2300 variedades mutantes oficialmente registradas, 566 eran plantas ornamentales.

En los programas de mejora vegetal mediante mutagénesis, entre otros aspectos, la selección del material de partida, métodos y tiempos de exposición a los mutágenos, dosificación del agente mutagenizante, identificación de mutantes y quimeras son decisivos a la hora de asegurar el éxito del programa de mejora. A este respecto, la aplicación de mutágenos para la obtención de nuevas variedades en combinación con técnicas de cultivo *in vitro*, especialmente los sistemas de multiplicación a partir de meristemos, tiende a incrementar la eficiencia de los protocolos de mutagénesis. El paso de las plántulas por sucesivos ciclos de regeneración, posibilita de disociación de quimeras. Roux et al. (2004) describieron como las quimeras se redujeron al 8% después de pasar los brotes mutagenizados de *Musa* spp. a través de tres ciclos de subcultivo. Mediante la combinación de irradiación y cultivo *in vitro* de brotes, se ha tenido éxito en la obtención de un mutante de banana (Novaria) que está siendo cultivado en Malasia (Novak et al., 1990).

2.2 Mutagénesis con EMS

El EMS o etilmetanosulfonato es un éster del ácido metanosulfónico con propiedades de mutágeno. Causa mutaciones puntuales por sustitución de nucleótidos, con una tasa de 5×10^{-4} a 5×10^{-2} por gen. Las mutaciones que causa son en su mayoría alquilaciones en las guaninas (figura 2) causando errores en la replicación y transiciones puesto que la ADN polimerasa sustituye la introducción de citosina como complementaria de la guanina, por timina. En un segundo ciclo de replicación entonces se encontrará un par de bases complementarias adenina- timina en lugar de citosina-guanina.

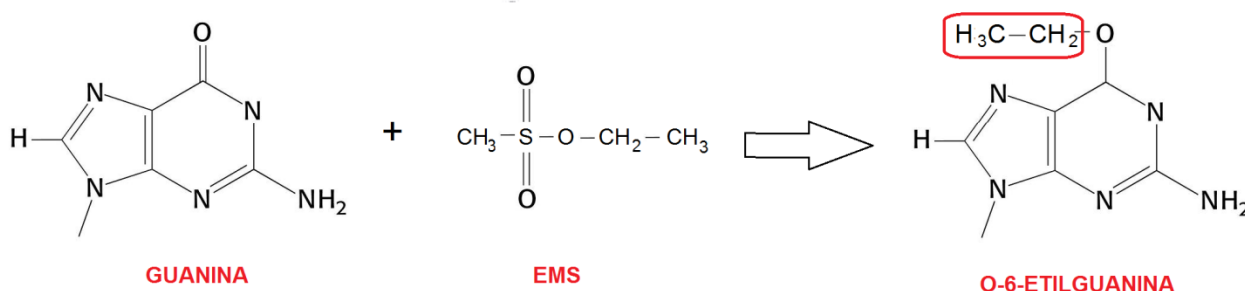


Figura 2. Producto final tras la alquilación que el EMS causa sobre la guanina.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Para la realización de los experimentos que se describen en la primera parte de esta memoria se partió de una colección de 5 líneas de mutantes de la variedad *Calicó* (variedad de origen francés con capítulos de color verde). Estas líneas fueron inducidas previamente por el investigador Antonio José López Pérez con el mutágeno EMS. Además serán material de estudio también plantas de esta misma variedad pero sin mutagenizar para emplearlas como control y poder establecer una comparación entre las plantas que han estado en contacto con y sin el mutágeno. Sin embargo, para el segundo estudio se han seleccionado plantas de la variedad *Romanesco* (variedad de origen italiano con capítulos de color morado), que serán sometida a un proceso de mutagénesis al azar con EMS que se explicará posteriormente. En cultivos *in vitro* de estas variedades se han observado numerosas ventajas en la variedad *Romanesco* frente a *Calicó*, tales como menor porcentaje de contaminación y mayor crecimiento y desarrollo en el mismo periodo de tiempo.

3.2 Evaluación de mutantes de la variedad *Calicó* bajo estrés salino a concentraciones crecientes de NaCl.

Para inducir el estrés salino se van a preparar 6 gradillas con 21 tubos. Cinco de las seis gradillas se corresponderá cada una a las cinco líneas de mutantes y la restante se empleará para la planta control de *Calicó* sin mutar. Las concentraciones de salinidad van en un aumento de 20 mM desde 0 a 120 mM. Cada uno de los tubos contiene 10 ml de medio de cultivo de propagación que habitualmente emplea el profesor Antonio López para sus estudios (tabla 1) y con los que se ha observado que aporta los niveles necesarios de nutrientes y hormonas necesarias para un óptimo crecimiento y desarrollo:

Compuesto	Cantidad (g/L) ó (ml/L)
Sales MS	4,3
Sacarosa	30
Mio-Inositol	0,1
Vitaminas + aminoácidos	10
Kinetina	1

Tabla 1. Composición del medio de cultivo de propagación

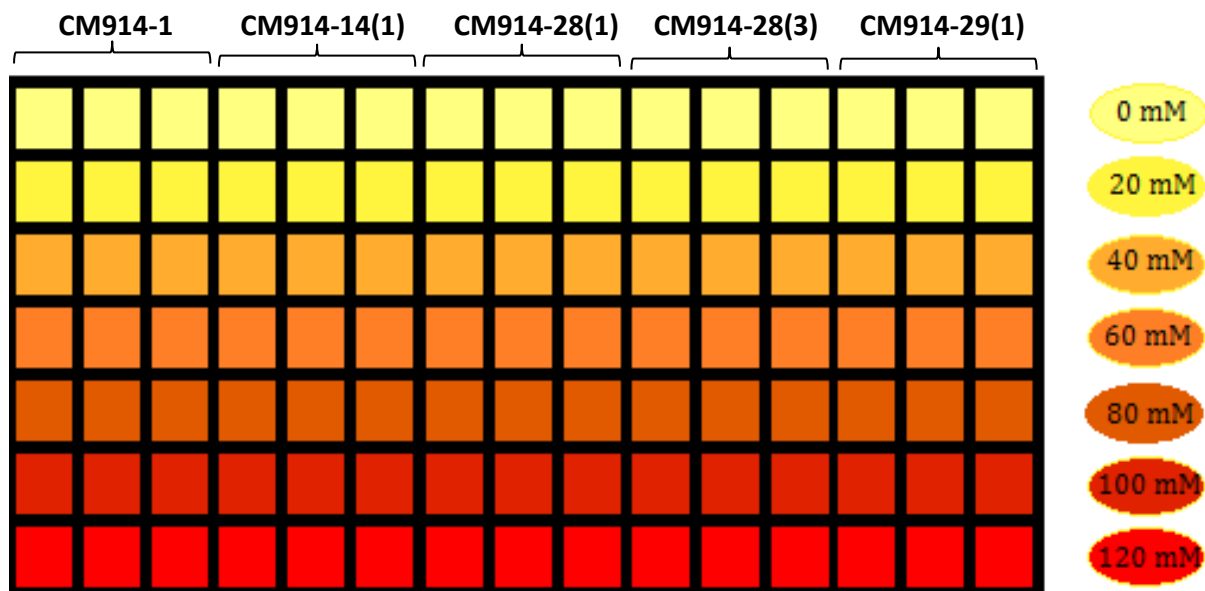


Figura 3. Simulación de la concentración creciente de 0 a 120mM que se preparó para cada una de las líneas mutantes de Calicó.

Figura 3, figura 4. Esta representación imita a cada una de las gradillas que se han formado para una línea de *Calicó* sin mutar (NM) y para las cinco líneas mutantes; CM914-1, CM914-14(1), CM914-28(1), CM914-28(3) y CM914-29(1). Cada réplica se hizo por triplicado en todas las líneas y concentraciones para obtener unos datos más fiables.

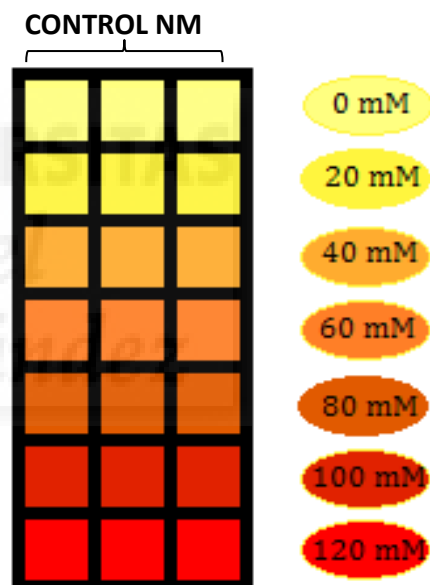


Figura 4. Simulación de la concentración creciente de 0 a 120mM que se preparó para hacer la línea control de Calicó sin mutar.

La tabla anterior con los componentes del medio de cultivo es común para todos los tubos. Para obtener los distintos medios con concentraciones crecientes de 0 a 120mM de salinidad se han adicionado las cantidades correspondientes de NaCl o sal común a cada uno de los tubos (tabla 2). Para determinar los gramos que había que adicionar de NaCl:

$$\text{Molaridad} = \frac{\text{moles de soluto} \left(\frac{g}{PM} \right)}{\text{Volumen de disolución (L)}} \rightarrow g = M \cdot V \cdot PM$$

Donde “g” son los gramos de NaCl que se adicionarán, “M” $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$, el volumen final para el que lo calculamos es 1 L, y el peso molecular “PM” 58,44g/mol. Así para una concentración de 20 mM $\rightarrow g = 20 \cdot 10^{-3} \cdot 1 \cdot 58,44 = 1,169 \text{ g de NaCl}$.

Tubo	[NaCl] mM	NaCl (g)/L	Conductividad mS/cm
Control	0	0	5,82
1	20	1,17	7,60
2	40	2,34	9,56
3	60	3,51	12,00
4	80	4,68	13,53
5	100	5,85	14,37
6	120	7,02	16,78

Tabla 2. Concentración de NaCl para cada nivel de estrés salino y conductividad.

En la tabla también se muestran los resultados correspondientes a las medidas de la conductividad en los diferentes medios salinos a 25°C. La conductividad eléctrica (CE), indica la capacidad del medio para conducir la electricidad. Esta capacidad aumenta con la concentración de sales, por ello se puede establecer una relación de proporcionalidad con la salinidad del medio (figura 5). Los datos obtenidos confirman que a mayor conductividad, mayor es la concentración de sales:

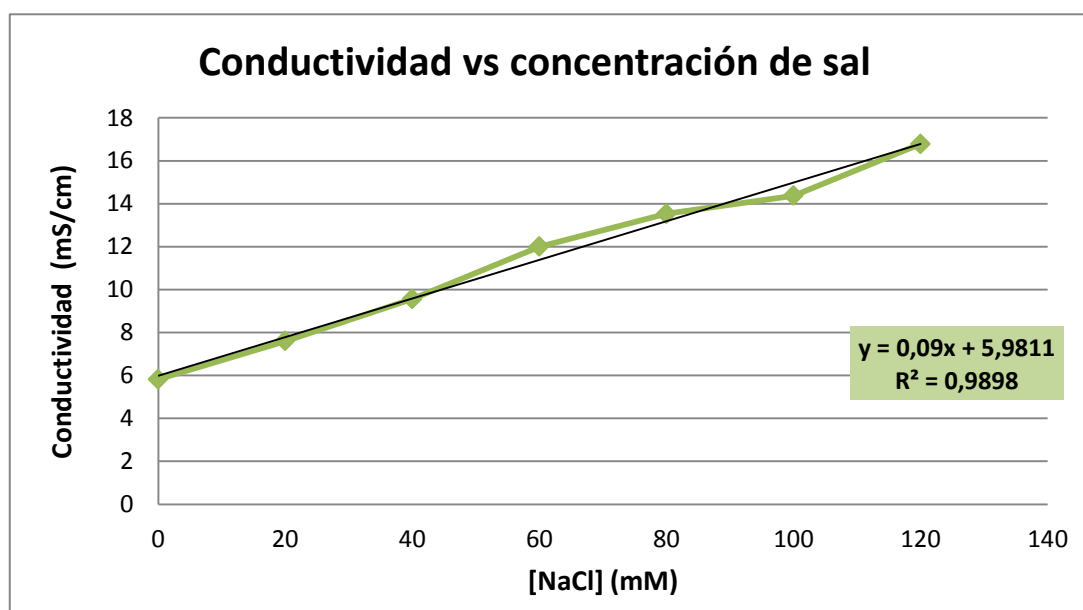


Figura 5. Relación entre la conductividad eléctrica del medio salino y la concentración de NaCl

3.3 Evaluación de mutantes de la variedad *Romanesco* bajo estrés salino a niveles extremos de NaCl.

La segunda parte de este trabajo consistió en la inducción de mutagénesis en plantas de alcachofa de la variedad *Romanesco* con el objetivo de establecer varias líneas de mutantes y su posterior evaluación bajo altas concentraciones de NaCl para poder seleccionar aquellas que presenten resistencia a la salinidad. El medio que se emplea ahora es extremadamente salino para provocar que induzca un fuerte estrés, llegando a duplicar el valor de la conductividad con la concentración salina a la que están sometidas las líneas mutantes de *Calicó* (la máxima era 120mM). Se prepara un volumen final de 2200 ml de medio de propagación que se verterá en 27 botes de 80 ml cada uno. Basándonos los datos experimentales obtenidos en el primer estudio, se establece una relación entre conductividad y concentración de NaCl dada por la recta $y=0,09x+5,9811$, con la que podemos determinar que la cantidad de sal que hay que adicionar es de 18,58g de NaCl y estará a una concentración de 322,22mM. Tras la preparación del medio y el calibrado del pH, se obtuvo la medida experimental de la conductividad eléctrica del medio, siendo esta de 34,9 mS/cm.

3.3.1 Cálculo de CL50

Se realiza un estudio en el que se observa el crecimiento y porcentaje de brotación de explantos de *Romanesco* a distintas concentraciones de EMS (figura 6). Los explantos de *Romanesco* fueron sometidos a diferentes concentraciones del mutágeno (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5%) y se mantuvieron en contacto con el mutágeno durante 30 minutos. Tras este periodo los explantos se pasaron a medio de cultivo sin mutágeno y se calculó el porcentaje brotación, así como el porcentaje de explantos que resultaban necrosados tras el tratamiento. Para cada concentración de mutágeno se realizaron tres réplicas con tres explantos por réplica.

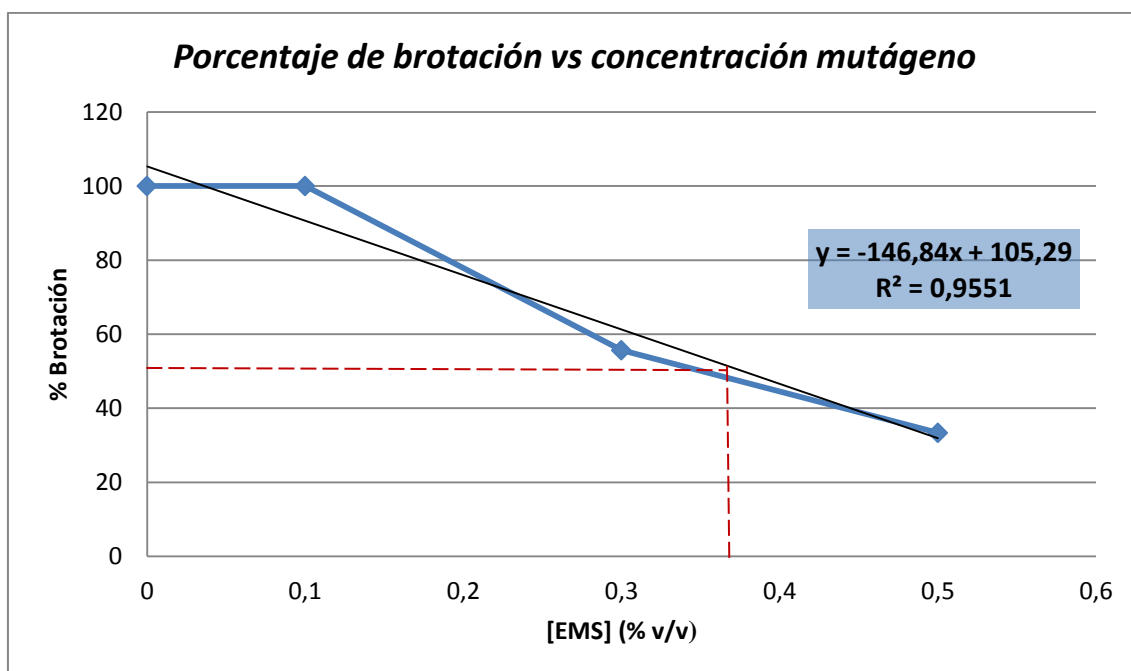


Figura 6. Porcentaje de brotación en función de la concentración de EMS.

Esta gráfica resume los datos obtenidos a partir de los cuales se busca establecer la CL50. La CL50 o concentración letal 50, se define como la concentración de la muestra que causa una mortalidad del 50% en la población en estudio y se expresa en mg/l. El cálculo de la CL50 nos permitirá entonces establecer una concentración adecuada para lanzar el experimento. Para conocer la CL50, se calcula la concentración de mutágeno EMS, a la cual el porcentaje de brotación es del 50%. Para ello se hace uso de la ecuación de la recta obtenida en la gráfica anterior:

$$y = -146,84x + 105,29$$

$$50 = -146,84x + 105,29$$

$$50 - 105,29 = -146,84x$$

$$x = 55,29/146,84$$

$$x = 0,3765 \text{ \% (ml/ml)}$$

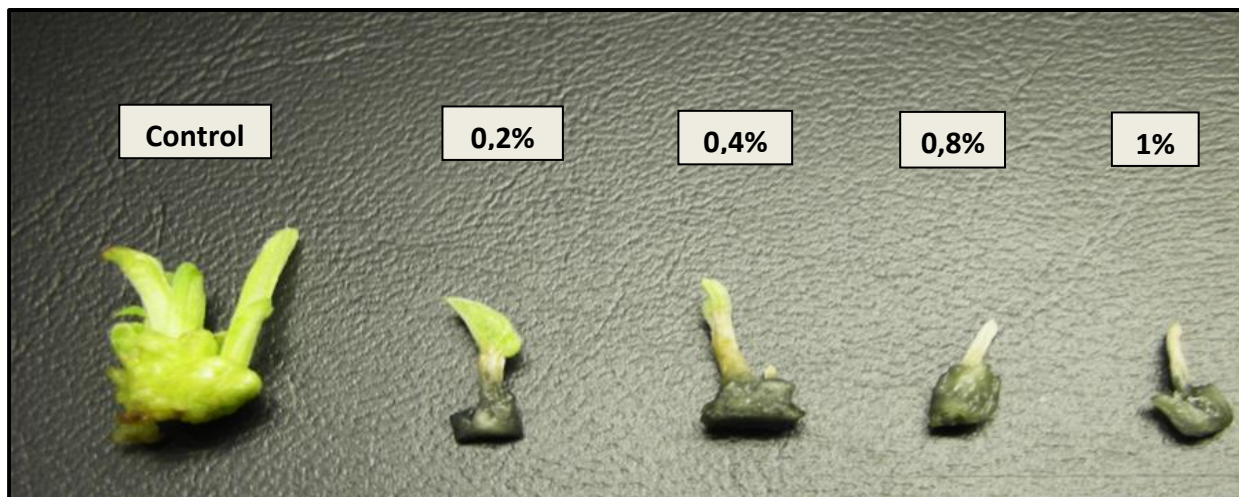


Figura 7. Morfología de los explantos a distintas concentraciones de EMS en el estudio de la CL50.

La imagen a muestra los resultados del experimento para la determinación de la CL50 transcurridos cuatro días desde el paso de los brotes a medio sin EMS. La planta control no estuvo en contacto con el mutágeno mientras que los explantos que le siguen indican en porcentaje la concentración de EMS con la que estuvieron en contacto. Como se observa, a partir de una concentración de 0,4% de EMS los explantos se necrosan y mueren.

3.2.2 Mutagénesis al azar con EMS

Una vez calculada CL50, se procede a la inducción de mutantes en brotes de alcachofas. Se preparan explantos de *Romanesco* en una cabina de flujo laminar, cortando todos los brotes y dejando solo la base de estos a partir de la cual se generaran nuevos brotes. Se agitan los explantos durante 30 minutos en una solución de agua destilada estéril con EMS (0,37%) para que estén en contacto con el mutágeno. Transcurrido este periodo, los explantos se extraen de la solución con EMS, y se colocan tres explantos por placa, resultando un total de diez placas con treinta explantos. Se deja durante 24 horas bien orientados en la placa, en una cámara de cultivo bajo fotoperiodo (16 horas en luz y 8 horas en oscuridad) y a una temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Tras este periodo, se pasan los explantos a un nuevo medio de cultivo sin mutágeno, se deja en cámara de cultivo bajo las mismas condiciones durante 7 días, y se transfieren después a medio de cultivo sin mutágeno, dejándolo esta vez durante 15 días. Pasado este tiempo, se limpian o eliminan aquellas zonas que se observan de tejido muerto, pardeado o negro, en torno a los brotes, hasta observar tejido de coloración marrón claro. Por último se pasan estos brotes a medio de cultivo fresco sin mutágeno en tubos, donde se dejan desarrollar (Figura 8).

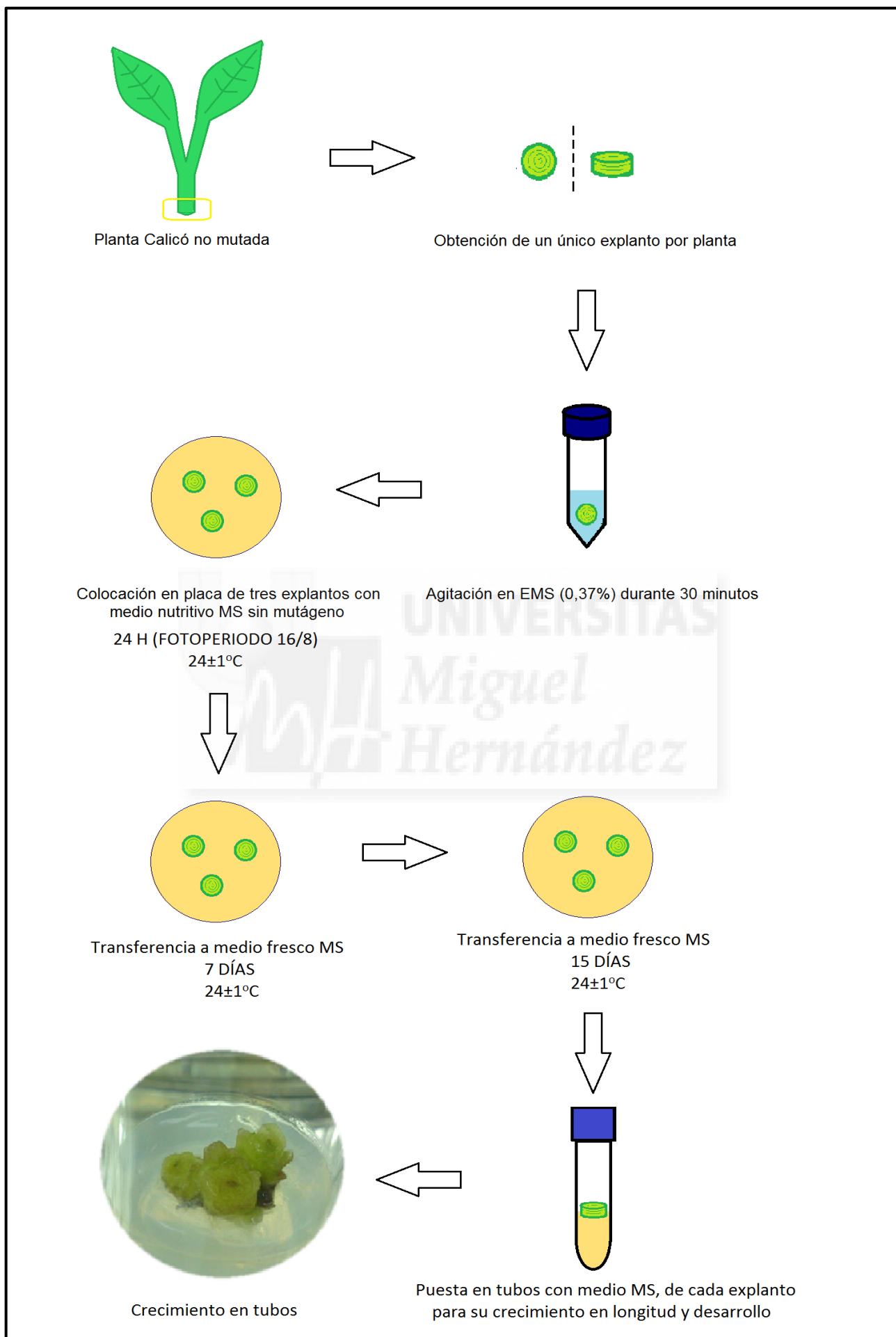


Figura 8. Esquema del proceso de mutagénesis

Cada mutante regenerado constituye una planta a estudiar, aunque provenga del mismo brote o explanto original (cada yema que genera un brote es individual y puede tener características diferentes) y es preciso identificarlas. Se usa el siguiente código: RV1615-X, donde "R" indica la variedad Romanesco, "V" es la inicial del día de la semana en la que se lanzó el experimento, viernes, "16" y "15" hacen referencia a la semana y año y X será un número variable de 1 a 36 para cada una de los distintos brotes que serán objeto de estudio.

Cada mutante regenerado se somete finalmente a un periodo de cultivo bajo estrés salino. Los mutantes se transfieren a medio de cultivo con la misma composición antes descrita (tabla 1) al que se ha adicionado NaCl a una concentración de 322,22mM. Tras 25 días en este medio de cultivo se calculará el crecimiento en longitud de las plantas para tratar de identificar mutantes que muestren un buen desarrollo vegetativo bajo estrés salino.

En la presentación de este trabajo finaliza aquí el proceso, no obstante, para su continuidad se transfiere a medio fresco cada 20-25 días y se pasarían clones de los mutantes a medio de cultivo que favorezca el enraizamiento durante 19 días. Para finalizar el proceso, se aclimataría la planta en turba/perlita durante unos 19 días y se seguiría un estudio agronómico en parcela experimental.

Tras un desarrollo de 25 días en tubos, se pasan a medio fresco en botes con la misma concentración de sal y condiciones aquellas plantas que sean de interés.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Comportamiento de las líneas mutantes de *Calicó* bajo estrés salino.

4.1.1 Comportamiento de la línea control no mutada en *Calicó*.

Tras el cultivo de plantas de *Calicó* no sometidas a mutagénesis bajo estrés salino se observó, una correlación negativa entre la tasa de crecimiento de la planta y la concentración salina. Los resultados muestran como a mayor concentración salina el desarrollo vegetativo de las plantas se resiente (figura 9).

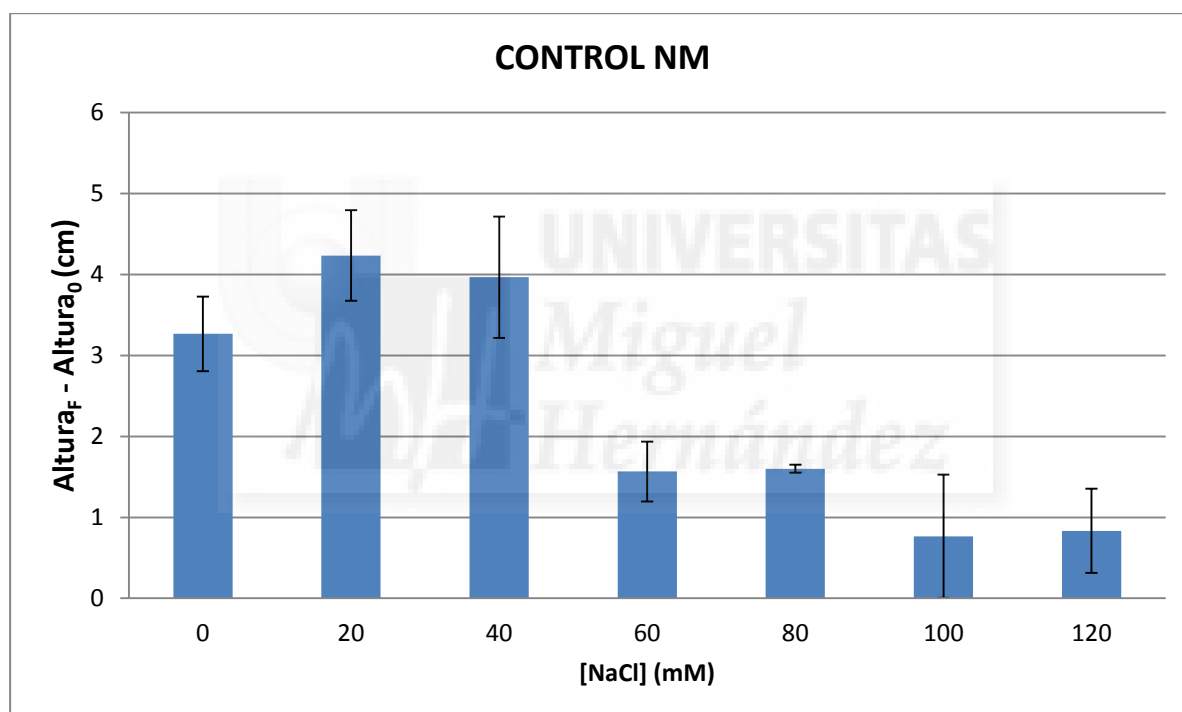


Figura 9. Media de las alturas y desviación estándar en planta control no mutada, CONTROL NM.

Tras 25 días en medio salino, la planta no soporta niveles mayores a 40mM de NaCl y muestra una disminución en su crecimiento, siendo más notable en niveles de concentración superior a los 80mM.

4.1.2 Comportamiento de las líneas de *Calicó* mutantes

Del mismo modo que las plantas controles no mutadas, para cada una de las líneas mutantes se estudió el desarrollo vegetativo tras un periodo de cultivo de 25 días. Se estableció así la diferencia entre altura inicial y altura final para cada línea de mutantes y cada concentración salina a la que fue sometida.

Los resultados en la línea mutante CM914-1 mostraron que plantas mutantes de esta línea presentan crecimiento positivo a cualquier concentración de sal, destacando un buen crecimiento bajo 40 y 100 mM de NaCl (figura 10). Estos mismos resultados se van a apreciar en las restantes líneas mutantes estudiadas (fiuras 10-17) en diferentes concentraciones de NaCl.

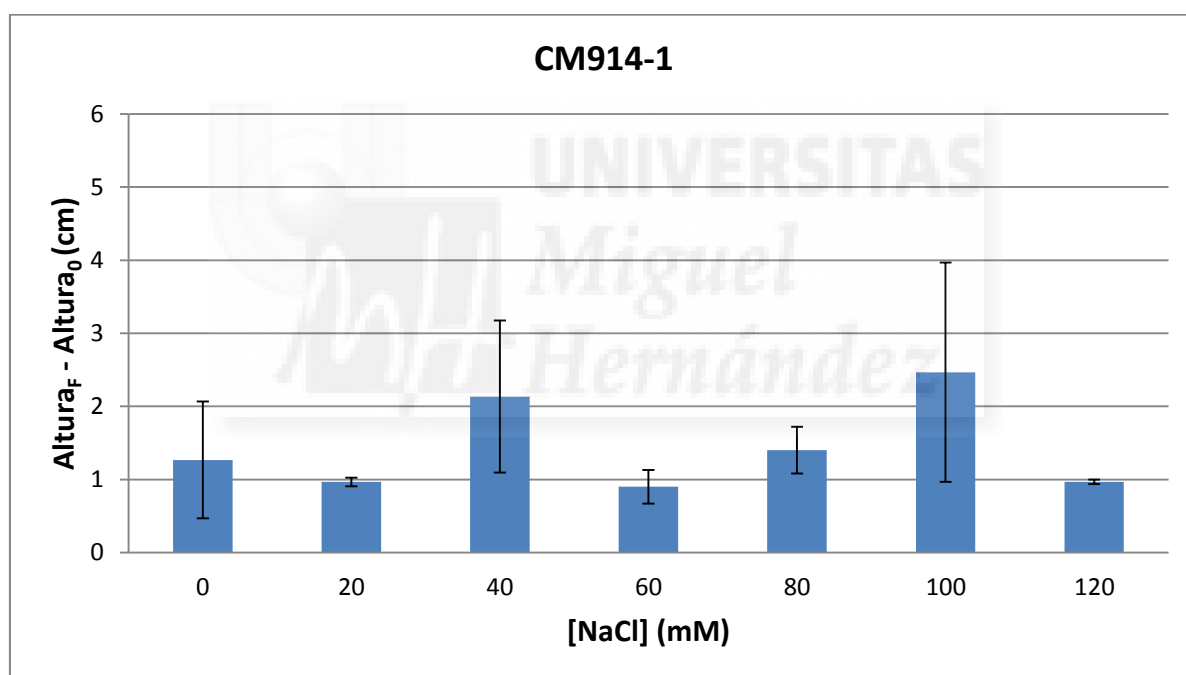


Figura 10. Media de las alturas y desviación estándar en plantas de la línea CM914-1.

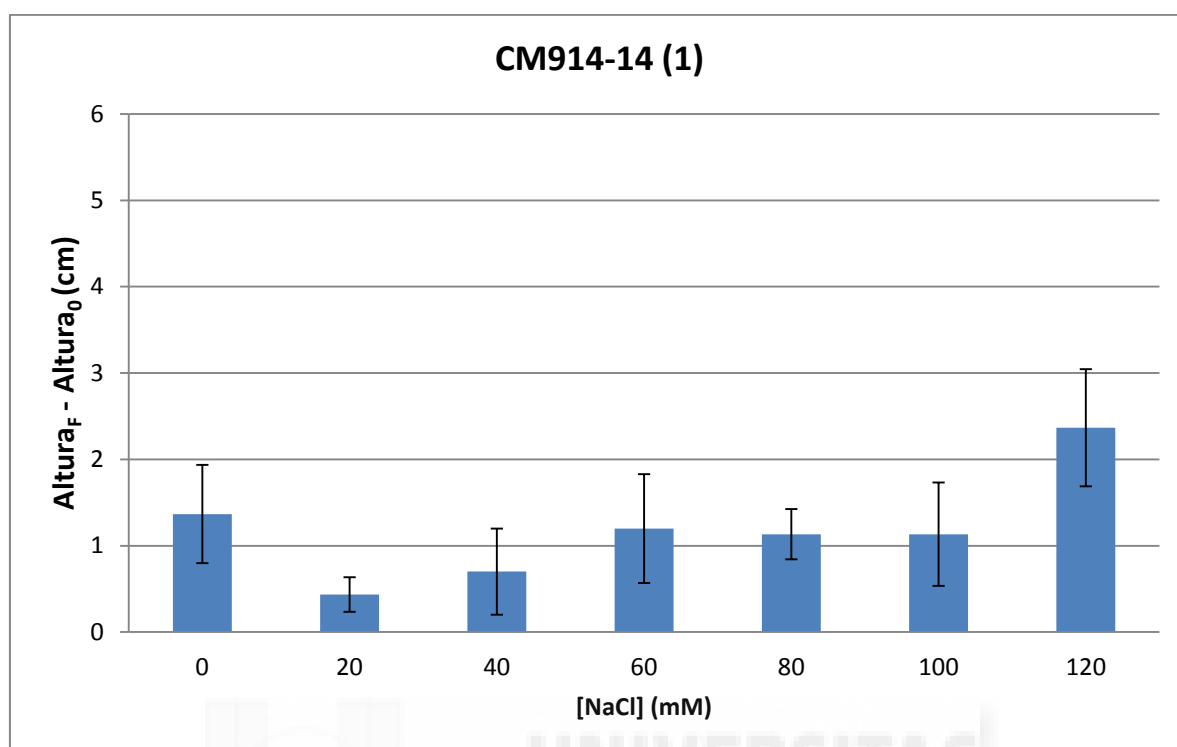


Figura 11. Media de las alturas y desviación estándar en plantas de la línea CM914-14(1).

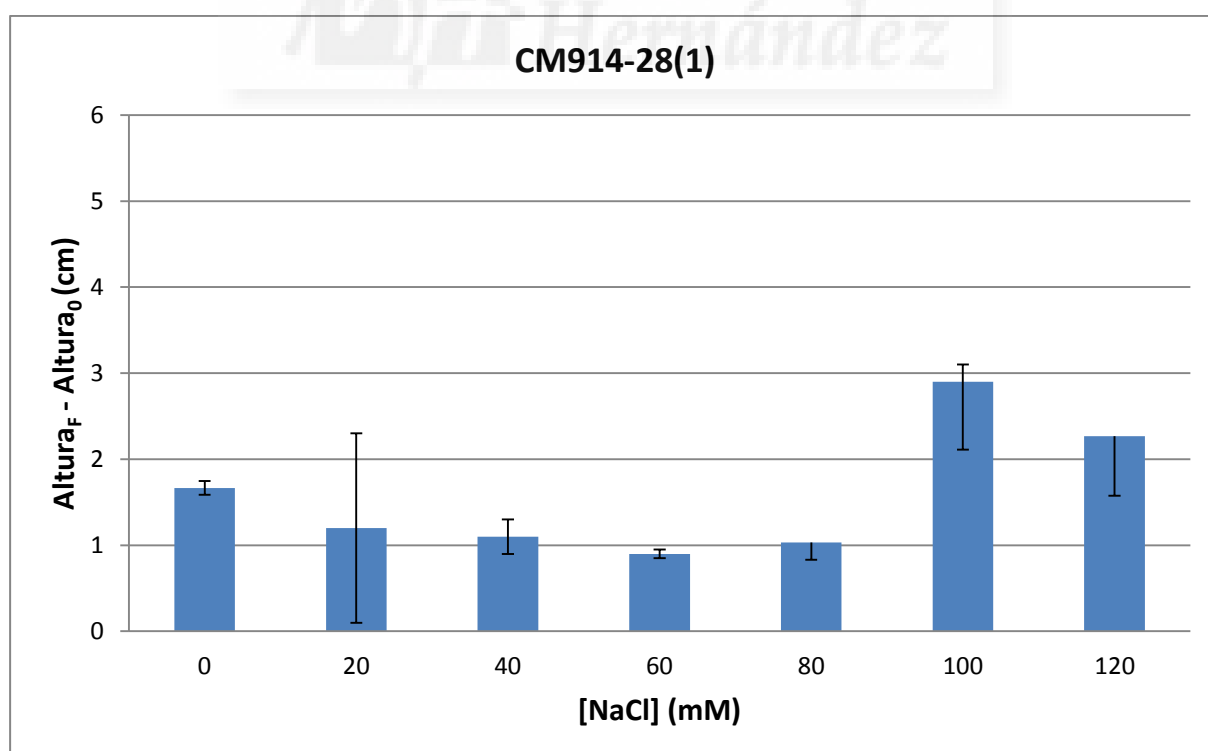


Figura 12. Media de las alturas y desviación estándar en plantas de la línea CM914-28(1).

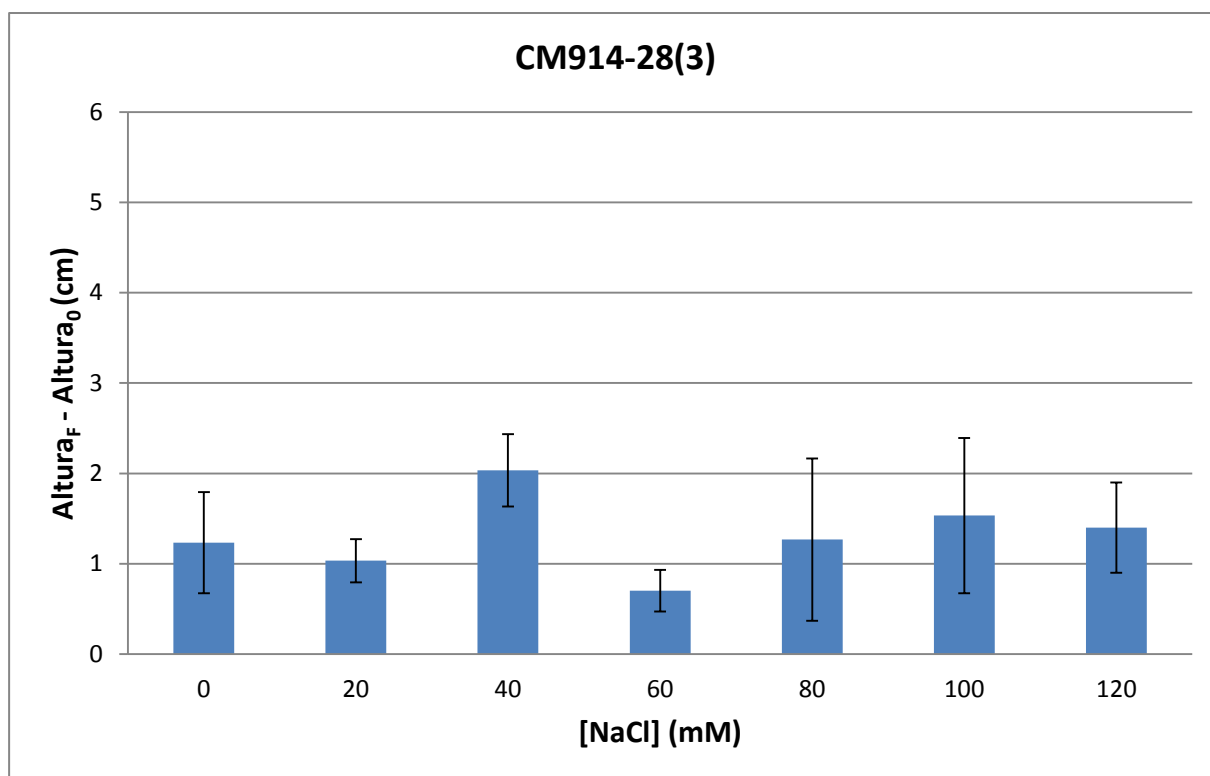


Figura 13. Media de las alturas y desviación estándar en plantas de la línea CM914-28(3).

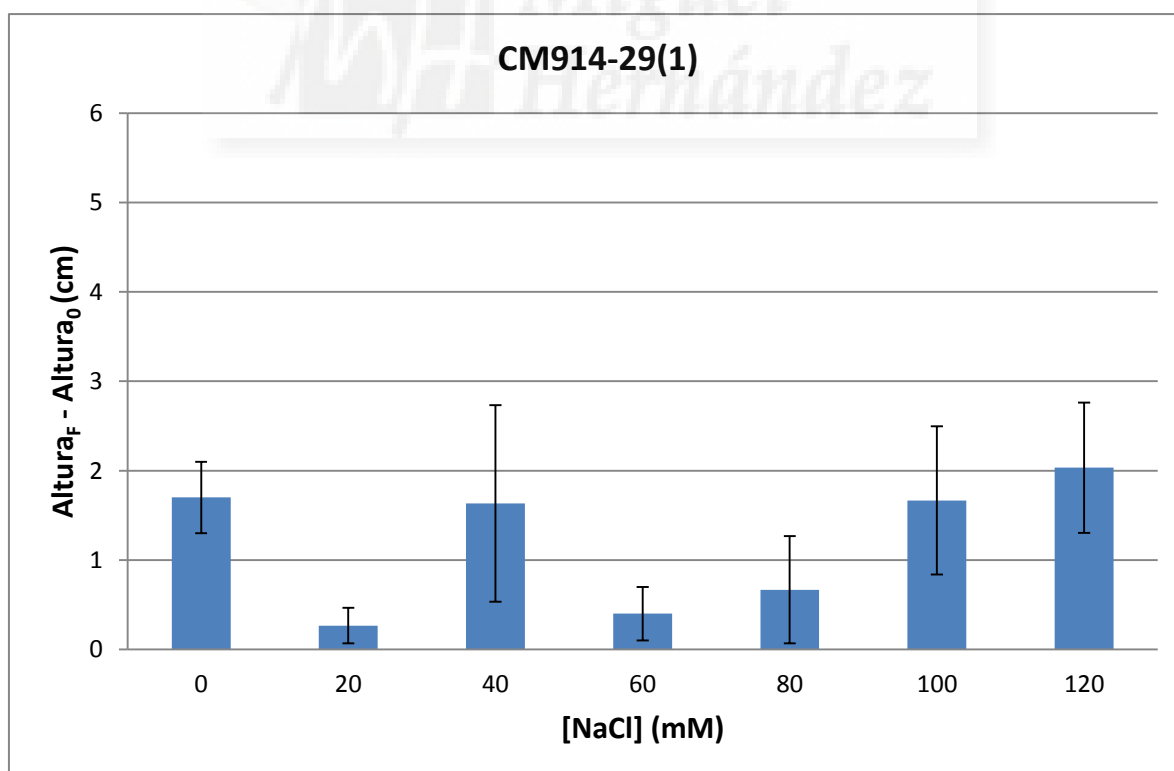


Figura 14. Media de las alturas y desviación estándar en plantas de la línea CM914-29(1).

Los resultados de las líneas mutantes se compararon con los crecimientos de la línea control para cada uno de los niveles de cloruro sódico estudiados (tabla 3).

[NaCl] (mM)	Control	CM914-1	CM914-14(1)	CM914-28(1)	CM914-28(3)	CM914-29(1)
0	3,266	1,266	1,366	1,666	1,233	1,700
20	4,233	0,966	0,433	1,200	1,033	0,266
40	3,966	2,133	0,700	1,100	2,033	1,633
60	1,566	1,133	1,200	0,900	0,700	0,400
80	1,600	1,400	1,133	1,033	1,266	0,666
100	0,766	2,466	1,133	2,900	1,533	1,666
120	0,833	0,966	2,366	1,266	1,400	2,033

Tabla 3. Desarrollo vegetativo de las líneas control y mutantes en función de la concentración de NaCl en el medio de cultivo.

Como se puede apreciar en la tabla 3, las plantas de las diferentes líneas mutantes presentan un desarrollo vegetativo superior al de los controles a partir de una concentración de 80 mM. Para concentraciones de NaCl menores de 80 mM la diferencia de crecimiento entre las plantas controles y las mutantes no es tan evidente, aunque el análisis estadístico (ANOVA multifactorial) donde se analizó el desarrollo vegetativo en función de la línea mutante y la concentración de NaCl, resultó estadísticamente significativo (tabla 4).

Varianza	Control- CM914-1	Control- CM914-14(1)	Control- CM914-28(1)	Control- CM914-28(3)	Control- CM914-29(1)
NaCl	0,0446	0,0703	0,063	0,006	0,0314
Línea	0,0278	0,0005	0,0234	0,003	0,0023
Línea x NaCl	0,0242	0,0002	0,0004	0,015	0,0045

Tabla 4. Resultados (valor P al 95% de confianza) de ANOVA multifactorial comparando el desarrollo vegetativo de las plantas control con cada una de las líneas mutantes y para cada nivel de NaCl

A partir de estos resultados obtenidos en las cinco líneas mutantes se seleccionó un total de 15 individuos o plantas que mostraron el mayor desarrollo vegetativo dentro de cada línea y concentración de NaCl (tabla 5).

Línea de mutantes	Concentración de NaCl (mM)																	
	20 mM			40mM			60mM			80mM			100mM			120mM		
CM914-1						3									9			
CM914-14(1)									5						7			13
CM914-28(1)		1															12	14
CM914-28(3)						2						6			10			
CM914-29(1)									4						8		11	
																		15

Tabla 5. Planta mutante seleccionada como tolerante a salinidad.

4.1.3 Regeneración de brotes laterales en mutantes *Calicó* seleccionados.

Se realizó un estudio comparativo en los mutantes seleccionados sobre el desarrollo de brotes laterales. Para ello, los 15 mutantes seleccionados se mantuvieron en medio de cultivo bajo las mismas condiciones de estrés salino y tras un periodo de 25 días se contó el número de brotes laterales emitidos y dichos datos se compararon con los obtenidos en la planta control no mutada sometidas a las mismas condiciones de estrés salino. Como se puede apreciar en la tabla 6, el número de brotes emitidos por las plantas mutantes seleccionadas previamente es significativamente superior al número de brotes laterales emitidos por la planta control. Estos datos vienen a corroborar que las plantas mutantes de *Calicó* seleccionadas en cada una de las líneas estudiadas presentan tolerancia al estrés salino.

[NaCl] (mM)	Brotos laterales CONTROL NM	Brotos laterales planta mutada
20	1	5
40	2	6,7
60	3	7
80	3	4,7
100	1	4,3
120	1	3

Tabla 6. Número de brotes laterales en plantas control y plantas mutantes seleccionadas bajo estrés salino. Los datos representan la media de brotes de tres repeticiones para cada concentración de sal.

4.1.4 Composición mineral de plantas control y plantas mutantes seleccionadas bajo estrés salino.

El objetivo de este punto ha sido estudiar la posible alteración de los minerales en las plantas debido a la alteración en los procesos osmóticos y de absorción de nutrientes que se producen en situaciones de estrés salino. Dichos datos se van a comparar entre plantas seleccionadas de las líneas mutantes y plantas control no sometidas a mutagénesis (tablas 7-10).

Planta	Línea CM914-	Bote	Na	K	Ca	Mg	P	% mineral
1	28(1)	20.2	0,300	3,543	0,355	0,133	0,230	2,042
2	28(3)	40.2	3,663	3,177	0,309	0,116	0,258	16,691
3	1	40.3	3,892	3,318	0,354	0,131	0,194	18,299
4	29(1)	40.3	4,405	2,095	0,288	0,114	0,140	29,974
5	14(1)	60.1	6,982	2,293	0,296	0,111	0,236	26,152
6	29(1)	80.3	5,766	3,526	0,287	0,114	0,247	29,125
7	14(1)	80.3	6,892	2,938	0,292	0,119	0,244	24,296
8	28(3)	80.1	6,637	3,373	0,304	0,139	0,212	24,505
9	29(1)	100.2	9,256	2,569	0,312	0,120	0,255	33,885
10	28(1)	100.3	7,704	2,778	0,246	0,114	0,283	25,600
11	28(3)	100.1	8,531	3,008	0,315	0,131	0,238	32,024
12	14(1)	100.2	7,549	2,492	0,252	0,108	0,195	25,531
13	29(1)	120.3	9,990	2,858	0,405	0,152	0,264	34,878
14	28(1)	120.2	3,890	3,694	0,361	0,126	0,211	18,933
15	14(1)	120.1	7,800	2,443	0,288	0,116	0,167	28,142

Tabla 7. Composición de macronutrientes en las líneas Calicó mutadas seleccionadas.

Planta	Línea	Na	K	Ca	Mg	P	% Mineral
Control NM 0	Control NM 0	2,177	4,100	0,424	0,151	0,218	1,279
Control NM 20	Control NM 20	1,442	3,827	0,244	0,141	0,360	11,231
Control NM 40	Control NM 40	2,652	3,465	0,271	0,116	0,217	15,923
Control NM 60	Control NM 60	6,090	4,362	0,338	0,128	0,209	25,134
Control NM 80	Control NM 80	7,236	3,934	0,346	0,142	0,182	25,921
Control NM 100	Control NM 100	8,314	3,027	0,254	0,111	0,186	26,698
Control NM 120	Control NM 120	8,071	3,203	0,224	0,098	0,158	29,292

Tabla 8. Composición de macronutrientes en las líneas control Calicó no mutadas.

Planta	Línea CM914-	Bote	Fe	Cu	Mn	Zn	B
1	28(1)	20.2	284,3	194,0	94,6	176,0	63,1
2	28(3)	40.2	111,7	4,7	111,6	62,2	51,6
3	1	40.3	142,9	3,0	150,7	62,9	56,3
4	29(1)	40.3	392,6	29,9	113,7	85,3	45,6
5	14(1)	60.1	128,9	4,1	131,1	56,9	58,6
6	29(1)	80.3	216,6	3,1	115,3	106,3	52,0
7	14(1)	80.3	123,9	2,9	118,5	62,8	49,3
8	28(3)	80.1	244,8	10,1	119,0	57,0	49,1
9	29(1)	100.2	312,1	3,0	106,4	62,5	52,1
10	28(1)	100.3	161,9	4,1	91,9	58,1	43,9
11	28(3)	100.1	198,3	6,2	107,4	65,0	53,9
12	14(1)	100.2	237,9	7,9	94,5	58,2	43,5
13	29(1)	120.3	312,2	3,9	143,7	69,2	62,9
14	28(1)	120.2	264,5	24,8	138,9	78,7	62,7
15	14(1)	120.1	258,6	7,4	108,4	47,5	49,4

Tabla 9. Composición de micronutrientes en las líneas Calicó mutadas seleccionadas.

Planta	Línea	Fe	Cu	Mn	Zn	B
Control NM 0	Control NM 0	409,6	98,1	110,3	123,7	45,3
Control NM 20	Control NM 20	105,8	2,5	110,3	74,2	57,4
Control NM 40	Control NM 40	107,9	5,5	93,7	62,2	48,9
Control NM 60	Control NM 60	78,7	2,8	118,7	70,2	56,5
Control NM 80	Control NM 80	100,1	3,3	126,7	76,9	55,8
Control NM 100	Control NM 100	103,0	2,3	84,4	74,8	46,2
Control NM 120	Control NM 120	247,2	3,9	90,4	65,6	40,4

Tabla 10. Composición de micronutrientes en las líneas control Calicó no mutadas.

En la tabla 8 de la planta control no mutada, se observa como con el incremento de la concentración de NaCl, el ion sodio se acumula y compite con la absorción del resto de nutrientes, mostrándose una disminución en la concentración principalmente de potasio y fósforo con el incremento de la concentración de sal. En general, la composición nutricional de las plantas control y las plantas mutadas no muestran entre ellas diferencias para cada nivel de salinidad.

Con el incremento de los niveles de sal en medio de cultivo se produce también un incremento en el porcentaje de materia seca de las plantas, tanto en plantas control como en plantas mutantes seleccionadas, lo cual parece estar relacionado con el incremento de la concentración de sodio en las plantas observado a niveles crecientes de salinidad.

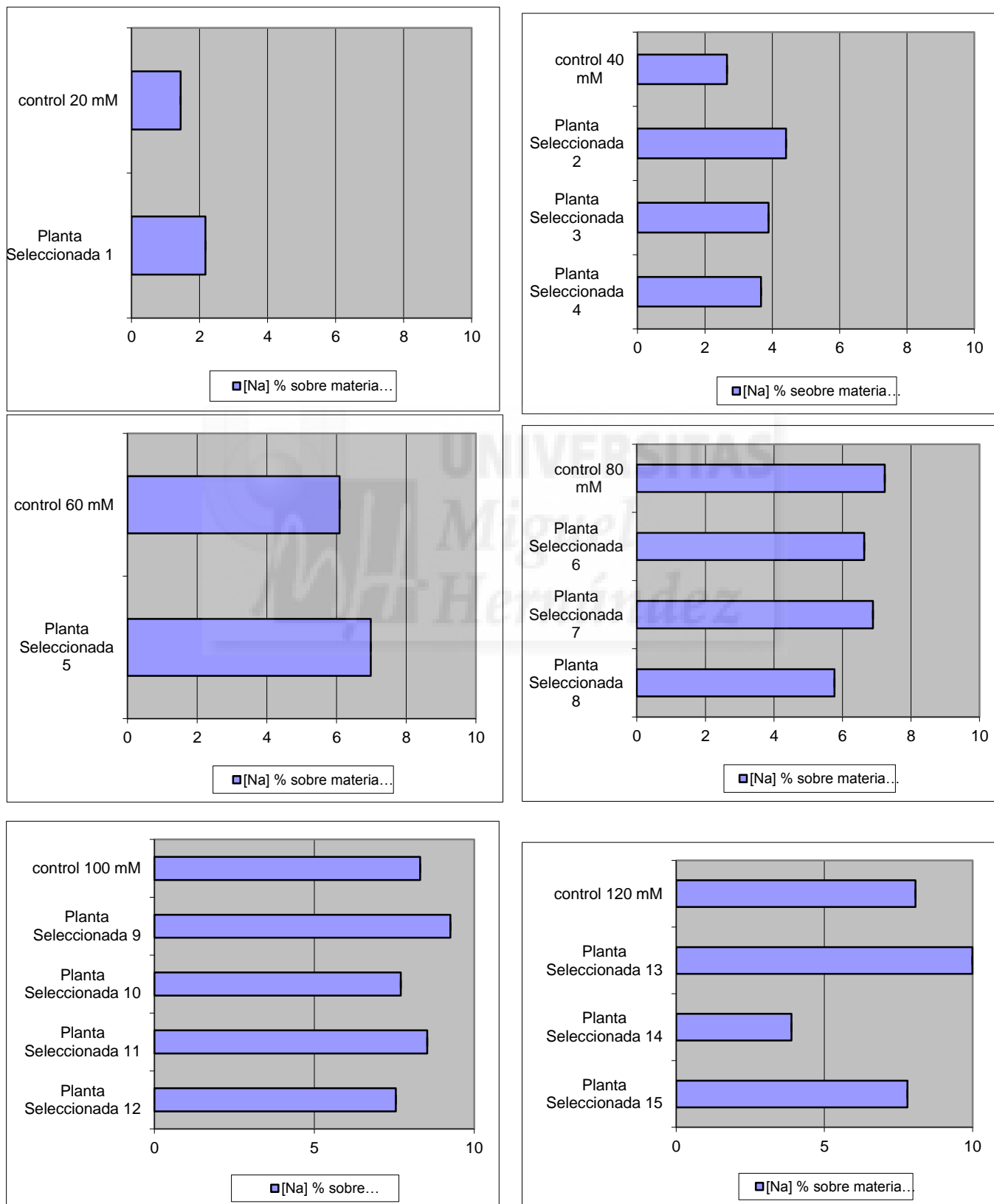


Figura 15. Concentración de sodio en las plantas (% en materia seca) para cada concentración de NaCl.

Las gráficas anteriores representan el contenido en sodio (%sobre materia seca) de las plantas control y las plantas mutantes seleccionadas para cada concentración de NaCl. Como se observa, los contenidos en sodio se incrementan con el incremento de la salinidad del medio tanto en la planta control como en las plantas de las líneas mutantes seleccionadas. No se puede decir por tanto, que el mayor desarrollo vegetativo observado en las plantas mutantes se deba a un mejor mecanismo en la regulación de la absorción de sodio. Se concluye entonces que deben de estar actuando otra serie de mecanismos que permiten a la planta una actividad metabólica normal bajo estrés salino.

4.2 Comportamiento de las líneas de mutantes de *Romanesco* bajo estrés salino.

4.2.1 Comportamiento de la línea control no mutada en *Romanesco*

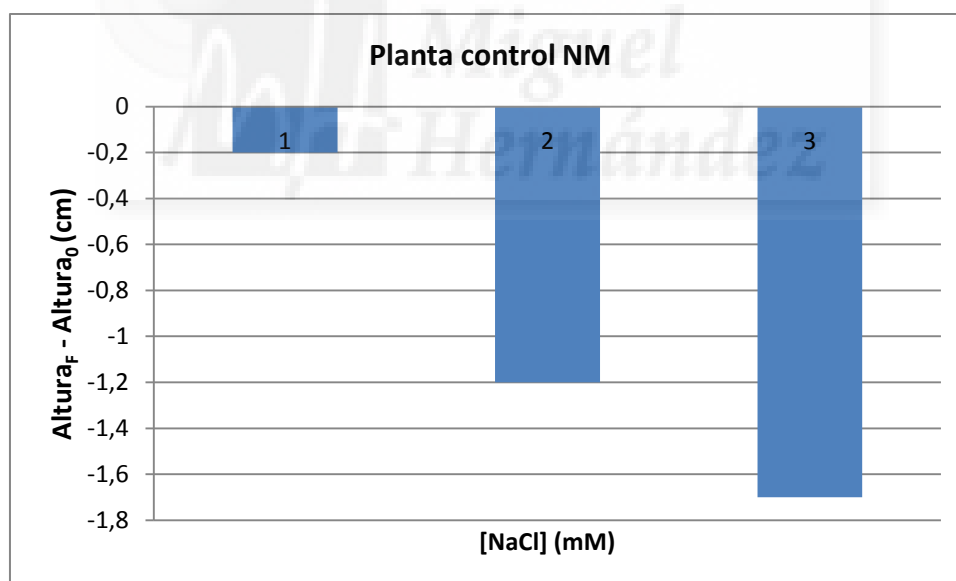


Figura 16. Crecimiento de planta control *Romanesco* bajo estrés salino

En la figura número 16 se muestra el crecimiento tras 25 días de cultivo de las tres plantas no mutadas sometidas a estrés salino (322,22mM). Como se observa, tras comparar la altura inicial con la altura final, las plantas han experimentado una disminución en su altura, observándose que las hojas se curvaban, presentaban engrosamientos y el brote central no experimentaba

desarrollo a lo largo del periodo de cultivo (figura). La media de crecimiento fue de $-1,033$ cm con una desviación estándar de $-0,7$.



Figura 17. Efecto de la salinidad en planta Romanesco

4.2.2 Comportamiento de la línea control no mutada en *Romanesco*

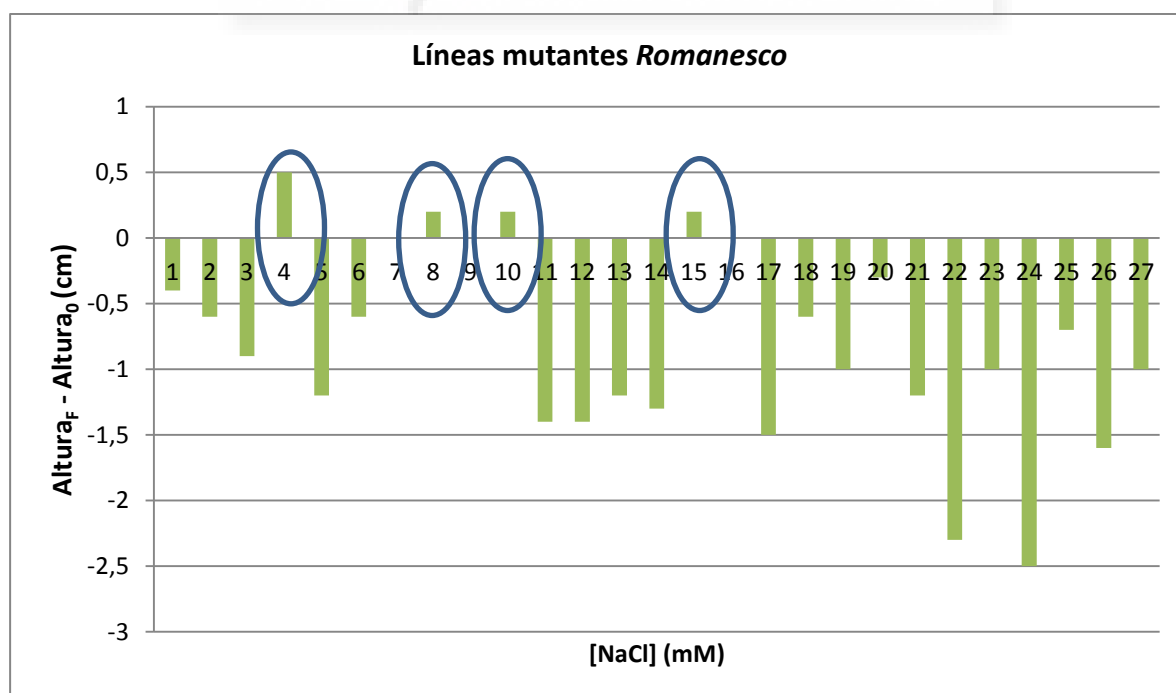


Figura 18. Crecimiento de plantas mutantes de Romanesco bajo estrés salino

Al igual que en la planta control, la mayoría de las líneas mutantes inducidas en *Romanesco*, mostraron un crecimiento negativo al final del periodo de cultivo. Esto indica que dichas plantas no son tolerantes a estrés salino, posiblemente el proceso de mutagénesis no ha afectado a ningún mecanismo relacionado con la resistencia a la salinidad. No obstante, cuatro líneas de plantas mutantes mostraron un crecimiento positivo al final del periodo de cultivo (figura 18). Estas plantas constituyen cuatro líneas de plantas tolerantes a estrés salino de *Romanesco*.

Estas cuatro plantas seleccionadas en medio salino a una concentración de 322,22mM de NaCl, mostraron además de un crecimiento positivo, la capacidad de esta planta de regenerar brotes laterales (figura 19).



Figura 19. Ejemplo de planta Romanesco seleccionada bajo estrés salino

5. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

- ✓ Se han identificado mutantes tolerantes a salinidad en la variedad de alcachofa *Calicó*.
- ✓ Se ha inducido y evaluado la tolerancia a la salinidad en plantas de alcachofa de la variedad Romanesco, lo que ha permitido identificar cuatro líneas tolerantes a salinidad.
- ✓ Se ha demostrado que la mutagénesis al azar con EMS seguida de mecanismos de selección de plantas es una buena metodología para la mejora vegetal.
- ✓ Se ha demostrado que dentro de una misma línea de plantas mutantes existen individuos con características diferenciales que se pueden poner de manifiesto cuando estas plantas son sometidas a procesos de selección bajo estrés abiótico o biótico.
- ✓ El incremento de salinidad provoca un incremento en la concentración de sodio que se puede relacionar con el incremento en el porcentaje en materia seca de los tejidos vegetales. No parece que solamente el mecanismo para controlar los niveles de sodio actúe en plantas de alcachofa tolerantes a estrés salino.

Aunque no se ha abordado en este trabajo, dos aspectos a tener en cuenta para trabajos futuros son;

- Las líneas mutantes deben ser estudiadas en finca experimental para evaluar las características agronómicas.
- El análisis genómico de las plantas ayudaría a identificar genes potenciales implicados en los mecanismos de tolerancia a estrés salino.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aswath, C. and Choudhary, M.L.**, 2002, Rapid plant regeneration from *Gerbera jamesonii* Bolus callus. *Acta Bot. Croat.*, 61, 125–134.
- Bhaskar G, Bingru H.**, 2014. Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. *International Journal of Genomics*, Volume 2014, Article ID 701596, 18 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/701596>
- Begum T., Dasgupta T.** A comparison of the effects of physical and chemical mutagens in sesame (*Sesamum indicum* L.). *Genetics and Molecular Biology*, 33(4): 761-766 (2010).
- Bianco C.L., Fernández J. A., Migliaro D., Crinò P., Egea-Gilabert C.** (2011) Identification of F1 hybrids of artichoke by ISSR markers and morphological análisis. *Molecular breeding* (27) 2: 157 – 170.
- Chu, I.Y.E. y Kurtz, S.L.**, 1990, Commercialization of plant micropropagation. In *Handbook of plant cell culture*, vol 5. Ed. Ammirato, A.V., Evans, D.A., Sharp, W.R., Bajaj, Y.P.S., McGraw Hill, New York, pp 126–158.
- Constabel, F., Shyluk, J.P.**, 1994. Initiation, nutrition, and maintenance of plant cell and tissue culture. In: Vasil IK & Thorpe TA (eds) *Plant Cell and Tissue Culture*, (pp. 3–15). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Datta S. K.** A report on 36 years of practical work on crop improvement throught induced mutagenesis (2009). En: K. Y. Shu (Ed.) *Induced plant mutation in the Genomics Era*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 253 – 256.
- Datta, S.K. y Teixeira da Silva, J.A.**, 2006, Role of induced mutagenesis for development of new flower colour and type in ornamentals. In *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues Vol.1*. Ed. Teixeira da Silva, J.A., Global Science Books Ltd. London, pp. 640-645.
- Du Plooy C.P., Steenekamp, P.J., Vincent, A.P. Human, C.F., Koekemoer, P.J.J.** Mutation breeding strate GY for citrus in South Africa. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 1, 110-112 (1992).

- Dhanavel D., Pavadai P., Mullainathan L., Mohana D., Raju G., Girija M., Thilagavathi C.** Effectiveness and efficiency of chemical mutagens in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) African Journal of Biotechnology, 7(22): 4116-4117 (2008).
- El-Sayed, H. E., H., Sherin A. M., Shaltout, A.D., El-Dougdoug, K.A., Sayed. R.A.,** 2012. Chemical mutation induction *in vitro* cultured shoot tip of banana Cv. Grand Nain for resistance to some virus diseases. Int. J. Virol. 8, 178-190.
- Fortunato, I.M., Ruta, C., Castrignano, A. and Saccardo, A.,** 2005, The effect of mycorrhizal symbiosis on the development of micropropagated artichokes. Sci. Hort., 106, 472-483.
- Froneman I.J., Breedts H.J., Koekemoer P.J.J., Van Rensburg P.J.J.** Producing seedless citrus cultivars with gamma irradiation. Proc. Int. Soc. Citriculture 1, 159-163 (1996).
- Huefner, N.D., Friesner, J.D., Britt, A.B.,** 2009. Characterization of Two H2AX Homologues in *Arabidopsis thaliana* and their Response to Ionizing Radiation. In *Induced Plant Mutation in the Genomic Era*, Ed. Shu, Q.Y. FAO-IAEA, Roma, pp. 113-117.
- Iapichino G.** Micropropagation of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) from underground dormant buds ("Ovoli"). *In vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 32: 249-252 (1996).
- Jain S. M.** Mutation-assisted breeding for improving ornamental plants. 22nd International Eucarpia Symposium Section Ornamentals: Breeding for Beauty. 11- 15 September 2006, Sanremo Italia.
- Jain, S.M. y Maluszynski, M.,** 2004. Induced mutations and biotechnology on improving crops. In *In Vitro applications in Crop Improvement: Recent Progress*, Ed. Mujib A., Cho M., Predieri A. and Banerjee S., IBH-Oxford, New Delhi, pp.169-202.
- Jain, S.M. y Spencer, M.M.,** 2006. Biotechnology and mutagenesis in improving ornamental plants. In *Floriculture and Ornamental Biotechnology: Advances and Tropical Issues Vol.1*. Ed. Teixeira da Silva, J.A., Global Science Books Ltd. London. pp.1749-2036.
- Jain, S.M., Ochatt, S.J., Kulkarni, V.M. and Predieri, S.** 2010. *In vitro* culture for mutant development. Acta Hort. (ISHS) 865, 59-68.

- Karp, A.**, 1994. Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. In *Plant Cell and Tissue Culture*, Eds. Vasil, I.K. and Thorpe, T.A., Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 139-151.
- Kchouk, M.L., Mliki, A., Chatibi, A., Ghorbel, A.**, 1997. In vitro organogenesis and transgenesis aspects in globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Cell.Mol. Biol.*, 1997, 399-408.
- Kulkarni, M.G., Street, R.A., Van, S.J.**, 2007. Germination and seedling growth requirements for propagation of *Dioscorea dregeana* (Kunth) Dur. and Sching-A tuberous medicinal plant. *South Afr. J. Bot.*, 73, 131-137.
- Kopecky D., Vagera J.** The use of mutagens to increase of the androgenic progeny production in *Solanum nigrum*. *Biologia Plantarum* 49 (2): 181-186 (2005).
- Larkin, P.J. and Scowcroft, W.R.**, 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.*, 60, 197–214.
- Li H.Z., Zhou W.J., Zhang Z.J., Gu H.H., Takeuchi Y., Yoneyama K.** Effect of radiation on development, of microtubers in vitro in *Solanum tuberosus* L. *Biologia Plantarum* 49(4): 625-628 (2005).
- López-Pérez AJ., Martínez JA.** (2015) In vitro root induction improvement by darkness culture in different globe artichoke cultivars. *In vitro cell dev. biol. plant.* DOI 10.1007/s11627-015-9667-z
- Martínez J.A., Carbonell M. y almela L.** (2004). Influence of giberelic acid (GA3) and planting distance on globe artichoke cultivars affected by tomato spotted wilt virus (TSWV). *Acta horticulturae*, 660, 181-184.
- Martínez J.A., Carbonell M.** (2011). Study of new cultivars of artichoke with sexual propagation pluriannual cycle. *Acta horticulturae* 942, 181-184.
- Mensah, J. K., Obadoni, B. O., Akomeah, P. A., Ikhajiagbe, B., Ajibolu, J.** The effects of sodium azide and colchicine treatments on morphological and yield traits of sesame seed (*Sesame indicum* L.). *African Journal of Biotechnology* Vol. 6(5): 534-538 (2007).
- Miguel A., Maroto J. V., Bartual R., Baixauli C., García M. J., López S.** Efecto de un tratamietno de prebrotación y de la aplicación de diversos fitorreguladores sobre el comportamiento

productivo de plantas procedentes de cultivo *in vitro* de alcachofas (*Cynara scolymus*) cv Blanca de Tudela. Agrícola Bergel 681 – 685 (Diciembre, 1996).

Navacchi, O., Zuccherelli, G. and Zuccherelli, S. 2005. *In vitro* multiplication of artichoke and virus elimination by thermotherapy and chemotherapy. Acta Hort. (ISHS) 681:397-402.

Morzadec J.M., Hourmant A. 1997. *In vitro* rooting improvement of globe artichoke (cv. Camus de Bretagne) by GA3. Scientia Horticulturae 72: 59 – 62.

Nagatomi, S. et al. Combined effect of gamma irradiation methods and *in vitro* explant sources on mutation induction of flower color in *Chrysanthemum molifolium* RAMAT. Gamma Field Symposia 35, 51-68 (1996).

Novak F.J., Afza R., Van Duren M., Omar M.S. Mutation induction by gamma irradiation of *in vitro* cultured shoot tips of banana and plantain (*Musa* spp.). Tropical Agric. Trinidad 67, 21-28 (1990).

Predieri, S., 2001. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 64, 185-210.

Puthur, J.T., Prasad, K.V.S.K., Sharmila, P. and Saradhi, P.P., 1998, Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi improves establishment of micropropagated *Leuceana leucocephala* plantlets. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 53, 41-47.

Romero R. 2012. Técnicas para la mejora de la rizogénesis en alcachofa propagada *in vitro*. Tesis de Grado. Universidad de Murcia.

Roux, N., Toloza, A., Dolezel, J., Panis, B. Usefulness of embryogenic cell suspension cultures for the induction and selection of mutants in *Musa* spp. In: Jain SM and Swennen R (Eds). Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology and Induced Mutations. Science Publishers, NH, USA. p.33-43 (2004).

Russo, F. Donini, B., Starrantino, A. Mutation applied for citrus improvement. Proc. Int. Soc. Citriculture 1, 68-70 (1981).

Sanada, T. Induced mutation breeding in fruit trees: Resistant mutant to black spot disease of Japanese pear. Gamma Field Symposia 25, 91-102 (1994).

- Schultz, C.**, 2001, Effect of (vesicular-) arbuscular mycorrhiza on survival and *post vitro* development of micropropagated oil palms (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Ph.D Thesis*, Georg-August University, Gottingen, Germany.
- Starrantino, A., Mannino, P, and Russo, F.** The genetic stability of three seedless clonalselections obtained by gamma rays of the seedy 'Monreal' clementine. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 2, 175-181 (1988).
- Stamigna, C., Pandozy, G., Saccardo, F., Ancora, G. and Crinò, P.** 2005. In Vitro mutagenesis of globe artichoke (cv. Romanesco). *Acta Hort. (ISHS)* 681:403-406.
- Stamigna C., Crinò P., Chatelet P., Saccard F.** (2004) Induction of embryogenesis in isolated microspores of artichoke (*Cynara scolimus* L). *Acta Horticulturae* 660, 139 – 143.
- Van Harten, A.M.**, 1998, *Mutation Breeding: Theory and Practical Applications*. Cambridge University Press, London.
- Venere D.D., Linsalata V., Pieralice M., Cardinali A., Sergio L. Crinò P.** (2007) Biochemical characterization of clones of two 'Romanesco' artichoke landrace. *Acta Horticulturae* 730, 443 – 448.