

FRECUENCIA DE MUTACIONES INDUCIDAS POR RADIACION GAMMA  
Y METANOSULFONATO DE ETILO EN LA SEMILLA DE FRIJOL

*(Phaseolus vulgaris L.)*

Tesis de Grado de *Magister Scientiae*

*Luis Francisco Delgado de la Flor Badaracco*

INSTITUTO INTERAMERICANO DE CIENCIAS AGRICOLAS DE LA OEA  
Centro de Enseñanza e Investigación  
Departamento de Fitotecnia y Suelos  
Turrialba, Costa Rica  
Abril, 1970

FRECUENCIA DE MUTACIONES INDUCIDAS POR RADIACION GAMMA  
Y METANOSULFONATO DE ETILO EN LA SEMILLA DE FRIJOL  
(Phaseolus vulgaris L.)

Tesis

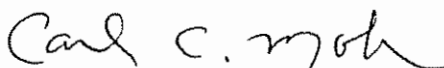
Presentada al Consejo de la Escuela para Graduados  
como requisito parcial para optar al grado de

Magister Scientiae

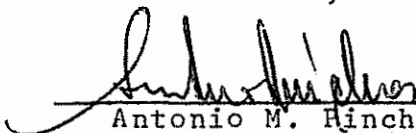
en el

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA


APROBADA:

  
\_\_\_\_\_  
Carl C. Moh, Ph.D.

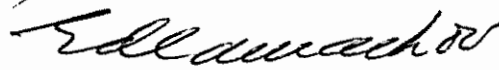
Consejero

  
\_\_\_\_\_  
Antonio M. Hinchinat, Ph. D.

Comité

  
\_\_\_\_\_  
Adalberto Gorbitz, Ing. Agr.

Comité

  
\_\_\_\_\_  
Edilberto Camacho, Mag. Agr.

Comité

Abril, 1970

A mi Madre

A Rochi

## AGRADECIMIENTO

El autor desea expresar su agradecimiento:

Al Dr. Carl C. Moh, Consejero Principal, por las enseñanzas recibidas y por su acertada orientación en el desarrollo y planeamiento del presente trabajo de tesis.

Al Dr. Antonio Pinchinat, al Ing. Adalberto Gorbitz y al Ing. Edilberto Camacho, M. A., miembros del Comité Consejero, por el asesoramiento del presente trabajo.

Al Ing. Juan José Alán, M. S., por sus valiosos consejos y sugerencias.

Al Dr. Gilberto Páez por su acertada intervención en el análisis estadístico del presente trabajo.

Al Programa de Energía Nuclear (NEP) por las atenciones dispensadas durante el tiempo que duraron los estudios de post-grado en esta institución.

A sus profesores, compañeros de estudios, personal auxiliar y de laboratorio que de una u otra forma contribuyeron a la realización de la presente tesis.

A sus amigos.

## BIOGRAFIA

El autor nació en 1943 en la ciudad de Ica, Perú.

Cursó sus estudios en el Colegio de la Inmaculada y en el Colegio Militar Leoncio Prado en la ciudad de Lima.

Sus estudios universitarios los realizó en la Universidad Agraria "La Molina", graduándose de Ingeniero Agrónomo en 1966.

Desde 1967 trabajó en la Universidad del Altiplano en Puno, Perú; donde se desempeñó como docente en la Facultad de Agronomía ocupando los cargos de Jefe del Departamento de Producción Agrícola y Presidente del Consejo de Investigación de dicha Facultad.

En Septiembre de 1968 ingresó a la Escuela de Graduados del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA, becado por el Programa de Energía Nuclear (NEP) para realizar estudios de postgrado en la especialidad de citogenética, egresando en Abril de 1970.

## CONTENIDO

	<u>Página</u>
1. INTRODUCCION . . . . .	1
2. REVISION DE LITERATURA . . . . .	3
2.1 Generalidades sobre los agentes mutagénicos . . . . .	3
2.2 Efecto de radiaciones ionizantes en plantas . . . . .	4
2.3 Efecto de los mutagénicos químicos en plantas . . . . .	5
2.4 Efectos mutagénicos comparativos entre el EMS y los rayos gamma . . . . .	6
2.5 Herencia del color de los tegumentos seminales del frijol. . . . .	7
3. MATERIALES Y METODOS . . . . .	9
4. RESULTADOS . . . . .	11
4.1 Frecuencia de mutaciones. . . . .	11
4.2 Tamaño de las quimeras. . . . .	14
4.3 Selección de los mutantes en la coloración del episperma . . . . .	17
5. DISCUSION. . . . .	19
5.1 Frecuencia de mutaciones. . . . .	19
5.2 Tamaño de las quimeras. . . . .	20
5.3 Selección de los mutantes en la coloración del episperma . . . . .	20
6. CONCLUSIONES . . . . .	22
7. RESUMEN. . . . .	23
7a. SUMMARY. . . . .	25
8. LITERATURA CITADA. . . . .	26

## LISTA DE CUADROS

<u>Cuadro</u>		<u>Página</u>
1	Frecuencia de mutaciones inducidas por EMS y radiaciones gamma en diferentes estados de germinación de semillas de frijol	12
2	Prueba de partición ortogonal de los componentes de variancia por chi-cuadrado	13
3	Tamaño de quimeras inducidas por EMS y radiación gamma en diferentes estados de germinación de semillas en dos variedades de frijol	16
4	Mutaciones de cambio de color del episperma de las semillas seleccionadas de tratamientos con EMS en dos variedades de frijol	18

## 1. INTRODUCCION

La mutación, característica heredable proveniente de un cambio en el material genético es un importante proceso biológico en la evolución y en el mejoramiento de plantas y animales. Las mutaciones pueden ser espontáneas o inducidas.

La frecuencia de las mutaciones espontáneas es generalmente baja, pero mediante el empleo de agentes mutagénicos es posible incrementarla, contribuyendo a aumentar la variabilidad genética y por ende, las posibilidades de seleccionar características deseables para la producción agrícola.

En los últimos 50 años investigaciones exhaustivas sobre mutaciones inducidas han mostrado que algunos agentes físicos, como los rayos gamma y químicos, como el metanosulfonato de etilo (EMS), son potentes mutagénicos. Se sabe también que la sensibilidad de un organismo a los mutagénicos varía grandemente según su estado de desarrollo celular. Esto se debe a que una mayor actividad de la célula aumenta la sensibilidad de los tejidos a la acción de los agentes mutagénicos.

Es importante investigar cuál es el estado de desarrollo celular en el que se deben aplicar los agentes mutagénicos para obtener una mayor frecuencia de mutaciones.

En este estudio se ha utilizado el frijol (Phaseolus vulgaris L.) como material experimental. La importancia de este cultivo en Latinoamérica no necesita explicación. Sus características de alimento básico, corto ciclo de vida, forma de polinización y características genéticas diversas, son excelentes para estudios de mutaciones inducidas.

El presente trabajo pretende determinar el momento más oportuno durante el período de germinación de las semillas, en el que se deben



aplicar los agentes mutagénicos para obtener una mayor frecuencia de mutaciones.

El aspecto práctico de esta investigación es la selección de mutantes con cambios en la coloración del episperma, que puedan aprovecharse en los programas de mejoramiento genético de los cultivos.

## 2. REVISION DE LITERATURA

### 2.1 Generalidades sobre los agentes mutagénicos

Desde su descubrimiento por Roentgen en 1895, los rayos X se utilizaron en muchos experimentos biológicos, limitados sin embargo al estudio de las respuestas morfológicas y fisiológicas (21).

En 1901, De Vries estudió por primera vez la ocurrencia de mutaciones en el material hereditario en sus trabajos con Oenothera. Sin embargo, no fue sino hasta 1927 que se intensificaron las investigaciones de este tipo, cuando Muller en Drosophila melanogaster y Stadler en cebada y maíz, mostraron evidencias concretas de que los rayos X incrementan la frecuencia de mutaciones.

Después de estos descubrimientos, aumentó notablemente el uso de las radiaciones ionizantes como productoras de mutaciones; primero en Europa, principalmente en Suecia y Alemania, y a partir de 1950, en Estados Unidos de América donde se pensaba que las radiaciones sólo causaban cambios de constitución genética deletérea (18, 21, 37).

Aunque los mutagénicos químicos se conocieron también desde hace bastante tiempo, su uso se incrementó después de los trabajos de Auerbach y Robson (2), quienes descubrieron las propiedades mutagénicas del gas mostaza al aplicarlo en Drosophila melanogaster en 1942.

En 1958, Prakken (32) revisó la literatura existente sobre mutaciones y recomendó estudiar cuidadosamente las técnicas que prometieran una mayor producción y selección de mutantes.

## 2.2 Efecto de radiaciones ionizantes en plantas

En 1930, Stadler (39) en experimentos en cebada, maíz, trigo y avena, encontró que cerca del 90 por ciento de las mutaciones inducidas por rayos X podían reconocerse en el estado de plántula, alrededor de las dos semanas de edad, y que la mayoría de ellas eran cloróticas, debido en parte al método de inducción de mutaciones. Indicó también que las semillas en el estado de germinación mostraban una mayor frecuencia de mutaciones que en el estado de latencia, porque los rayos X intensifican el crecimiento de los tejidos y las semillas germinadas eran más sensitivas al efecto de las radiaciones. Estas afirmaciones fueron corroboradas por Gustafsson (13), Jean (15) y Gunter y Brown (11).

En 1953, Ehrenberg y otros (8) en experimentos realizados con cebada, encontraron que cuando las semillas se embebían con agua antes de la aplicación de rayos X, se obtenía una mayor frecuencia de mutaciones y con dosis bajas de radiación se producían más aberraciones cromosómicas, mutaciones y esterilidad, que con dosis altas, las cuales daban menor porcentaje de germinación y de frecuencia de mutaciones. En 1956, Nilan (29) y en 1960, Ehrenberg (7) señalaron que la eficiencia de las radiaciones como inductoras de mutaciones era influenciada por el contenido de agua de las semillas, el genotipo de éstas, la temperatura durante la germinación, la edad de los tejidos, el estado de la división celular, el número y tamaño de las cromosomas, el tipo de radiación y la presencia o ausencia de ciertos productos químicos.

Según Nilan et al. (30), el oxígeno era el agente más importante en los cambios genéticos causados por radiaciones en las semillas, y la magnitud de estos cambios dependían principalmente de la humedad de los tejidos, lo que corrobora los resultados anteriores.

En 1964, Heslot (14) señaló que los rayos X alteraban los ácidos nucleicos, rompiendo las ligaduras químicas de las bases o produciendo radicales libres del agua ( $H^+$ ,  $OH^-$ ) de las moléculas orgánicas, los cuales atacaban los constituyentes del DNA del cromosoma.

Según Pompeu (31), en el frijol las radiaciones causan mayormente alteraciones cloróticas y deformaciones en las hojas. Las dosis muy elevadas de radiación provocan esterilidad, enanismo y muerte de las plántulas (11).

### 2.3 Efecto de los mutagénicos químicos sobre las plantas

Después del descubrimiento de las propiedades mutagénicas del gas mostaza, se probó un gran número de agentes químicos. Prakken (32) indica que entre los primeros trabajos, sobresalen los de Oekkers en 1943, con etil uretano, y de Rapaport en 1946, con formaldehído y diatíl sulfato, quedando demostrado el poder mutagénico de estas sustancias.

Los mutagénicos químicos más probados son los agentes alcalinos, que son reactivos orgánicos capaces de transferir su grupo alcalino a otro compuesto. El agente mutagénico más promisor es el metanosulfonato de etilo (EMS) (41), descubierto por Kølmark (32) como agente mutagénico en trabajos con Neurospora y probado luego por diferentes investigadores en bacterias, Drosophila, cebada, maíz, trigo, tabaco, haba y otros cultivos. Estos trabajos pusieron de manifiesto que el EMS es un mutagénico sumamente poderoso y que su acción se debe al grupo etilo, que debido a su habilidad alcalina, elimina el nitrógeno de la guanina, determinando un cambio en la secuencia de las bases (3, 14, 25, 40).

La velocidad con que la sustancia penetra en las semillas y no la velocidad de la hidrólisis influye en la frecuencia y en la amplitud del espectro mutacional (19).

En experimentos con trigo, aplicando EMS durante 6 horas a diferentes concentraciones, se produjeron deficiencias clorofílicas, necrosis, y crecimientos anormales (35). En Arabidopsis thaliana, las semillas embebidas con agua por 6 horas antes del tratamiento con EMS, dieron una mayor frecuencia de mutaciones, consistiendo la mayoría de ellas en hojas cloróticas, hojas pequeñas y esterilidad (20). En cebada (33), aplicando EMS a diferentes estados de germinación de las semillas, se encontró mayor sensibilidad de las semillas 16 a 28 horas después de iniciada la germinación.

En experimentos con maíz, Smith (39) encontró evidencias de que el EMS puede producir mutaciones puntuales (point mutation), es decir, cambios en los aminoácidos que constituyen un gen.

#### 2.4 Efectos mutagénicos comparativos entre el EMS y los rayos gamma

Ehrenberg, Gustafsson y Lundquist (9) compararon los efectos de diferentes tipos de radiaciones y mutagénicos químicos, entre los que incluían rayos gamma y EMS a diferentes dosis, encontrando que el agente mutagénico más potente era el EMS. Este resultado se ha confirmado repetidas veces, por lo que se cree que en un futuro próximo en la inducción de mutaciones las radiaciones ionizantes serán sustituidas por sustancias químicas tales como el EMS.

Se informó que en maíz, el EMS indujo tres veces más mutaciones que los rayos X (1, 4), y en guisantes se encontró siete veces más mutaciones cloróticas y cinco veces más mutaciones morfológicas que con rayos X (38). Respecto a las mutaciones cloróticas, los rayos gamma producen más mutantes albinos y el EMS, mayor número de mutantes que varían en diferentes tonos de verde. Además, el EMS produce menos esterilidad,

con cerca de un 30 por ciento de mutantes viables, mientras que con rayos X la esterilidad es mayor con 5-9 por ciento de mutantes viables (42).

Posteriormente, se ha señalado la conveniencia de utilizar concentraciones bajas de EMS con permanencia prolongada de las semillas de frijol en la solución. La mayor frecuencia de mutaciones se obtuvo con una solución de 0,08 M de EMS durante 6 horas, lo que produjo 50-60 por ciento de mutaciones, siendo la relación entre mutaciones cloróticas y morfológicas de 1:1 (24).

## 2.5 Herencia del color de los tegumentos seminales del frijol

La base genética del color de las semillas de frijol ha sido estudiada extensamente por muchos investigadores. Existe mucha diversidad en el color de los tegumentos seminales, incluyendo los colores negro, rojo, bayo, blanco y sus diferentes matices.

De acuerdo con su modo de acción los genes que determinan el color del grano de frijol, pueden agruparse en tres categorías: a) el factor básico P de pigmentación, el cual no produce por sí mismo ningún color; b) los genes de colores complementarios, que expresan su color cuando el factor P está presente; c) los factores o genes modificadores, que no producen color con el factor básico pero influyen en los colores producidos por los genes complementarios (43).

El color de los tegumentos de las semillas está relacionado con el color del hipocótilo y de las flores. El hipocótilo puede ser verde, rosado o rojo (26, 27). Las semillas blancas tienen hipocótilo verde y flores blancas (23, 36); las semillas de color bayo tienen hipocótilo verde o rojo y flores blancas o lilas; y las semillas negras tienen

hipocótilo de cualquier color y flores violetas o lilas\*.

Esta correlación de semilla blanca e hipocótilo verde es una gran ayuda para identificar, en un estado temprano, los mutantes de distinto color de semilla.

En experimentos llevados a cabo con frijol de la variedad 'S-182-N' de color negro, Moh (23) en 1969, encontró mutaciones de color blanco y bayo inducidas por EMS.

---

\* Comunicación personal: C. C. Moh y J. J. Alán, IICA, Turrialba, Costa Rica, 1970.

### 3. MATERIALES Y METODOS

Los agentes mutagénicos utilizados en este experimento fueron: radiación gamma proveniente de una fuente de  $^{60}\text{Co}$  instalada en un irradiador tipo piscina y metanosulfonato de etilo (EMS),  $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{C}_2\text{H}_5$ .

Las variedades de frijol fueron: 'Turrialba-1' y 'Porrillo', ambas de hipocótilo rojo y episperma negro, las cuales fueron autopolinizadas por dos o más generaciones. Estas variedades fueron propagadas en invernáculos y las semillas cosechadas se pusieron en una estufa a  $34^\circ\text{C}$  a fin de estabilizar su contenido de humedad.

Mediante el secado en la estufa se determinó la humedad de las semillas, obteniéndose: 'Turrialba-1', 8,9 por ciento de humedad y 'Porrillo', 12,7 por ciento de humedad.

Se determinó la dosis letal media ( $\text{LD}_{50}$ ) para cada variedad con cada agente mutagénico. Para ésto, se trataron grupos de 100 semillas 24 horas después de iniciada la germinación, la cual se había llevado a cabo a una temperatura constante de  $20^\circ\text{C}$ , con dosis de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 Kr de radiación gamma y 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06 M de EMS. La  $\text{LD}_{50}$  para radiación gamma fue de 3 Kr y para EMS fue de 0,04 M.

Antes de tratar las semillas con los agentes mutagénicos se les puso en agua por períodos de 0, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas. Las semillas testigo ( $T_1$ ) para la aplicación de los agentes mutagénicos estuvieron en agua por 12 horas y el testigo ( $T_2$ ) para comparar con los diversos estados de germinación de las semillas antes de la aplicación de los agentes mutagénicos, recibió la aplicación de éstos en estado de latencia. Para cada tratamiento se utilizaron 200 semillas. En los tratamientos con EMS, las semillas permanecieron en la solución por 6 horas, durante las cuales se les agitó continuamente lavándose luego repetidas veces con agua destilada.



Posteriormente se sembró en los invernáculos una semilla por maceta. La cosecha se realizó planta por planta y las semillas de cada planta se sembraron en el invernáculo, poniendo todas las semillas de una misma planta en una misma hilera en los cajones que sirvieron como semilleros. Cuando las plántulas tenían dos semanas de edad, se observaron los distintos tipos de mutaciones que se habían producido y se anotó su frecuencia. Las plántulas con hipocótilo verde se trasplantaron separadamente para estudiar el color de las semillas resultantes.

Las mutaciones que aparecieron como resultado de los tratamientos se clasificaron en dos categorías: cloróticas y morfológicas. Los mutantes cloróticos implican un cambio en el color de las hojas, que puede variar entre albino, amarillo, verde claro y verde oscuro. Los mutantes morfológicos son los que cambian en la forma o en el tamaño de las hojas o plantas, hábito de crecimiento y color del hipocótilo o de los cotiledones.

Se calculó la frecuencia de mutaciones con respecto a variedades, agentes mutagénicos y pretratamientos con agua para encontrar las combinaciones recomendables para inducir los cambios de color en los tegumentos seminales del frijol.

Se utilizó la prueba de partición ortogonal de los componentes de variación por chi-cuadrado, para comparar los diferentes efectos.

#### 4. RESULTADOS

##### 4.1 Frecuencia de mutaciones

En el Cuadro 1 se presenta la frecuencia de mutaciones inducida por EMS y por radiación gamma en los diferentes estados de germinación de la semilla, y la frecuencia de mutaciones morfológicas y cloróticas en las variedades de frijol 'Turrialba-1' y 'Porrillo'.

Según la prueba de partición ortogonal de los componentes de variación por chi-cuadrado, Cuadro 2, no existen diferencias en la frecuencia de mutaciones totales entre las variedades 'Porrillo' y 'Turrialba-1'. La frecuencia de mutaciones cloróticas y morfológicas tampoco mostraron diferencias significantes entre las dos variedades.

Los agentes mutagénicos, EMS y radiación gamma, si presentaron diferencias en la frecuencia de mutaciones producidas. Lo mismo ocurre con la frecuencia de mutaciones morfológicas y cloróticas. En estos casos la frecuencia de mutaciones inducida por EMS fue tres veces mayor que la inducida por radiación gamma.

La frecuencia de mutaciones morfológicas y cloróticas se encuentran aproximadamente en una proporción igual en las dos variedades y con cualquiera de los agentes mutagénicos utilizados.

La partición ortogonal de los componentes de variancia por chi-cuadrado no muestra significación en las interacciones entre los agentes mutagénicos y las dos variedades de frijol, lo que quiere decir que el efecto del EMS y la radiación gamma no depende de ninguna de las variedades de frijol utilizado en este experimento.

El análisis estadístico indica diferencias bastante altas entre el testigo ( $T_1$ ) sin aplicación de los agentes mutagénicos y los tratamien-

Cuadro 1. Frecuencia de mutaciones inducidas por EMS y radiación gamma en diferentes estados de germinación en dos variedades de frijol.

Tiempo de germinación (horas)	EMS 0,04 M 6 hrs.						Radiaciones gamma 3 Kr									
	Mutaciones observadas en M2			Mutaciones observadas en M2			semillas tratadas M1 cosechadas			semillas tratadas M1 cosechadas			Total			
	No.	%	No. %	No.	%	No. %	No.	%	No. %	No.	%	No.	%	No.	%	
	V a r i e d a d T u r r i a l b a - 1															
T1	200	0	0,0	0	0,0	0	0,0	200	168	3	1,7	0	0,0	3	1,7	
T2	200	7	4,6	9	5,9	16	10,5	200	164	6	3,7	4	2,4	10	6,1	
12	200	22	13,4	22	13,4	44	26,8	200	161	6	3,7	9	5,6	15	9,3	
24	200	15	12,3	31	25,6	46	38,0	200	139	14	10,0	8	5,8	22	15,8	
36	200	13	18,8	12	17,4	25	36,2	200	120	4	3,3	2	1,7	6	5,0	
48	200	15	23,8	13	20,6	28	44,4	200	108	2	1,8	4	3,7	6	5,5	
60	200	21	25,6	27	32,9	48	58,5	200	68	7	10,3	4	5,9	11	16,2	
72	200	15	15,3	26	27,4	41	43,2	200	14	3	21,4	0	0,0	3	21,4	
Total	1600	922	108	11,7	140	15,2	248	26,9	1600	928	45	4,8	31	3,3	76	8,2
	V a r i e d a d P o r r i l l o															
T1	200	0	0,0	0	0,0	0	0,0	200	154	0	0,0	1	0,6	1	0,6	
T2	200	7	3,9	14	7,8	21	11,7	200	161	2	1,2	6	3,7	8	5,0	
12	200	1	0,6	16	9,6	17	10,2	200	144	3	2,0	3	2,0	6	4,2	
24	200	33	19,0	25	14,4	58	33,3	200	114	9	7,9	5	4,3	14	12,3	
36	200	40	23,1	28	16,2	68	39,3	200	60	5	8,3	2	3,3	7	11,7	
48	200	25	16,1	21	13,5	46	29,7	200	67	3	4,5	0	0,0	3	4,5	
60	200	22	14,1	8	5,1	30	19,2	200	59	2	3,4	5	8,5	7	11,8	
72	200	31	18,3	27	16,0	58	34,3	200	61	1	1,6	1	1,6	2	3,3	
Total	1600	1354	159	11,7	139	10,3	298	22,0	1600	820	25	3,0	23	2,8	48	5,8

T1 = semillas a las 12 horas de germinación y sin aplicación de agentes mutagénicos

T2 = semillas en estado de latencia y con aplicación de agentes mutagénicos.

Cuadro 3. Prueba de partición ortogonal de los componentes de variancia por chi-cuadrado en la frecuencia de mutaciones.

Fuentes de variación	GL	$\chi^2$
Turrialba-1 vs Porrillo	1	1,04 NS
EMS vs Radiación gamma	1	151,10 **
Interacción	1	0,25 NS
Testigo vs Tratamientos	1	121,87 **
Tendencia lineal	1	8,59 **
Tendencia cuadrática	1	25,70 **
Otros	25	58,81
Total	31	367,36

Contrastes		Cloróticas Morfológicas	
Turrialba-1 vs Porrillo	1	0,04 NS	3,57 NS
EMS vs Radiación gamma	1	65,72 **	93,97 **
Interacción	1	1,80 NS	4,00 NS
Total	3	67,56	101,54

NS = no significativa; \*\* = significativa al 1%.

tos con aplicación de agentes mutagénicos, lo que indica que hubo respuesta a la aplicación de éstos.

El análisis estadístico expresa que el testigo ( $T_2$ ) de semillas antes del inicio de la germinación y los diferentes estados de germinación de éstas no difieren en su respuesta a los otros tratamientos.

La frecuencia de mutaciones, cuando la aplicación de los agentes mutagénicos se hizo en diferentes estados de germinación de las semillas de frijol, tiene una tendencia cuadrática. Esto indica que los tratamientos de aplicación de los agentes mutagénicos a diferentes estados de germinación de las semillas sigue una tendencia curva, la cual asciende conforme aumenta el estado de germinación de las semillas, primero bruscamente y luego más lentamente hasta llegar a un punto donde se estabiliza o decrece.

La frecuencia de mutaciones asciende bruscamente hasta las 24 horas posteriores a la germinación, luego aumenta paulatinamente y en forma irregular, hasta estabilizarse más o menos a las 72 horas de iniciada la germinación.

Esta tendencia ocurre más o menos regularmente para las dos variedades y los dos agentes mutagénicos.

#### 4.2 Tamaño de las quimeras

Inicialmente, una mutación es inducida en una sola célula meristemática de la yema apical. Si la célula mutante es extremadamente deletérea, esta célula no puede crecer normalmente para competir con las células normales y tarde o temprano la célula mutada será eliminada y no tendrá oportunidad de expresar su carácter mutado. Si al crecer la célula mutada puede competir con la célula normal, se formará una sección mutada o quimera.

El tamaño de la quimera puede usarse como un índice para determinar si la célula mutada puede o no crecer competitivamente con la célula normal durante el desarrollo de la planta. El tamaño de la quimera en el presente experimento puede ser expresado como el porcentaje de mutantes segregados por una planta  $M_1$ .

En el Cuadro 3 aparecen los datos que muestran el tamaño de las quimeras inducidas por EMS y por radiación gamma en diferentes estados de germinación de las semillas y su diferenciación en cloróticas y morfológicas en las variedades 'Turrialba-1' y 'Porrillo'.

No se encontro diferencias en el tamaño de las quimeras entre las dos variedades utilizadas. El tamaño de las quimeras morfológicas y cloróticas producidas por las dos variedades tampoco mostraron diferencias entre sí.

Se encontraron diferencias en el tamaño de las quimeras producidas por EMS y radiación gamma en la variedad 'Turrialba-1', pero no en la variedad 'Porrillo'. El mismo resultado se encontró con el tamaño de quimeras morfológicas y cloróticas producidas por los agentes mutagénicos. El EMS mostró una inducción mayor de quimeras que la radiación gamma en la variedad 'Turrialba-1' pero en la variedad 'Porrillo' el número de quimeras inducidas por EMS y radiación gamma fue más o menos igual en porcentaje, no así en el número de plantas estudiadas en la primera generación, que fue muy pequeña en la variedad 'Porrillo' en el tratamiento con radiaciones gamma.

Cuadro 3. Tamaño de quimeras inducidas por EMS y radiación gamma en diferentes estados de germinación de semillas en dos variedades de frijol

Tiempo de germinación (horas)	Mutantes en M <sub>2</sub>											
	EMS 0,04 M 6 hrs.				Radiaciones gamma 3 Kr							
	Cloróticas No.*	%	Morfológicas No.*	%	Total No.*	%	Cloróticas No.*	%	Morfológicas No.*	%	Total No.*	%
	V a r i e d a d T u r r i a l b a - 1											
T <sub>1</sub>	0/0	0,0	0/0	0,0	0/0	0,0	9/92	9,8	0/0	0,0	9/92	9,8
T <sub>2</sub>	14/274	5,1	21/208	10,1	35/482	7,3	7/192	3,6	6/103	5,8	13/295	4,4
12	54/797	6,8	60/433	9,2	114/1230	8,1	13/211	6,2	26/388	6,7	39/599	6,5
24	83/517	16,0	48/387	12,4	131/904	14,2	21/440	4,8	28/196	14,3	49/636	7,7
36	58/466	12,4	46/367	12,5	104/833	12,8	8/65	12,3	2/9	22,2	10/74	13,5
48	70/539	11,3	62/331	18,7	132/870	15,1	6/53	11,3	4/84	3,1	10/137	8,4
60	99/759	13,0	62/757	8,2	161/1516	10,6	16/190	8,4	6/63	9,5	22/253	8,7
72	76/433	17,6	69/454	15,2	145/887	16,5	24/73	32,9	0/0	0,0	24/73	32,3
Total	454/3785	11,7	368/2937	11,6	822/6722	12,0	104/1316	7,9	72/843	8,5	176/2159	8,5
	V a r i e d a d P e r r i l l o											
T <sub>1</sub>	0/0	0,0	0/0	0,0	0/0	0,0	0/0	0,0	2/16	12,5	2/16	12,5
T <sub>2</sub>	34/443	7,7	57/443	12,9	91/886	8,3	4/47	8,5	13/117	11,1	17/164	10,4
12	2/31	6,5	59/608	9,7	61/639	9,5	4/49	6,2	7/14	5,0	11/63	20,8
24	129/1494	8,6	91/1054	8,6	220/2548	8,6	21/191	11,0	13/99	13,1	34/290	11,8
36	120/1146	11,0	112/740	15,1	232/1886	12,2	9/76	11,8	2/16	12,5	11/92	12,1
48	61/582	14,8	51/283	18,0	112/865	12,3	5/35	14,3	0/0	0,0	3/35	14,3
60	89/664	13,8	22/184	11,9	111/828	12,8	4/31	12,9	12/118	10,2	16/149	10,7
72	88/638	13,8	71/411	17,3	159/1049	19,2	2/32	6,3	2/7	28,6	4/39	10,3
Total	523/4978	11,0	463/3723	12,4	986/3701	11,5	49/461	10,8	51/388	13,8	100/849	12,0

\* Proporción de mutantes segregados en una planta M<sub>1</sub>.  
T<sub>1</sub> Semillas a las 12 horas de germinación y sin aplicación de agentes mutagénicos.  
T<sub>2</sub> Semillas en estado de latencia y con aplicación de agentes mutagénicos.

#### 4.3 Selección de los mutantes en la coloración del episperma

En el Cuadro 4 se indican los mutantes con cambios en la coloración del episperma de las semillas de frijol.

El tamaño de la planta mutante, la forma, color y tamaño de las hojas de los mutantes son prácticamente idénticas a los de sus progenitores y a las plantas testigo. La mayor diferencia morfológica del mutante es su hipocótilo verde y las flores blancas, así como el cambio de color del episperma de la semilla.

Las mutaciones con hipocótilo verde en la variedad 'Turrialba-1' fueron 16 (6,4 por ciento del total de mutaciones), de los cuales 8 estuvieron asociados con cambios del color de los tegumentos seminales. En la variedad 'Porrillo' se encontraron 12 mutaciones con hipocótilo verde (4,0 por ciento del total de mutaciones) y de éstas, 5 mostraron cambios de color del episperma.

Todos los mutantes cambiaron el color de sus flores de violeta a blanco.

En la variedad 'Turrialba-1' se encontró un mutante de color de semilla blanca y 7 mutantes de color bayo, y en la variedad 'Porrillo' los 5 mutantes de color de semilla fueron de color bayo.

Los mutantes bayos variaban en la tonalidad del color que iba de marrón oscuro a amarillo claro. La mayoría de los mutantes bayos fueron de color marrón oscuro.

Con radiaciones gamma no se encontró ningún mutante de hipocótilo verde en ninguna de las dos variedades, probablemente debido al menor porcentaje total de la frecuencia de mutación encontrada.



Cuadro 4. Mutaciones de cambio de color del episperma de las semillas seleccionadas de tratamientos con EMS\* en dos variedades de frijol

Tiempo de germinación (horas)	Total mutaciones	Número de mutaciones con hipocótilo verde		Mutaciones de cambio de color de semilla			
		No.	%	Blanco	Bayo	Total	
						No.	%
V a r i e d a d T u r r i a l b a - 1							
T <sub>1</sub>	0	0	0,0				
T <sub>2</sub>	16	0	0,0				
12	44	5	11,3		1	1	2,3
24	46	2	4,3		1	1	2,2
36	25	1	4,0	1		1	4,0
48	28	1	3,5				
60	48	2	4,1		1	1	2,1
72	41	5	12,1		4	4	9,7
Total	248	16	6,4	1	7	8	3,2
V a r i e d a d P o r r i l l o							
T <sub>1</sub>	0	0	0,0				
T <sub>2</sub>	21	2	9,5		1	1	4,7
12	17	-	-				
24	58	1	1,7				
36	68	1	1,4		1	1	1,4
48	46	2	4,3				
60	30	1	3,3		1	1	3,3
72	58	5	8,6		2	2	3,4
Total	298	12	4,0		5	5	1,6

\* EMS 0,04 M 6 horas

- T<sub>1</sub> Semillas a las 12 horas de germinación y sin aplicación de agentes mutagénicos.
- T<sub>2</sub> Semillas en estado de latencia y con aplicación de agentes mutagénicos.

## 5. DISCUSION

### 5.1 Frecuencia de mutaciones

Por la similitud de sus frecuencias de mutaciones tanto cloróticas como morfológicas, las variedades 'Turrialba-1' y 'Porrillo' aparentemente no difieren en su contenido genético en lo que respecta a las características tomadas en cuenta en este estudio.

La mayor frecuencia de mutaciones inducidas por EMS con relación a la radiación gamma podría deberse: 1) el EMS por acción alcalinizante puede inducir más mutaciones al actuar sobre los componentes genéticos de las células, 2) el EMS puede inducir un menor o igual número de mutaciones en la célula, pero éstas tienen un mayor rango de supervivencia.

En cereales (monocotiledóneas), Stadler (39) estudió las mutaciones al estado de plántula, encontrando que el 90 por ciento de las mutaciones inducidas fue del tipo de deficiencias cloróticas, notándose difícilmente los cambios morfológicos en el tamaño de las hojas y en el hábito de crecimiento de las plantas.

En el frijol (dicotiledóneas), al contrario, los cambios morfológicos pudieron fácilmente identificarse en este estudio, permitiendo detectar la relación de 1:1 de mutaciones morfológicas y cloróticas. Este resultado concuerda con experimentos realizados anteriormente en frijol (24).

La tendencia cuadrática de los efectos de los agentes mutagénicos con relación al proceso de germinación de las semillas, se debió al aumento de la cantidad de agua del tejido. El alto contenido de agua de los tejidos celulares determina que se encuentren más daños y mayor

cantidad de aberraciones cromosómicas y de mutaciones en las plantas (7, 30, 29). En algunos casos la frecuencia de mutaciones inducidas puede ser 6 a 8 veces mayor que en el estado de latencia (9).

La frecuencia de mutaciones también puede ser afectada por el desarrollo celular (29). Investigaciones en la mitosis de los meristemas apicales del frijol mostraron que las configuraciones mitóticas pueden observarse 36 horas después de terminado el estado de latencia (22). Según Savin et al. (33), la síntesis de DNA en las células tiene lugar antes de ese tiempo y es sensible a los tratamientos con EMS.

## 5.2 Tamaño de quimeras.

La poca diferencia que se observó entre 'Turrialba-1' y 'Porri- llo' en el tamaño de quimeras parece respaldar la suposición de que esas dos variedades no difieren en su contenido genético en las caracterís- ticas estudiadas.

En la variedad 'Turrialba-1' la pequeña discrepancia entre el tamaño de las quimeras inducidas por el EMS comparadas con la radiación gamma, puede indicar que la radiación gamma tiene un efecto más drástico en el crecimiento de las células mutadas que el EMS.

## 5.3 Selección de los mutantes de la coloración del episperma

Aunque la relación entre hipocótilo verde y episperma diferente al negro (23) no es perfecta puesto que el hipocótilo verde no siempre da como resultado episperma diferente al negro, es una gran ayuda para encontrar y seleccionar los mutantes de color de semilla.

El cambio de color de las semillas de negro a blanco se puede deber: a) ausencia del gen básico (primario) P de pigmentación, con o sin la presencia de los genes complementarios y b) presencia del gen P y pérdida de los genes complementarios (23). Entre estas posibilidades, la que tiene mayor probabilidad de ocurrir fue la primera, porque es menos probable que en forma simultánea todos los genes complementarios cambien a su forma recesiva.

El cambio de color de las semillas de negro a bayo, obviamente se debió a la ausencia de ciertos genes complementarios, pero siempre con la presencia del gen P.

Los genes modificadores determinan las diferentes tonalidades de las semillas de color bayo. Se puede suponer que la mayor frecuencia de mutantes bayos de color oscuro se debió a la presencia de un gran número de genes modificadores en su forma dominante.

Según Yarnell (43) la forma dominante de cualquier gen de los grupos 'modificador' o 'complementario' cuando no está acompañada por otro gen dominante de uno u otro de esos grupos produce poco o ningún color en presencia del gen básico.

## 6. CONCLUSIONES

Basándose en los resultados obtenidos en esta investigación se puede formular las siguientes conclusiones:

1. El EMS es un agente mutagénico más eficiente que la radiación gamma, puesto que induce una mayor frecuencia de mutaciones.
2. El efecto de los agentes mutagénicos a los diferentes estados de germinación de las semillas se incrementa rápidamente a medida que progresa el estado de germinación de la semilla hasta las 24 horas y después comienza a nivelarse paulatinamente.
3. El tamaño de las quimeras inducidas por EMS es mayor que el tamaño de quimeras inducidas por radiación gamma.
4. En los casos en que se desee cambiar el color del episperma de una variedad, es útil inducir estos cambios con EMS porque en esta forma el tiempo y trabajo necesario es menor que en el caso de la aplicación de métodos convencionales de mejoramiento tales como los cruzamientos.
5. Para inducir mutaciones el EMS es preferible a las radiaciones ionizantes por la mayor frecuencia de mutaciones que induce, la mayor facilidad de su manejo, su menor costo y su menor necesidad de equipo especial.

## 7. RESUMEN

El presente experimento se realizó en frijol (Phaseolus vulgaris L.) con las variedades 'Turrialba-1' y 'Porrillo', estudiándose la frecuencia de mutaciones inducidas por radiaciones gamma y metanosulfonato de etilo (EMS) en diferentes estados de germinación de las semillas, y la selección de los mutantes que mostraron cambios de color del episperma. La dosis de radiación fue de 3 Kr y la de EMS de 0,04 M con 6 horas de permanencia de las semillas en la solución.

En la segunda generación ( $M_2$ ) cuando las plántulas tenían dos semanas de edad, se hicieron observaciones sobre los distintos tipos de mutaciones que se habían producido y su frecuencia. Las plántulas con hipocótilo verde se transplantaron separadamente para estudiar el color de las semillas que producirían.

Entre los agentes mutagénicos utilizados, la frecuencia de mutaciones inducidas por EMS fue tres veces mayor que la inducida por rayos gamma. La relación entre el número de mutaciones morfológicas y cloróticas fue aproximadamente de 1:1.

La frecuencia de mutaciones en relación con la aplicación de los agentes mutagénicos, en los diferentes estados de germinación de las semillas de frijol se incrementó aparentemente hasta las 24 horas de iniciada la germinación y luego el efecto comienza a nivelarse o se torna errática principalmente con radiaciones gamma.

El tamaño de las quimeras inducidas por EMS tiende a ser más grande que las inducidas por radiaciones gamma.

Se seleccionaron 13 mutantes de cambios de color del episperma; 12 de ellos fueron de color bayo y 1 blanco. Todos estos mutantes fueron inducidos por EMS y ninguno por radiación gamma.

El EMS, además de inducir una mayor frecuencia de mutaciones que las radiaciones gamma, tienen una mayor facilidad de manejo, es más barato, más fácil de transportar y no requiere equipo especial para el trabajo. Todas estas propiedades lo hacen preferible, principalmente para países que carecen de condiciones tecnológicas y económicas suficientemente desarrolladas para procurarse una fuente de radiaciones.

### 7a. SUMMARY

Experiments were carried out on two bean varieties, Turrialba-1 and Porrillo, to study the mutation frequency induced by ethyl methane-sulfonate (EMS) and gamma radiation at different periods of seed germination. The treatment of EMS was 0.04 M aqueous solution for 6 hours and the treatment of gamma radiation was 3 Kr. The mutation frequency was determined in the selfed progeny test of the second generation at the two week old seedling stage.

Among the mutagenic agents used, the mutation frequency induced by EMS was three times higher than that induced by gamma radiation.

The mutation frequency increased with the seed germination period up to 24 hours. After this period, the frequency began to level off.

The size of chimaera in the  $M_1$  plants induced by EMS tends to be larger than that induced by gamma radiation.

Thirteen mutants with seed-coat color changes, 12 bayo and 1 white, were isolated from the EMS mutation experiments. These mutants may have an agronomic value since people in an area consume certain colors of beans.

Beside the potency of its mutagenic action, EMS is relatively a low-cost chemical, and easier to handle than radiation facilities. For inducing mutations, it is advisable to use EMS especially in those countries which lack sufficient economic and technological conditions to install a radiation facility.



7. LITERATURA CITADA

1. AMANO, E. Comparison of ethyl methanesulfonate and radiation induced waxy mutants in maize. *Mutation Research* 5(1): 41-46. 1968.
2. AUERBACH, C. y ROBSON, J. M. Chemical production of mutations. *Nature* 157(3984):302. 1946.
3. BAUTZ, E. y FREESE, E. On the mutagenic effect of alkylating agents. *Proceedings of the National Academy of Science* 46(12):1585-1594. 1960.
4. BRIGGS, R. W., AMANO, E. y SMITH, H. A. Genetic recombination with ethyl methanesulfonate induced waxy mutants in maize. *Nature* 207(1):890-981. 1966.
5. BROERTJES, C. Progress in mutation breeding. *Euratom Bulletin* no. 2:45-51. 1967.
6. CHATTERJEE, N. K., GASPAR, A. L. y SINGLETON, W. R. Genetic effects of ethyl methanesulfonate and gamma ray treatment of proembryo in maize. *Genetics* 51(12):1101-1111. 1965.
7. EHRENBERG, L. Induced mutations in plants mechanisms and principles. *Genética Agraria* 12:369-389. 1959.
8. \_\_\_\_\_ et al. Irradiation effects on seed soaking and oxygen pressure in barley. *Hereditas* 39(4):493-504. 1953.
9. \_\_\_\_\_, GUSTAFSSON, A. y LUNDQUIST, U. Viable mutants induced in barley by ionizing radiations and chemical mutagens. *Hereditas* 47(20):243-282. 1961.
10. GAUL, H. y AASTVEIT, K. Induced variability of culm length in different genotypes of hexaploid wheat following X-irradiation and EMS-treatment. *In Yugoslav Symposium on Research in Wheat*, 5th, 1966. s.n.t. pp. 263-276.
11. GENTER, C. E. y BROWN, H. M. X-ray studies on the field bean. *Journal of Heredity* 32(1):39-44. 1941.
12. GRANADOS, E. Efecto de las irradiaciones gamma en el frijol común (*Phaseolus vulgaris*). Tesis Ing. Agr. San Salvador, Universidad de El Salvador, 1966. 67 p. (mimeo)
13. GUSTAFFSON, Å. The induction of mutations as a method in plant breeding. *In Errera, M. y Forssberg, A., eds. Mechanisms in radiobiology*. New York, Academic Press, 1961. v. 1, pp. 477-497.

14. HESLOT, H. The nature of mutations. In FAO. The use of induced mutations in plant breeding. New York, Pergamon Press, 1964. pp. 3-45.
15. JEAN, Y. Production artificielle des mutations par irradiations. Bonne Terre 22:171-186. 1941.
16. JOSHY, S. N. Genetic variability in oats for recurrent and alternate treatment with physical and chemical mutagens. Radiation Botany 7(6):513-520. 1967.
17. KHOVOSTOVA, V. V. et al. Mutants induced by ionizing radiations and ethyleneimina in winter wheat. Mutation Research 2(3): 339-344. 1965.
18. KONZAK, C. The effects of ionizing radiation on plants. III. Genetic effects of radiation on higher plants. Quarterly Review of Biology 32(1):27-45. 1957.
19. \_\_\_\_\_ et al. Efficient chemical mutagenesis. In FAO. The use of induced mutations in plant breeding. New York, Pergamon Press, 1964. pp. 49-70.
20. MCKELVIE, A. D. Studies in the induction of mutations in Arabi-  
diopsis thaliana. Radiation Botany 3(2):105-123. 1963.
21. MOH, C. C. Efecto de radiaciones ionizantes en las plantas superiores. IICA. Boletín Técnico no. 3. 1958. 22 p.
22. \_\_\_\_\_. The effect of low temperature on mitosis in meristematic cells of the shoot apex of beans. Caryologia 19(4):413-418. 1966.
23. \_\_\_\_\_. Seed coat color changes induced by ethyl methanesulfonate in the common bean (Phaseolus vulgaris L.). Mutation Research 7(4):469-471. 1969.
24. \_\_\_\_\_ y NANNÉ, H. Radiation botany and plant genetics. In Inter-American Institute of Agricultural Sciences. The Application of Nuclear Energy to Agriculture. Turrialba, 1968. pp. 3-25.
25. MOUTSCHEN-DAHMAN, J. y MOUTSCHEN-DAHMAN, M. Deux applications des radioisotopes en mutagenese. Neederdelingen van de Lanbouwtroegesschool en de Opzoekinstations van de Stoat te Gent (Belgica) 30(2):977-989. 1965.
26. NAKAYAMA, R. Genetical studies on kidney beans (Phaseolus vulgaris). II. On the inheritance of hypocotyl color. Bulletin of the Faculty of Agriculture, Hirosaki University 1(4): 30-87. 1958.

27. NAKAYAMA, R. Genetical studies on kidney beans (Phaseolus vulgaris). IV. On the inheritance of hypocotyl color. Bulletin of the Faculty of Agriculture, Hirosaki University 2(5):6-13. 1959.
28. NEUFFER, M. G. y FICSOR, G. Mutagenic action of ethyl methanesulfonate in maize. Science 139(3561):1296-1297. 1963.
29. NILAN, R. A. Factors governing plant radiosensitivity. In A conference on radioactive isotopes in agriculture. Michigan State University. pp. 151-161. East Lansing, Michigan, 1956.
30. \_\_\_\_\_ et al. Effectiveness and efficiency of radiations for inducing genetic and cytogenetic changes. In FAO. The use of induced mutations in plant breeding. New York, Pergamon Press, 1964. pp. 71-89.
31. POMPEU, A. S. Sementes do feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.) irradiadas. In Seminario Pan-Americano de Sementes, 4o., Rio de Janeiro, 1963. Anais Rio de Janeiro, Gráfica Victori, 1963. p. 120.
32. PRAKKEN, R. Induced mutations. Euphytica 8(3):270-322. 1959.
33. SAVIN, V. N., SWAMINATHAN, M. S. y SHARMA, B. Enhancement of chemically-induced mutation frequency in barley through alteration in the duration of pre-soaking of seeds. Mutation Research 6(1):101-107. 1968.
34. SHAMA RAO, H. K. y SEARS, E. R. EMS-induced mutations in hexaploid wheat. Genetics 47(5):983-984. 1962.
35. \_\_\_\_\_ y SEARS, E. R. Chemical mutagenesis in Triticum aestivum. Mutation Research 1(2):387-399. 1964.
36. SHAW, S. K. y NORTON, J. B. The inheritance of seed coat color in garden beans. Massachusetts Agricultural Experiment Station. Bulletin no. 185. 1918. pp. 59-104.
37. SMITH, H. H. Radiation in the production of useful mutations. Botanical Review 24(1):1-24. 1958.
38. SPARROW, A. H., BINNIGTON, J. P. y POND, V. Bibliography on the effects of ionizing radiations on plants. 1896-1955. New York, Brookhaven National Laboratory Associated Universities, 1958. 222 p.
39. STADLER, L. J. Some genetic effects of rays in plants. Journal of Heredity 21(1):3-19. 1930.
40. STRAUSS, B. S. Specificity of the mutagenic action on the alkylating agents. Nature 191(4789):730-731. 1961.

41. SWAMINATHAN, M. S., CHOPRA, V. L. y BHASKARAN, S. Chromosome aberrations and the frequency and the spectrum of mutations induced by ethyl methanesulphonate in barley and wheat. Indian Journal of Genetics and Plant Breeding 22(3):192-207. 1962.
42. WELLENSIER, S. J. Comparison of the effects of EMS, neutrons, gamma and X-rays on peas. In FAO. The use of induced mutations in plant breeding. New York, Pergamon Press, 1964. pp. 227-235.
43. YARNELL, S. H. Cytogenetics of the vegetable crops. IV. Legumes (continued). Botanical Review 31(3):247-330. 1965.