

Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Ingeniería Agronómica



Determinación de la concentración óptima de Metano Sulfonato de Etilo en *Phaseolus vulgaris* L. cultivar DOR 364

Tesis para aspirar al título de Ingeniera Agrónoma

Diplomante: Aidelyn León García

Tutores: Dr. C. Raúl Collado López

M. Sc. Luis Emelio Rojas Jiménez

Santa Clara, 2016

# Pensamiento

---

*“En la tierra hace falta personas que trabajen más y critiquen menos, que construyan más y destruyan menos, que prometan menos y resuelvan más, que esperen recibir menos y dar más, que digan ahora y no mañana”.*

*Che*

# Dedicatoria

---

*Este trabajo está dedicado a la memoria de mis abuelas Edelfina y María Delia, quienes han sido mi ejemplo y mi mayor motivación.*

*A mis padres por haberme guiado con amor y dedicación a través de estos años.*

# Agradecimientos

---

*Al Dr.C. Raúl Collado López y al M.Sc. Luis Emelio Rojas Jiménez, por la paciencia y ayuda incondicional.*

*Al Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), por abrirme las puertas para la realización de la tesis, y a todos los investigadores por el apoyo y la ayuda brindada.*

*A Leonardo Rivero Quintana y a todos los trabajadores de la casa de cultivo que cuidaron de mi experimento.*

*Al M.Sc. Silvio Martínez Medina del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAF).*

*Al M.Sc. Carlos Alberto Pereira Marín, por su contribución en el análisis estadístico de esta investigación.*

*A todos mis compañeros de aula que estuvieron a mi lado durante los cinco años de mi carrera, brindándome el apoyo necesario.*

*Todos los profesores que durante estos cinco años han contribuido en mi formación como futura Ingeniera agrónoma.*

*A todos mis familiares, que no me dejaron desamparada durante estos cinco años:*

*A mi abuelo Rigoberto León, por todos los consejos que me brindó.*

*A mis hermanas Ailén y Ailed, por estar siempre a mi lado.*

*A mis tíos, Federico, Iracel, José Luis, Rey e Hilario y primos por su preocupación.*

*A mis suegros, a los abuelos de mi novio, a mi cuñada y a su esposo, por todo el apoyo brindado.*

*A mi novio Alvaro, que con paciencia, comprensión y amor me ha acompañado en todos los momentos difíciles de la vida.*

*A todas mis amistades por su preocupación mostrada en todo momento.*

*A Fidel, Raúl y a la Revolución Cubana.*

## Resumen

Con el objetivo de determinar la concentración óptima de metano sulfonato de etilo en *Phaseolus vulgaris* L. cultivar DOR 364 se realizó un estudio en las casas de cultivo del Instituto de Biotecnología de las Plantas entre diciembre de 2015 y abril de 2016. Para la inducción de mutaciones se trataron las semillas con diferentes concentraciones de metano sulfonato de etilo (20, 30, 40, 50, 60 mM), como control se emplearon semillas no expuestas al mutágeno. Las semillas fueron sembradas en bolsas de polietileno con 4 kg de sustrato. Se evaluaron variables involucradas en la germinación, el crecimiento, desarrollo foliar, morfología y fenología de las plantas; así como los componentes del rendimiento. El metano sulfonato de etilo influyó sobre las variables evaluadas en las distintas etapas del cultivo. Basados en la germinación, desarrollo y crecimiento de las plantas, la sobrevivencia, los componentes del rendimiento y la frecuencia de variaciones morfológicas y fenológicas, 30 mM de EMS es la concentración apropiada para establecer una población de mutantes en el cultivar de frijol DOR 364, donde hasta la fecha no se han informado estudios previos al respecto. Con esta concentración se pudo generar el mayor número de cambios morfológicos y fenológicos con alta eficiencia en una población pequeña.

## **Abstract**

With the objective of determining the optimum concentration of ethyl methane sulfonate in *Phaseolus vulgaris* L. DOR 364 cultivar. A study in the greenhouse at the Instituto de Biotecnología de las Plantas was done from December 2015 to April 2016. For mutation induction, seeds were treated with different ethyl methane sulfonate concentrations (20, 30, 40, 50, 60 mM), as control not treated with mutagen seeds were used. Seeds were sown into polyethylene bag containing 4 kg of substratum. Variables involved in germination, growing, leaf development, morphology and phenology of the plants, as well as, yield components were evaluated. The ethyl methane sulfonate influenced on evaluated variables at distinct crop stage. Base on germination, plant growth, overall survival, yield's components, and morphological and phenological variations rate, 30 mM of ethyl methane sulfonate is the appropriated concentration to establish a mutant population at the common bean DOR 364 cultivar, where nowadays previous studies have not been informed regarding. With this concentration, major number of morphological and phenological changes was generated, with high efficiency in a small population.

## Índice

1. Introducción .....	1
2. Revisión bibliográfica .....	3
2.1 Origen, diversidad y distribución .....	3
2.2 Ubicación taxonómica del frijol común .....	4
2.3 Cultivo de frijol en Cuba .....	4
2.4 Métodos utilizados para la mejora genética .....	4
2.5 Mutagénesis concepto y caracterización .....	5
2.5.1 La mutagénesis en la mejora genética .....	5
2.5.2 Tipos de mutágenos .....	6
2.5.3 Agentes Mutagénicos .....	6
2.5.4 Niveles de Mutación .....	7
2.5.5 Mutagénesis química .....	7
2.5.6 Metano sulfonato de etilo .....	9
2.5.7 Medidas de seguridad empleadas al trabajar con el EMS .....	11
2.5.8 Métodos para inactivar el EMS .....	13
2.6 Variables evaluadas para la determinación de la concentración óptima de EMS ...	14
2.7 Características agronómicas del cultivar DOR 364 .....	14
3. Materiales y métodos .....	17
3.1 Efecto de diferentes concentraciones de EMS en la germinación de semillas .....	18
3.2 Efecto de diferentes concentraciones de EMS en el crecimiento y desarrollo de plantas de frijol .....	18
3.3 Caracterización morfológica y fenológica de plantas de frijol provenientes de semillas tratadas con diferentes concentraciones de EMS .....	19
3.4 Efecto de diferentes concentraciones de EMS en la floración de plantas de frijol ...	20
3.5 Efecto de diferentes concentraciones de EMS en la sobrevivencia total de plantas de frijol .....	20
3.6 Efecto de diferentes concentraciones de EMS sobre componentes del rendimiento en frijol .....	20
3.7 Procesamiento estadístico .....	21

4. Resultados y Discusión .....	22
4.1 Efecto de diferentes concentraciones de EMS en la germinación de semillas.....	22
4.2 Efecto de diferentes concentraciones de EMS en el crecimiento y desarrollo de plantas de frijol.....	24
4.3 Caracterización morfológica y fenológica de plantas de frijol provenientes de semillas tratadas con diferentes concentraciones de EMS .....	26
4.4 Efecto de diferentes concentraciones de EMS en la floración de plantas de frijol ...	30
4.5 Efecto de diferentes concentraciones de EMS en la sobrevivencia total de plantas de frijol.....	31
4.6 Efecto de diferentes concentraciones de EMS sobre componentes del rendimiento en frijol.....	33
5. Conclusiones .....	39
6. Recomendaciones.....	40



## 1. Introducción

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), es una especie diploide ( $2n = 2 \times 11 = 22$ ), de ciclo anual y predominantemente autógama (Bellucci *et al.*, 2010). Esta especie fue domesticada hace más de 7000 años. Se han identificado dos centros de origen: Mesoamérica (México y América Central) y la región Andina (Acosta-Gallegos *et al.*, 2007).

De acuerdo a estudios de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2005), el frijol es la leguminosa más importante para el consumo humano en el mundo. En América Latina, es un alimento tradicional e importante, especialmente en Brasil, México, América Central y el Caribe (SE, 2012). El frijol es consumido como semilla seca o como un vegetal, legumbres inmaduras (Broughton *et al.*, 2003). La composición nutricional de la semilla de frijol, lo coloca en un lugar preferencial. Estas son una fuente rica de proteínas, vitaminas y minerales, como el zinc y el hierro. Su aporte protéico es de 340 cal por cada 100 g de consumo. Sirve como complemento de otros alimentos como el maíz y el arroz que son cereales, fuente de carbohidratos (Ma y Bliss, 1978).

Su producción mundial en el 2013 fue de 23,1 millones de toneladas y su rendimiento  $1,7 \text{ t ha}^{-1}$  (FAO, 2014). La producción de frijol en Cuba en el 2015 fue de 117,6 miles de toneladas y su rendimiento de  $1,12 \text{ t ha}^{-1}$  (ONEI, 2016). Este cultivo en Cuba es afectado por varios factores abióticos que inciden negativamente en su rendimiento. Entre otros se destacan la poca disponibilidad de agua, altas temperaturas y salinidad de los suelos. Existen además factores bióticos como virus, hongos fitopatógenos, bacterias e insectos plagas que también comprometen su producción. Por ello, la obtención de cultivares mejoradas es un propósito fundamental de los programas de mejoramiento en esta importante leguminosa. El empleo de la mutagénesis inducida es una vía para la creación de cultivares con caracteres deseados, los mutágenos químicos como el metano sulfonato de etilo (EMS, por sus siglas en inglés), han jugado un

papel preponderante en este sentido. Sin embargo, el empleo de este mutágeno en *P. vulgaris* ha sido restringido a un escaso número de genotipos, por lo que se desconoce la concentración óptima para la inducción de mutaciones en cultivares de interés comercial. Para resolver esta problemática se plantea la hipótesis: la determinación de la concentración óptima de metano sulfonato de etilo permitirá establecer una población de mutantes de *Phaseolus vulgaris* L., cultivar DOR 364 que pueden ser utilizados en los programas de mejoramiento genético.

Para comprobar esta hipótesis se proponen los siguientes objetivos:

### **Objetivo general**

Determinar la concentración óptima de metano sulfonato de etilo en *Phaseolus vulgaris* L. cultivar DOR 364 para el establecimiento de una población de mutantes.

### **Objetivos específicos**

1. Determinar el efecto de las diferentes concentraciones de metano sulfonato de etilo en la germinación, crecimiento y desarrollo de las plantas de frijol.
2. Caracterizar la morfología y fenología de las plantas provenientes de las semillas tratadas con las diferentes concentraciones de metano sulfonato de etilo.
3. Determinar el efecto de las diferentes concentraciones de metano sulfonato de etilo en los componentes del rendimiento.

### 2. Revisión bibliográfica

#### 2.1 Origen, diversidad y distribución

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los cultivos más antiguos. Hallazgos arqueológicos indican que se conocía por lo menos 5000 años antes de la era cristiana. Se considera, que otras plantas americanas como maíz y calabaza no se conocían cuando el frijol estaba en el proceso de domesticación. El género *Phaseolus* agrupa a varias especies, de las que solo cinco (*Phaseolus acutifolius*, *Phaseolus coccineus*, *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus polianthus* y *P. vulgaris*) han sido domesticadas. Solo *P. vulgaris* ocupa más del 85 % de la superficie mundial dedicada este cultivo. Se trata de una especie originaria de la región mesoamericana (México, América Central) pero con un importante centro de dispersión en Perú, Ecuador y Bolivia *P. vulgaris* fue llevada de América a Europa por los españoles en el siglo XVI. Está muy distribuida en distintas partes del trópico, subtrópico y regiones templadas, siendo la legumbre más importante en Latino América y parte de África (Pinheiro *et al.*, 2007).

De acuerdo al proceso de domesticación múltiple e independiente que sufrió el cultivo del frijol, los patrones de consumo actuales en cuanto al tamaño y color del grano, varían entre los países de América Latina. Así, en México, Colombia, Ecuador, Perú, y Chile los de mayor demanda son los granos grandes, lo contrario sucede en los países Centroamericanos, Brasil y Venezuela que los prefieren pequeños. En cuanto al color del grano, Venezuela y Guatemala son los únicos países que consumen, casi exclusivamente, caraotas de grano negro, mientras que en otros países los prefieren de otros colores como: rojos (Colombia, Belice, Costa Rica, El Salvador, México, Panamá); crema (Chile, Colombia, México); blanco (Chile, México, Perú) y diversos colores como pardo, morado claro, amarillo en otros países (Mora, 1997).

### 2.2 Ubicación taxonómica del frijol común

Según Socorro y Martín (1989) la posición jerárquica de la familia de las leguminosas (también denominadas fabáceas) es la siguiente:

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Fabales*

Familia: *Fabaceae*

Subclase: *Rosidae*

Género: *Phaseolus*

Especie: *Phaseolus vulgaris* L.

### 2.3 Cultivo de frijol en Cuba

El frijol es la leguminosa más importante en la dieta diaria de los cubanos, por necesidades nutricionales y por estar al alcance de la mayoría. Su alto contenido en proteínas lo sitúa como un cultivo estratégico del país ya que permite apalear el déficit de proteínas en la dieta alimentaria, actualmente uno de los mayores problemas de los países en desarrollo (Quintero *et al.*, 2004).

Según la Oficina Nacional de Estadística e Información de la República de Cuba ONEI, (2016) la producción de frijol en el 2015 en Cuba fue de 117,6 Mt (miles de toneladas), la que decreció en un 13,2% respecto al 2014. En el 2015 se sembraron 104,5 miles de hectáreas de frijol. Creció en área cultivada con un 10,7% en el sector estatal y decreció 15,1% en el sector no estatal.

### 2.4 Métodos utilizados para la mejora genética.

El mejoramiento genético convencional para obtener cultivares de *Phaseolus vulgaris* .L que se adapten a las condiciones climáticas, tipos de suelos, salinidad, sequía, así como resistencia a las principales plagas y enfermedades, ha sido en extremo difícil debido al ligamiento genético, las barreras de hibridación sexual y el aborto en híbridos interespecíficos. Otra técnica empleada ha sido la transformación genética que permite la transferencia de genes entre organismos

genéticamente cercanos o distantes, ampliando considerablemente, la formación de nuevas combinaciones que por el método natural no ocurrirían. Esta metodología, además del alto costo económico, tiene un fuerte inconveniente desde el punto de vista social pues la percepción pública no la favorece, incluso se han creado fuertes organizaciones en contra de los organismos genéticamente modificados (Bonny, 2003). Un importante método de mejora genética lo constituyen las técnicas de mutaciones inducidas. A través de estas la variabilidad causada, es similar a las que ocurren espontáneamente durante la evolución y no se introduce material genético ajeno a la planta (Suaréz Crestelo, 2006).

### **2.5 Mutagénesis concepto y caracterización**

Se denomina mutagénesis a la producción intencionada de variabilidad genética a través de métodos físicos o químicos. La utilización de estos métodos provoca cambios al azar en el ADN, y en consecuencia, también en los genes y en el organismo. En plantas, la mutagénesis generalmente se aplica en las semillas, aunque en algunas especies como el maíz se ha aplicado en el polen (Kodym y Afza, 2003).

La mutagénesis puede ser dirigida o inducida. El primer término hace referencia a aquellas mutaciones precisas que se efectúan en un gen deseado. El segundo, se refiere a la mutagénesis provocada por la acción de mutágenos químicos o físicos que causan cambios al azar y de una manera generalizada en todo el genoma (González, 2011).

#### **2.5.1 La mutagénesis en la mejora genética**

Las mutaciones naturales no son abundantes y menos aún aquellas que llegan a afectar a la funcionalidad de las proteínas. Es por ello, que a principios del siglo XX se comenzó a aplicar técnicas de mutagénesis para incrementar la variabilidad en plantas y acelerar la obtención de individuos mutantes. A partir de 1950, se cultivaron cultivares mejorados a través de la mutagénesis. La FAO en 1994, publicó una lista con más de 1800 cultivares obtenidos por mutagénesis. Actualmente la mayoría de los cultivos explotados en el mundo provienen de

cruzamientos de cultivares mutados, por ejemplo, en 1994 la FAO detalló que el 70 % del trigo cultivado en Italia provenía de cultivos mutados (González, 2014).

### 2.5.2 Tipos de mutágenos

Un mutágeno es un producto natural o elaborado por el hombre que puede alterar la estructura o la secuencia del ADN de un organismo vivo. Podemos clasificar estos agentes mutágenos en función de cómo producen las lesiones ya sea mediante un mecanismo físico o químico. Por lo general la mutagénesis químicas produce mutaciones a distintos niveles, ya sea mutaciones sin sentido o mutaciones sustitutivas. En cambio, la mutagénesis mediante radiación ionizante acostumbra a producir deleciones cromosómicas. Por lo tanto, la selección del mutágeno debe basarse en la eficiencia y en la especificidad para inducir mutaciones y en la alta probabilidad de encontrar el tipo de mutación deseada. También es importante conocer el tipo de mutación que produce el mutágeno para poder seleccionar el método de detección más eficiente (Koornneef *et al.*, 1982)

### 2.5.3 Agentes Mutagénicos

- Mutágenos químicos: son compuestos químicos capaces de alterar las estructuras del ADN de forma brusca, como por ejemplo el ácido nitroso (agente desaminizante), brominas y algunos de sus compuestos.
- Mutágenos físicos: son radiaciones que pueden alterar la secuencia y estructura del ADN, por ejemplo, la radiación ultravioleta que origina dímeros de pirimidina (generalmente de timina), y la radiación gamma y la alfa que son ionizantes. También se consideran agentes físicos los ultrasonidos, con 400.000 vibraciones por segundo, que han inducido mutaciones en algunas plantas superiores, y centrifugación, que también producen variaciones cromosómicas estructurales.
- Mutágenos biológicos: son aquellos organismos “vivos” que pueden alterar las secuencias del material genético de su hospedador; como por ejemplo; virus, bacterias y hongos. Son ejemplo los transposones (fragmentos autónomos de ADN).

### 2.5.4 Niveles de Mutación

Es una clasificación de las mutaciones basada en la cantidad de material hereditario afectado por la mutación:

- Mutación Génica: mutación que afecta a un solo gen.
- Mutación Cromosómica: mutación que afecta a un segmento cromosómico que incluye varios genes.
- Mutación Genómica: mutación que afecta a cromosomas completos (por exceso o por defecto) o a juegos cromosómicos completos.
- Mutación Espontánea: producida de forma natural en los individuos. Como errores en la replicación, lesiones o daños fortuitos en el ADN, entre otras
- Mutación Inducida: se produce como consecuencia de la exposición a agentes mutagénicos químicos o físicos.

Todas las mutaciones se producen por alteración de la secuencia de las bases nitrogenadas del ADN, de esta forma se pueden distinguir las siguientes clases:

- "Secuencia Normal"                      C A T   C A T   C A T   C A T
- Mutación por Cambio de Base:            **G** A T   C A T   C A T   C A T
  - Mutación por Adición de Base:            C A T   **G C A**   T C A   T C A
  - Mutación por Eliminación de Base:        C A T   C A T   **C T C**   A T C

El efecto de estas mutaciones consiste en desacoplar la lectura del mensaje genético, ya que al ocurrir alguna de estas se reordena el mensaje de acuerdo a la base que se agregue, elimine o se cambie (Griffiths, 1998).

### 2.5.5 Mutagénesis química

Dependiendo del modo de acción o mecanismo de los agentes químicos mutagénicos, podemos distinguir tres grupos distintos:

1. Bases análogas: son estructuras químicas muy semejantes a las bases nitrogenadas ya sean purinas o pirimidinas y que por lo tanto pueden sustituir a éstas e incorporarse en el ADN durante la replicación y posteriormente provocar un mal emparejamiento de bases, perpetuando una mutación en la secuencia. Dos ejemplos de estos agentes son:
  - 5- bromouracilo: compuesto artificial usado en investigación. Su semejanza a la base nitrogenada timina hace que empareje con adenina.
  - 2- aminopurina: molécula semejante a la adenina y por lo tanto provoca emparejamiento con timina o a veces, menos frecuentemente, con citosina (González, 2014).
2. Agentes químicos modificadores de bases: provocan alteraciones en la estructura y en el emparejamiento de las bases nitrogenadas. Los más empleados son:
  - Ácido nitroso: provoca desaminación de citosina a uracilo, de metilcitosina a timina y de guanina a otra base nitrogenada lo que provoca transiciones.
  - Agentes alquilantes: fueron la primera clase de mutágenos en ser descubiertos cuando Auerbach y Robson (1946) descubrieron los efectos mutagénicos del gas mostaza y sus componentes durante la segunda Guerra Mundial. Existen varios agentes alquilantes como el metil metano sulfato (MMS), EMS, y la nitrosoguanidina que afectan al ADN. Estos agentes son eficientes mutágenos y de fácil utilización. Es por ello que son habitualmente usados en plantas, en especial el EMS (Figura. 1) (Sega, 1984).
3. Agentes intercalantes: son moléculas que tienen analogía con los nucleótidos y por lo tanto, son capaces de deslizarse entre éstos e intercalarse en la doble hélice haciendo que la polimerasa se equivoque y añada otra base produciendo deleciones o corrimientos de lectura. Un ejemplo de estos agentes son la proflavina y la naranja de acridina, así como el bromuro de etidio (González, 2014).



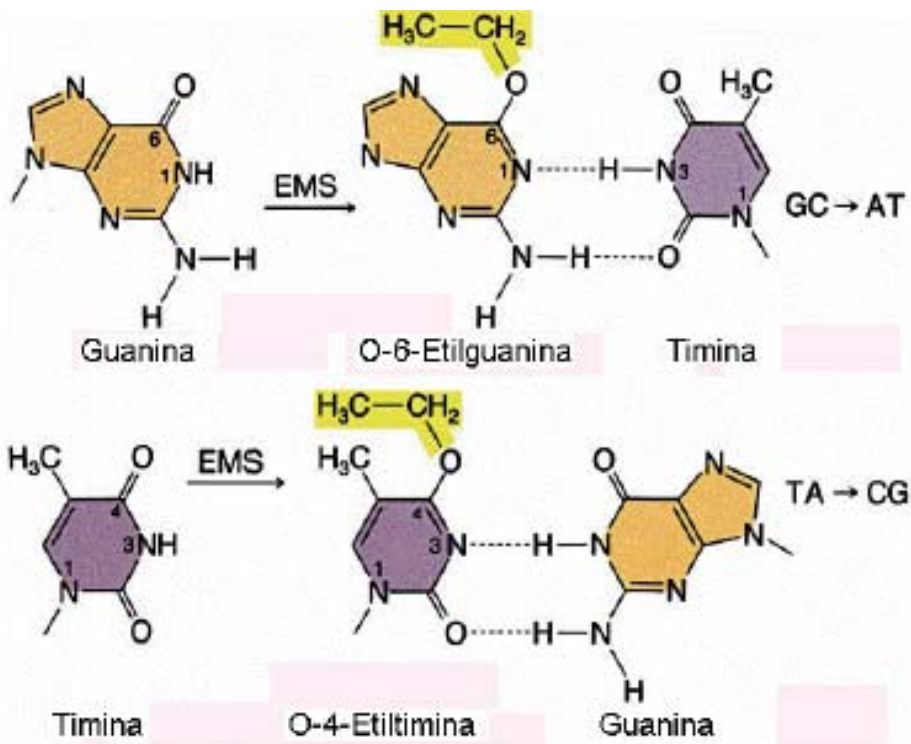


Figura 1. Efecto del EMS a nivel molecular. Las guaninas y las timinas se metilan y ese cambio químico hace que se comporten como una adenina y una citosina respectivamente y en consecuencia complementan con bases distintas a las que deberían complementarse

### 2.5.6 Metano sulfonato de etilo

EL metano sulfonato de etilo es un compuesto químico con propiedades de mutágeno, teratógeno y carcinógeno que posee la fórmula química C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>S. En español, es más correcto nombrarlo como metano sulfonato de etilo (MSE), y en inglés ethyl methane sulphonate (EMS), dado que es un éster del ácido metano sulfónico. En genética se emplea el EMS como agente mutágeno, especialmente en técnicas de genética inversa como el TILLING (lesiones inducidas, localizadas y dirigidas en el genoma). El efecto del EMS en la mutagénesis frecuentemente provoca gran cantidad de mutaciones recesivas a través del genoma (Lightner y Caspar, 1998). Una de las ventajas de la mutagénesis con EMS es que la frecuencia de las mutaciones es independiente del tamaño del genoma, además se pueden obtener una serie de mutaciones alélicas, exhibiendo una gama de

## Revisión bibliográfica

fenotipos que pueden servir para los estudios de función genómica. Otra ventaja del EMS es su alto nivel de saturación sin provocar daños colaterales excesivos en el ADN como pueden ser aneuploidia, fertilidad reducida y mortalidad. Dado estas ventajas, la mutagénesis química se mantiene como una herramienta importante en los programas de mejoramiento, e incluso compite con técnicas sofisticadas como la transgénesis (Soner *et al.*, 2007).

Esteras (2008) refiere que el agente mutagénico empleado con mayor frecuencia es el EMS. Este mutágeno se ha empleado en el mejoramiento genético de varias especies (Tabla 1), incluyendo *P. vulgaris* en la que se han mutado muchas variedades (Tabla 2).

Tabla 1. Especies mutadas con el empleo de mutágenos químicos

Especie	Mutágeno	Concentración del mutágeno	Referencia
<i>Zea mays</i>	EMS	1 %	Till <i>et al.</i> , 2004
<i>Oryza sativa</i>	EMS	0.8-1 %	Wu <i>et al.</i> ,2005
<i>Oryza sativa</i>	EMS	1.6 %	Wu <i>et al.</i> ,2005
<i>Oryza sativa</i>	Az- MNU <sup>1</sup>	1 mM Az- 15 mM MNU	Till <i>et al.</i> , 2007
<i>Glycinemax</i>	NMU <sup>2</sup>	2.5 mM	Cooper, 2008
<i>Glycinemax</i>	EMS	50 mM	Cooper, 2008
<i>Glycinemax</i>	EMS	40 mM	Cooper, 2008
<i>Arachis hypogaea</i>	EMS	0.4 y 1.2 %	Knoll <i>et al.</i> , 2011

<sup>1</sup>Az- MNU: ácido de sodio

<sup>2</sup> NMU: N-nitroso-N-metilurea.

## Revisión bibliográfica

La eficiencia en el proceso de mutación depende en gran medida del tamaño adecuado de la población obtenida. Así pues, para cada especie hay que establecer protocolos con una concentración de mutágeno y tiempo de tratamiento adecuados. Teniendo en cuenta que la aplicación de altas concentraciones de este mutágeno puede afectar la tasa de germinación de las semillas tratadas y la fertilidad de las plantas producidas. Por otro lado, concentraciones bajas implicarán pocas mutaciones y la necesidad de generar poblaciones de mayor tamaño.

Tabla 2. Variedades de frijol común que han sido mejoradas con el empleo de metano sulfonato de etilo (Mutant Variety Database, 2016)

Variedad	Mutágeno	Concentración definida	Resultado o caracteres mejorados	País	Año
Alfa	EMS	0,2%	Color de la semilla blanco, rendimiento, con un volumen de proteína alto, madurez temprana, resistencia a <i>Colletotricum lindemuthianum</i> (antracnosis del frijol) y la calidad al cocinarlo.	Eslovaquia	1972
IAPAR 57	EMS		Resistencia al Virus del mosaico dorado.	Brasil	1992
Mogano	EMS		Color crema uniforme, hábito de crecimiento enano, resistencia a virus, madurez temprana y alto rendimiento.	Italia	1985
Plovdiv 11-M	EMS	0.0062M	Madurez temprana	Bulgaria	1998
Valle del Cisne	EMS	0.04M	Color de la semilla blanco y color de la flor blanco.	Estados Unidos	1981

### 2.5.7 Medidas de seguridad empleadas al trabajar con el EMS

Al ser un agente alquilante que es altamente tóxico y carcinógeno debido a sus propiedades mutagénicas, se debe tener en cuenta una serie de medidas para su manipulación ya que es fundamental para la salud humana. Es necesario tener en cuenta que una manipulación del mutágeno con miedo excesivo puede ser

peligrosa pues esto supera al comportamiento racional y el riesgo de accidentes puede aumentar.

1. Es obligatorio el uso de guantes mientras estemos manipulando el mutágeno químico, los guantes de látex deben usarse dobles pues estos no son totalmente impermeables. Aun cuando trabajemos detrás de una superficie transparente, ya sea en una campana extractora de gases o en una cabina protegida se deben usar gafas o cubiertas protectoras para los ojos.
2. Los guantes no protegen totalmente (aun usándolos doble) contra el reactivo mutágeno y las diluciones que se deriven de este, por lo que nunca deben estar en contacto directo con ellos. Se deben cambiar con frecuencia e ir almacenándolos en una bolsa señalada para su posterior incineración o descontaminación
3. Los frascos que contienen el agente alquilante (EMS) o diluciones de este se deben abrir siempre dentro de la campana extractora de gases, que ya debe estar funcionando, para evitar la inhalación de los vapores tóxicos.
4. El volumen de EMS que se vaya a usar debe ser tomado cuidadosamente para no contaminar la micropipeta, para mayor seguridad esta debe ser descontaminada una vez finalizado el trabajo. Es necesario señalar que el volumen requerido se haya calculado anteriormente para evitar demoras.
5. La superficie donde se vaya a trabajar con el mutágeno se debe cubrir con papel de filtro fijado con cinta adhesiva de modo que al finalizar se pueda recoger y en él vaya cualquier derramamiento del reactivo o soluciones preparadas con este, posteriormente se introduce el papel de filtro en la bolsa de los desechos señalada.
6. Una vez preparada las diluciones estas deben ser vertidas cuidadosamente en el frasco donde se encuentra el material vegetal para evitar salpicaduras, Una vez añadida la disolución del mutágeno el frasco debes ser tapado con parafilm. Es importante señalar que siempre es más seguro en el caso de semillas, colocarlas primero en el frasco y después añadir el

mutágeno, de lo contrario hay más probabilidades de producirse salpicaduras.

7. Una vez concluido el tratamiento con la disolución del mutágeno, se debe decantar el remanente o eliminar con una pipeta. Inmediatamente se debe lavar el material vegetal con agua destilada para eliminar los remanentes del mutágeno.
8. El contacto directo con el material mutagenizado debe ser evitado, incluso cuando se usan guantes. Para la siembra se aconseja el uso de algún utensilio como pinzas.

### **2.5.8 Métodos para inactivar el EMS**

1. La solución mutagénica, incluido las aguas de lavado pueden ser inactivadas adicionándoles una solución de tiosulfato de sodio hasta una concentración final del 10%, además para aumentar el pH se añade suavemente Hidróxido de sodio hasta una concentración final del 1%, esta solución se deja reposar toda la noche para una total descomposición del mutágeno.
2. Para descontaminar la cristalería e instrumentos metálicos inicialmente se prepara una solución compuesta por tiosulfato de sodio al 10% e hidróxido de sodio al 1%, posteriormente se sumergen en esta solución durante toda la noche.
3. El material desechable (guantes, papel, plásticos etc.) puede ser incinerado, de lo contrario pueden ser expuesto a la solución de tiosulfato 10% e hidróxido de sodio 1% para ser descontaminados.

Otra vía de inactivación es utilizar una solución de NaOH al 1M, el procedimiento es similar a los anteriormente explicados, pero utilizando esta solución, también se puede utilizar NaOH a 2M (US National Library of Medicine, 2016).

### **2.6 Variables evaluadas para la determinación de la concentración óptima de EMS**

Para la determinación de la concentración óptima de EMS se han descrito variables morfológicas como la germinación de las plántulas, altura de las plantas, desarrollo foliar y sobrevivencia total. Otras variables que forman parte del rendimiento agrícola donde se mencionan la floración, número de legumbres y semillas, largo y ancho de las legumbres, tamaño y peso de las semillas se han empleado con este fin (Porch *et al.*, 2009).

### **2.7 Características agronómicas del cultivar DOR 364**

#### Origen

Según (CNIA-INTA, 1995), este cultivar fue desarrollado por el Proyecto de Mejoramiento Genético del Centro Internacional de Agricultura Tropical. Usaron como progenitores al Revolución 83 y RAB 166 x DOR 125. DOR 364 ha tenido amplia aceptación en varios países como El Salvador, Honduras y Costa Rica. En pruebas regionales ha demostrado que tiene buena adaptación y alta capacidad de rendimiento. En Nicaragua se ha sembrado en las áreas más importantes y sus rendimientos son generalmente altos.

#### Adaptabilidad

El DOR 364 se adapta a un rango amplio de suelos, aunque se comporta mejor en suelos francos y deben evitarse los suelos pesados o arcillosos. Tolerancia alta temperatura por períodos cortos. Soporta períodos secos durante el desarrollo vegetativo, pero afecta el rendimiento durante el llenado de legumbres. En un estudio en 19 localidades de Carazo se encontró que es el cultivar con menor riesgo productivo y se adapta a suelos con baja fertilidad.

#### Manejo agronómico

El cultivar no puede expresar su potencial de rendimiento si no va acompañado de una serie de prácticas de manejo que permitan su expresión. Estas son:

##### a. Época de siembra

## Revisión bibliográfica

---

Se puede sembrar en cualquier período, pero es mejor su calidad de grano en siembras de postrera y apante.

### b. Cantidad de semilla

Se recomienda utilizar de 80-100 libras de semilla por ha con más de 85% de germinación para garantizar una población de 200,000 a 250,000 plantas/ha, para obtener altos rendimientos.

### c. Fertilización

La mayoría de los agricultores que cultivan frijol no fertilizan por carecer de los recursos económicos para hacerlo. Sin embargo, se recomienda utilizar 1 qq/ha de fórmula NPK 18-46-0 o 10-30-10.

### d. Características agronómicas

Hábito de crecimiento: 1lb arbustivo guía larga

Color de la legumbre: Rosado

Forma del grano: Alargado

Altura de ramificación: 6 cm.

Nudos de ramificación: 3-4

Número de ramas: 2-4

Altura de follaje: 50 cm.

Ancho del follaje: 54.5 cm.

Altura inserción primera legumbre: 14 cm.

Altura ápice legumbre al suelo: 5.81 cm.

Primera flor abierta: 32 días

Floración completa: 35-37 días

Llenado de grano: 27 días

Madurez fisiológica: 63-68 días

Siembra a cosecha: 75-85 días

Legumbres / planta: 12

Peso de 100 semillas: 24.8 gr.

Granos /legumbre: 6

Rendimiento esperado: 15-25 qq/ha.

Color del grano: Rojo oscuro

### Ventajas:

- Alto rendimiento.
- Tiene ciclo vegetativo de 75-85 días, lo cual se considera intermedio a largo por lo que debe sembrarse en áreas con buena distribución lluviosa.
- Resistencia a enfermedades: Es resistente a los virus Mosaico Común y Mosaico Dorado. Tolera enfermedades causadas por hongos como Mustia Hilachosa (*Thanatephorus cucumeris*) y Mancha Angular (*Phaeoisariopsis griseola*).
- El cultivar tiene buena aceptación por los agricultores debido a sus características agronómicas y culinarias.

### Restricciones:

- Color de grano. El color del grano es oscuro (retinto), motivo por el cual el precio en el mercado es menor en épocas de abundante oferta.
- Ciclo vegetativo. Se considera que el cultivar tiene un ciclo vegetativo intermedio a largo, motivo por el cual no se adapta a zonas con ciclos lluviosos cortos o a la sequía.
- Susceptible a la roya, virus Mosaico Amarillo Dorado
- El hábito de crecimiento y la altura de inserción de primera legumbre no es el óptimo para la cosecha mecanizada.



### 3. Materiales y métodos

La presente investigación se realizó en un sistema de producción protegida del Instituto de Biotecnología de las plantas (IBP) en el período de diciembre 2015 a abril 2016. Las semillas fueron donadas por el Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP) de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. El cultivar a estudiar fue DOR 364 conocido como Delicias 364 (testa roja oscura) según la lista oficial de cultivares comerciales (MINAGRI, 2015).

#### Procedimientos generales

Para realizar la mutagénesis en el laboratorio de Biología Molecular se empleó el protocolo propuesto por Pankhurst *et al.*, (2004) con algunas modificaciones:

1. Se emplearon 125 semillas por cada concentración (20, 30, 40, 50, 60 mM) de EMS y se introdujeron en frascos Erlenmeyer estériles de 300 ml de capacidad.
2. En los Erlenmeyers con las semillas, se le adicionó 150 ml de la solución de EMS con agua desionizada estéril (v/v) a una concentración definida. Los frascos se colocaron a 22 °C de temperatura, en agitación circular constante a 112 rpm por 16 horas.
3. Se descartó la solución y se enjuagaron las semillas tratadas 10 veces con agua destilada, cada enjuague se realizó por un tiempo de 5 minutos.
4. Las semillas tratadas y un control de semillas sin tratar, se sembraron en bolsas con 4 kg de sustrato (80% de materia orgánica y 20% de Zeolita) a una densidad de siembra de 5 semillas/bolsas.

La siembra se realizó manual tomando en cuenta las medidas de seguridad descritas en el acápite (2.6.6), las bolsas se colocaron en un cantero con un área de 30 m<sup>2</sup>, 20 m de largo por 1.50 m de ancho. Se depositó una semilla por nido. Las labores culturales realizadas durante todo el ciclo fue control manual de plantas no objeto de cultivo y riego por aspersión, 2 veces al día durante 3 min.

### **3.1 Efecto de diferentes concentraciones de EMS en la germinación de semillas**

Para determinar el por ciento de plantas germinadas se tomó en cuenta aquellas plantas que tuvieran totalmente abierto los dos primeros folíolos (Fig. 2 a). A los 7 y 14 días se contabilizó el número de plantas germinadas a partir de las semillas tratadas con las diferentes concentraciones de EMS, y el control.

### **3.2 Efecto de diferentes concentraciones de EMS en el crecimiento y desarrollo de plantas de frijol**

Con el objetivo de determinar el efecto del EMS en el crecimiento y desarrollo del frijol, a los 14 días de cultivo se midió la altura a las plantas provenientes de semillas tratadas con las diferentes concentraciones del mutágeno. Esta actividad se realizó con una regla milimetrada, se tomó como base el nivel del suelo y como extremo superior el ápice de la planta (Fig. 2 b), los datos recolectados se expresaron en centímetro (cm). Posteriormente, al inicio de la floración se midió el área foliar. Para ello, se utilizaron como muestra 10 plantas por tratamiento, excepto en los tratamientos con las concentraciones de 50 y 60 mM de EMS donde solo se muestrearon 4 plantas que alcanzaron desarrollo fenotípico similar al control. Para la colecta de los datos se midió la longitud y ancho de cada folíolo con la utilización de una regla milimetrada. El área foliar se calculó a través de la fórmula que se muestra a continuación:

$$AF = \sum(l * a) * 0.73$$

Dónde: AF: área foliar; l: largo de cada folíolo; a: ancho de cada folíolo; 0,73: coeficiente de área foliar para frijol común determinado por Lazarov, 1965. El área foliar se expresó en centímetro cuadrado (cm<sup>2</sup>)

Una vez alcanzada la madurez fisiológica (63 días de cultivo), en la totalidad de las plantas de cada tratamiento, se midió con una regla milimetrada, la distancia desde el suelo hasta la inserción del primer par de legumbres en el tallo (Fig. 2 c). Esta variable se clasificó como distancia de despegue y se expresó en cm.

### 3.3 Caracterización morfológica y fenológica de plantas de frijol provenientes de semillas tratadas con diferentes concentraciones de EMS

Mediante observación visual, se detectaron las posibles variaciones morfológicas ocurridas en las plantas provenientes de semillas tratadas con EMS. Teniendo en cuenta el tipo de cambio en la morfología, se anotó el número de plantas que presentaron variaciones y se calculó la frecuencia de estas. A través de evaluaciones periódicas, se determinó el efecto del EMS en la duración de las fases fenológicas. Basado en la descripción de las fases fenológicas del frijol indicadas por Fernández *et al.*, (1986), se seleccionaron aquellas a evaluar en este experimento (Tabla 3).

Tabla 3. Descripción de las fases fenológicas de frijol evaluadas en esta investigación

Fases	Etapa		Evento con que se inicia cada etapa
	Código	Nombre	
Vegetativa	V1	Emergencia	Los cotiledones del 50% de las plantas aparecen al nivel del suelo
Reproductiva	R6	Floración	Se ha abierto la primera flor en el 50% de las plantas
	R8	Llenado de las vainas	Llenado de semillas en la primera vaina en el 50% de las plantas
	R9	Maduración	Cambio de color en por lo menos una vaina en el 50% de las plantas (del verde al amarillo uniforme o pigmentado)

### **3.4 Efecto de diferentes concentraciones de EMS en la floración de plantas de frijol**

A los 35 y 45 días de cultivo se realizaron evaluaciones para determinar la influencia de EMS en la floración de frijol. Para ello, se cuantificó el número de plantas con flores en cada tratamiento y se tuvo en cuenta que cada individuo presentara al menos dos flores abiertas. A partir de los datos colectados se determinó el porcentaje de plantas con flores. Mediante observación visual se describieron diferencias detectadas en la coloración de las flores.

### **3.5 Efecto de diferentes concentraciones de EMS en la sobrevivencia total de plantas de frijol**

Para determinar la sobrevivencia, se realizó un conteo de la cantidad de plantas que llegaron a la cosecha y produjeron semillas de las que se sembraron inicialmente. A partir de los datos colectados, se determinó el porcentaje de sobrevivencia total. Para ello el número de plantas que llegaron a la fase fenológica de reproducción y produjeron semillas, se dividió entre el número total de semillas sembradas y se multiplicó por 100.

### **3.6 Efecto de diferentes concentraciones de EMS sobre componentes del rendimiento en frijol**

Para la evaluación del rendimiento se tomaron 10 plantas por tratamiento, excepto en los tratamientos con las concentraciones de 50 y 60 mM de EMS donde solo se muestrearon 4 plantas que alcanzaron desarrollo fenotípico similar al control. Estas se secaron expuestas a la luz solar por dos días durante 8 horas. Transcurrido este período, se contó el número de legumbres por planta y se pesó el total de estas. Se midió el largo y ancho de las legumbres secas (Fig. 2 d, e). Posteriormente se extrajeron las semillas de las legumbres y se contó el número de semillas por legumbre de cada planta. Se midió el largo y ancho de semillas de una muestra de 10 legumbres por tratamiento tomadas al azar (Fig. 2 f, g). Se pesaron las semillas provenientes de cada legumbre separadas por planta y se tuvo en cuenta el tratamiento. Para cada tratamiento se determinó el peso de 100 semillas. Las determinaciones de peso se realizaron en una balanza digital marca

## Materiales y métodos

Sartorius modelo BSA124S y los datos colectados se expresaron en gramo (g). Las mediciones de largo y ancho de las legumbres y semillas se tomaron con un pie de rey y los datos obtenidos se expresaron en milímetro (mm).

### 3.7 Procesamiento estadístico

En el montaje del experimento se empleó un diseño experimental aleatorio. Se utilizaron 6 tratamientos y 125 muestras por tratamiento. Cada muestra se definió como una unidad experimental, por lo que el número de réplicas establecidas por tratamiento dependió del número de plantas que sobrevivieron y fueron capaces de pasar de una fase fenológica a otra. Para el análisis de los resultados se aplicó el paquete estadístico SPSS versión 22. A causa de que los datos colectados a partir de algunos de los tratamientos, no presentaron distribución normal, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal- Wallis para la comparación de las medias. En la búsqueda de los grupos homogéneos o diferencias significativas entre grupos se aplicó el test de rango múltiple Scheffe con un nivel de significación 95 % o sea  $\alpha=0,05$ . El cálculo del error estándar se realizó mediante la raíz cuadrada del producto de la media cuadrática dividida entre el tamaño de la muestra.



Figura 2. Descripción de evaluaciones realizadas. a- planta germinada; b- altura de la planta; c- despegue; d- largo de las legumbres; e- ancho de las legumbres; f- ancho de la semilla; g- largo de la semilla

### 4. Resultados y Discusión

#### 4.1 Efecto de diferentes concentraciones de EMS en la germinación de semillas

La germinación de las semillas de frijol estuvo influenciada por el efecto del EMS. El incremento de las concentraciones de EMS causó disminución del porcentaje de germinación de las semillas tratadas con este mutágeno (Tabla 4). A los siete días de cultivo, el mayor porcentaje de plantas germinadas se observó en el tratamiento control con diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Tabla 4). El número de plantas germinadas a partir de las semillas no tratadas fue 5.3 veces mayor que el obtenido de semillas tratadas con 20 mM de EMS. En este período de tiempo, no se presentaron diferencias en el porcentaje de plantas germinadas provenientes de semillas tratadas con 20 y 30 mM de EMS. Sin embargo, esta variable decreció significativamente para semillas tratadas con concentraciones de este mutágeno superiores a 40 mM (Tabla 4).

Tabla 4. Plantas germinadas de frijol cultivar DOR 364 provenientes de semillas tratadas con diferentes concentraciones de EMS

Concentraciones de EMS (mM)	Plantas germinadas a los 7 días (%)	Plantas germinadas a los 14 días (%)
0	98,4 a	99,2 a
20	18,4 b	63,2 b
30	12,0 b	62,4 b
40	1,6 c	33,6 c
50	1,6 c	7,2 d
60	0,8 c	3,2 d
E.E. (ȳ) ±	2,2	3,6

Letras diferentes en una misma columna indican diferencia significativa a un  $\alpha < 0.05$  de acuerdo con la prueba no paramétrica Kruskal Wallis y el test de rango múltiple Scheffe

Al comparar el porcentaje de plantas germinadas obtenido a los 7 y 14 días, se observó un incremento considerable de esta variable, en todos los tratamientos estudiados exceptuando el control, cuando aumentó el período de cultivo (Tabla

## Resultados y Discusión

---

4). Con la aplicación de 20 y 30 mM de EMS, la germinación se afectó en un 36 y 37% en comparación con el control (Tabla 4). Esta afectación fue significativamente mayor con un 65.6% de plantas que no germinaron para las semillas tratadas con 40 mM de este mutágeno (Tabla 4). Similar a los resultados observados a los siete días después de la siembra, las semillas tratadas con las concentraciones de 50 y 60 mM de EMS presentaron el menor porcentaje de germinación (Tabla 4).

Es importante destacar que la evaluación del porcentaje de germinación permitió encontrar diferencias significativas en la respuesta de las semillas tratadas con distintas concentraciones de EMS. Se evidenció claramente, que la respuesta diferente en el porcentaje de germinación, estuvo causado por el efecto del EMS. El tratamiento a las semillas con este mutágeno no solo afectó el porcentaje de germinación, sino que provocó, además, retardo de esta fase fenológica, en comparación con la respuesta de las semillas no tratadas.

El porcentaje de germinación, ha sido una variable importante en la determinación de la concentración óptima de EMS, para establecer poblaciones de mutantes de frijol (Porch *et al.*, 2009). En línea con los resultados obtenidos en esta investigación, estos autores informaron que la aplicación de EMS afectó drásticamente el porcentaje de plantas germinadas e incluso provocó dilatación de la etapa de germinación. Se ha descrito, que la determinación de la concentración óptima de EMS para la obtención de poblaciones de mutantes, está influenciada por la especie y dentro de una misma especie por el cultivar (Tabla 1 y 2). Esta respuesta diferente debe estar causada por la sensibilidad de la especie o cultivar objeto de estudio al mutágeno empleado. Un ejemplo de ello, lo constituyen los resultados obtenidos en este trabajo para DOR 364, comparados con los mencionados por Porch *et al.* (2009) en BAT 93, donde se empleó para ambos, el protocolo de Pankhurst *et al.* (2004). Parece ser que el cultivar DOR 364 es más sensible al efecto del EMS que el BAT 93, pues para las semillas tratadas con 20 mM de EMS el porcentaje de plantas germinadas en DOR 364 fue de 63,2%, mientras que en BAT 93 superó el 96% (Porch *et al.*, 2009).

### **4.2 Efecto de diferentes concentraciones de EMS en el crecimiento y desarrollo de plantas de frijol**

El EMS influyó sobre las variables relacionadas con el crecimiento y desarrollo de plantas de frijol. La altura de las plantas se afectó con la aplicación de EMS a las semillas (Tabla 5). Las plantas derivadas de semillas sin tratar alcanzaron la mayor altura con diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Tabla 5). No se observaron diferencias en la altura de las plantas provenientes de las semillas tratadas con 20, 30 y 40 mM de EMS. Sin embargo, la altura de las plantas obtenidas de semillas tratadas con 50 y 60 mM fue significativamente inferior comparada con las plantas procedentes de semillas procesadas con 20 mM (Tabla 5).

El área foliar también fue influenciada por el EMS, el valor más alto de esta variable se presentó en las plantas originadas de semillas sin tratar con diferencias con los demás tratamientos (Tabla 5). En la medida que se incrementaron las concentraciones de EMS se observó una disminución significativa del área foliar, llegando a su valor inferior en las plantas derivadas de semillas tratadas con 40, 50 mM de este mutágeno (Tabla 5). En el caso del despegue, solo se observó diferencia significativa entre las plantas provenientes de semillas sin tratar y las plantas derivadas de semillas tratadas con 60 mM de EMS (Tabla 5).



## Resultados y Discusión

Tabla 5. Crecimiento y desarrollo de plantas de frijol cultivar DOR 364 provenientes de semillas tratadas con diferentes concentraciones de EMS

Concentraciones de EMS (mM)	Altura a los 14 días de cultivo (cm)	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Despegue <sup>1</sup> (cm)
0	9,4 a	1507,4 a	13,0 a
20	7,0 b	982,1 b	11,6 ab
30	5,9 bc	941,0 b	10,4 ab
40	5,5 bc	574,2 d	9,6 ab
50	4,7 c	577,3 d	9,4 ab
60	2,7 c	696,9 c	8,0 b
E.E. ( $\bar{y}$ ) $\pm$	0,7	14,6	1,2

Letras diferentes en una misma columna indican diferencia significativa a un  $\alpha < 0.05$  de acuerdo con la prueba no paramétrica Kruskal Wallis y el test de rango múltiple Scheffe

<sup>1</sup>despegue: distancia desde el suelo hasta la inserción del primer par de legumbres en el tallo

De forma general se apreció que la aplicación de EMS afectó el crecimiento y desarrollo de las plantas de frijol. Las diferentes respuestas observadas pudieron estar relacionadas con el efecto del EMS en el retardo de las fases fenológicas del cultivo. Entre los cambios fenotípicos observados en las plantas derivadas de semillas tratadas con EMS se destacaron el acortamiento de los entrenudos, raquitismo y enanismo (Fig. 3). Ello debió conllevar a que el crecimiento y desarrollo de estas plantas fuera inferior comparado con aquel presente en las plantas originadas de semillas que no tuvieron el efecto del EMS. Los resultados presentados en este trabajo de la influencia del EMS en la altura de las plantas coinciden con los obtenidos previamente por Porch *et al.* (2009). Respecto al área foliar de las plantas, la respuesta mostrada en esta investigación, es similar a la descrita por Motto *et al.*, (1979) en el cultivar Royal Red y Tomlekova, (2010) en Plovdiv 11M y Plovdiv 15. En la presente investigación, por vez primera se evaluó el despegue como una variable para tributar a la determinación de la concentración óptima de EMS, pues en la literatura científica consultada, no se encontró información al respecto. Es importante destacar, que los aportes de dicha variable al objetivo perseguido en la investigación no fueron notorios, a partir de

los datos obtenidos para este indicador, no fue posible discriminar entre los distintos tratamientos.

### **4.3 Caracterización morfológica y fenológica de plantas de frijol provenientes de semillas tratadas con diferentes concentraciones de EMS**

En todos los tratamientos donde las plantas se originaron de semillas expuestas al EMS se observaron variaciones morfológicas (Tabla 6). Las variaciones morfológicas más frecuentes fueron engrosamiento del tallo con ápice caulinar atrofiado, tallo enano, tallo raquíptico, hojas pequeñas, hojas con epidermis rugosa, hojas de color verde intenso, albinismo y clorosis (Fig. 3). Es de destacar que la mayor frecuencia de variaciones morfológicas, se presentaron en las plantas provenientes de semillas tratadas con 30 mM de EMS, seguida de los tratamientos donde se aplicaron 20 y 40 mM del mutágeno (Tabla 6). Con las concentraciones de 50 y 60 mM se obtuvieron los valores menores de variaciones morfológicas (Tabla 6).

## Resultados y Discusión

Tabla 6. Frecuencia de variaciones morfológicas observadas en las plantas germinadas de semillas tratadas con diferentes concentraciones de EMS

Tejido mutado	Tipo de mutación	Frecuencia (%) <sup>1</sup>				
		20 mM EMS	30 mM EMS	40 mM EMS	50 mM EMS	60 mM EMS
Tallos	Engrosamiento y ápice atrofiado	0,00	6,0	4,0	2,0	0
	Enano	8	9,0	5,0	0,7	0,6
	Raquítico	6	5,0	3,0	0,3	0,4
	Pequeñas	0,4	3,0	1,0	0,0	0,3
Hojas	Epidermis rugosa	0,2	1,0	2,0	0,0	0,5
	Verde intenso	0,6	4,0	3,0	0,0	0,2
	Albinismo	0,8	0,6	0,0	0,0	0,0
	Clorosis	1,2	0,4	0,0	0,0	0,0
	Total	17	29	18	3	2

<sup>1</sup>frecuencia: se determinó basado en las 125 semillas tratadas para cada concentración de EMS

La detección de cambios morfológicos es un aspecto importante a tener en cuenta para la determinación de la concentración óptima de un agente mutágeno. Aunque estos cambios son solo observables a nivel de fenotipo, a través de ello se puede estimar la frecuencia de mutaciones (Porch *et al.*, 2009). En esta investigación la mayor frecuencia de cambios morfológicos se presentó en el rango de concentraciones de 20–40 mM de EMS. Las manifestaciones morfológicas diferentes, disminuyeron con el incremento de las concentraciones de este mutágeno a 50 y 60 mM, esto debió estar influenciado por la baja sobrevivencia de las plantas pertenecientes a dichos tratamientos. Estas altas concentraciones de EMS fueron en extremo letales, lo que atentó contra el número de plantas a evaluar. Es importante destacar que las variaciones morfológicas

## Resultados y Discusión

detectadas fueron inducidas por el efecto del EMS y no ocurrieron de forma espontánea, pues en las plantas control no se observaron cambios fenotípicos.



Figura 3. Variaciones morfológicas observadas en plantas de frijol proveniente de semillas tratadas con EMS. a- engrosamiento del tallo con ápice caulinar atrofiado; b- tallo enano; c- tallo raquíptico; d- hojas con epidermis rugosa; e- hojas pequeñas de color verde intenso; f- albinismo; g- clorosis

## Resultados y Discusión

Los cambios causados por el EMS en la morfología de las plantas de frijol, detectados en esta investigación han ocurrido con frecuencia en otras especies, ejemplo de ello tenemos, la reducción de las dimensiones de las hojas en trigo (Naresh y Vaishali, 2016) y tallos enanos en *Catharanthus roseus* (Mangaiyarkarasi *et al.*, 2014). En otros genotipos de frijol irradiados con rayos gamma se observaron presencia de hojas albinas y cloróticas (Alvarado Martínez *et al.*, 2014).

El tratamiento a las semillas con EMS influyó sobre la duración de las fases fenológicas en las plantas de frijol. Con concentraciones de este mutágeno a partir de 30 mM se produjo un retardo en las diferentes fases fenológicas del cultivo (Tabla 7). La germinación se prolongó de 7 a 14 días, la floración se atrasó 13 días, el llenado de las legumbres se dilató de 7–14 días y la maduración fisiológica se extendió 29 días en comparación con el control (Tabla 7).

Tabla 7. Variaciones en la fenología de las plantas de frijol procedentes de semillas tratadas con diferentes concentraciones de EMS

Tratamientos	V1 <sup>a</sup>	R6 <sup>b</sup>	R8 <sup>c</sup>	R9 <sup>d</sup>
	(días)			
0	7	36	49	63
20	7	42	49	63
30	14	49	56	78
40	14	49	63	92
50	14	49	56	92
60	14	49	56	92

<sup>a</sup>V1: emergencia; <sup>b</sup>R6: floración; <sup>c</sup>R8: llenado de las legumbres; <sup>d</sup>R9: maduración

Las respuestas respecto al efecto de mutágenos físicos y químicos sobre las fases fenológicas han sido variadas, en línea con los resultados obtenidos en esta investigación, el retardo en las fases fenológicas a causa de la aplicación de agentes mutagénicos se describió previamente para *Cicer reticulatum* (Kamble *et al.*, 2015). Sin embargo, en *Brassica napus* L., el tratamiento a las semillas con EMS no causó efecto en las diferentes fases fenológicas, no se observaron

## Resultados y Discusión

diferencias entre los mutantes y las plantas controles (Emrani *et al.*, 2015). En esta misma especie la combinación de radiaciones gamma y EMS dieron lugar a mutantes con floración y maduración temprana (Landge *et al.*, 2009).

### 4.4 Efecto de diferentes concentraciones de EMS en la floración de plantas de frijol

Se observó retardo y disminución en la floración de plantas de frijol derivadas de semillas tratadas con diferentes concentraciones de EMS (Tabla 8). A los 35 días de cultivo, cuando la mayoría de las plantas provenientes de semillas sin tratar habían florecido, las plantas originadas de semillas tratadas con 20 y 40 mM de EMS no presentaban flores aún. Mientras que, las plantas procedentes de semillas expuestas a 30, 50 y 60 mM de EMS, apenas iniciaron la floración (Tabla 8).

Tabla 8. Floración de plantas de frijol cultivar DOR 364 provenientes de semillas tratadas con diferentes concentraciones de EMS

Concentraciones de EMS (mM)	Plantas con flores <sup>1</sup> (%) 35 días	Plantas con flores <sup>1</sup> (%) 45 días
0	98	100
20	0	79
30	17	55
40	0	43
50	11	67
60	17	33

<sup>1</sup> plantas con flores (%): solo se tuvieron en cuenta las plantas que sobrevivieron hasta la floración

Transcurridos 45 días de cultivo, período en el que la floración estaba concluyendo, el porcentaje de plantas con flores también estuvo afectado por el efecto del EMS (Tabla 8). El porcentaje de plantas con flores, no alcanzó el 80 % en ningún tratamiento, donde las semillas fueron expuestas a la acción de este mutágeno. En plantas resultantes de semillas tratadas con 40 y 60 mM de EMS esta variable fue inferior a 50%. En la medida que se incrementaron las concentraciones de EMS, el porcentaje de plantas con flores disminuyó exceptuando el tratamiento donde se aplicó 50 mM de este mutágeno. Esta

respuesta diferente pudo estar relacionada con el bajo número de plantas que sobrevivieron (9) en ese tratamiento de las cuales emitieron flores seis. Todas las concentraciones de EMS estudiadas causaron retardo y disminución de la floración, esto debe estar relacionado con su efecto inhibitor (Dhakshanamoorthy *et al.*, 2010). Esta afectación en la eficiencia de la floración es generalmente debido a la ocurrencia de daños biológicos en las plántulas que provocan mortalidad y esterilidad (Konzak *et al.*, 1965). Variaciones en la floración de plantas de frijol provenientes de semillas tratadas con EMS han sido previamente descritas (Borkar *et al.*, 2010). Basados en nuestros resultados y aquellos informados en la literatura científica consultada, se demostró que la floración es una variable a tener en cuenta para la determinación de la concentración óptima de EMS.

### **4.5 Efecto de diferentes concentraciones de EMS en la sobrevivencia total de plantas de frijol**

A medida que aumentó la concentración del mutágeno, mayor fue la mortalidad y menor el porcentaje de sobrevivencia de las plantas que llegaron al final de la cosecha (Fig. 4). Las concentraciones de 20 y 30 mM de EMS fueron letales en 48–59% de las plantas resultantes de semillas tratadas, ello disminuyó significativamente la sobrevivencia en comparación con el control (Fig. 4). No se observó diferencia en la sobrevivencia entre plantas originadas de semillas tratadas con 20 y 30 mM de EMS (Fig. 4). Esta variable disminuyó considerablemente con la aplicación de EMS a concentraciones igual o mayor que 40 mM (Fig. 4). Aunque no se presentaron diferencias significativas en la sobrevivencia de las plantas procedentes de semillas tratadas con concentraciones de EMS a partir de 40 mM, es de destacar que con 50 y 60 mM de este mutágeno solo llegaron a la cosecha 7 y 5 plantas respectivamente.

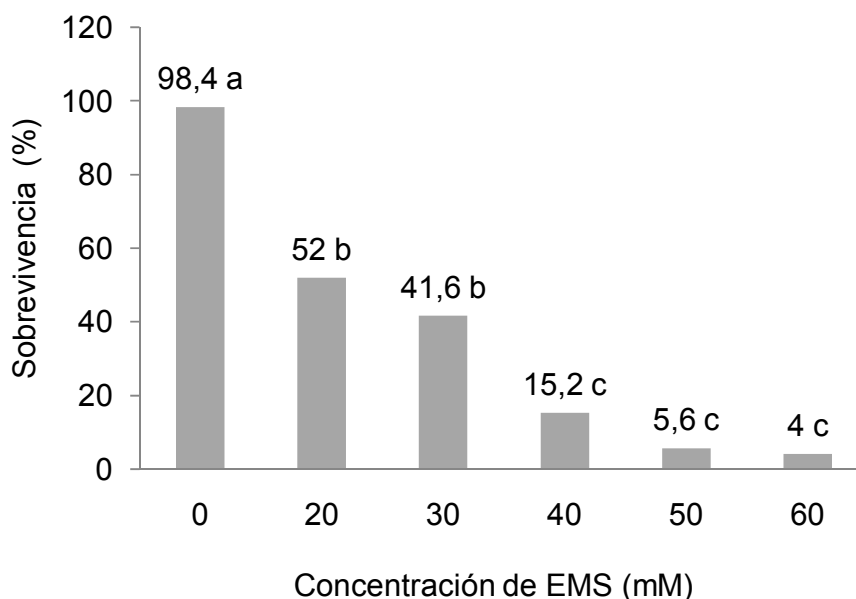


Figura 4. Porcentaje de sobrevivencia de las plantas provenientes de semillas tratadas con metano sulfonato de etilo

Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa a un  $\alpha < 0.05$  de acuerdo con la prueba no paramétrica Kruskal Wallis y el test de rango múltiple Scheffe

Esta respuesta debe estar relacionada con el demostrado efecto letal del EMS (Kozak *et al.*, 1965), que causó la muerte en más del 90% de las plántulas derivadas de semilla tratadas con las concentraciones mayores de este mutágeno. Resultados similares a los obtenidos en esta investigación se informaron por Porch *et al.* (2009). Estos autores indicaron que el aumento de las concentraciones de EMS disminuyeron el porcentaje de sobrevivencia en el cultivar de frijol BAT 93. Al comparar los resultados de este trabajo en DOR 364, con aquellos publicados por Porch *et al.* (2009) en BAT 93, se evidenció que la sobrevivencia de las plantas tratadas con EMS presentó respuestas diferentes en dependencia del genotipo. Por ello, siempre que varíe el cultivar, para la determinación de la concentración óptima de este mutágeno, con evaluaciones basadas en la sobrevivencia de las plantas, se hace necesario el estudio de diferentes concentraciones.



## Resultados y Discusión

### 4.6 Efecto de diferentes concentraciones de EMS sobre componentes del rendimiento en frijol

Al analizar el efecto del EMS sobre los componentes del rendimiento, no se detectaron diferencias significativas en el número de legumbres por planta (Tabla 9). Sin embargo, el número de semillas por legumbre y el número de semillas por planta disminuyeron significativamente con la aplicación de este mutágeno (Tabla 9). Las legumbres de las plantas provenientes de semillas tratadas con EMS presentaron menor cantidad de semillas que el control, de ello se deriva que el número de semillas por planta fue dos veces mayor en las plantas procedentes de semillas sin tratar (Tabla 9). Para las dos variables, número de semillas por legumbre y número de semillas por plantas, no se observaron diferencias significativas en la respuesta de plantas resultantes de semillas tratadas con las distintas concentraciones de EMS.

Tabla 9. Efecto de diferentes concentraciones EMS en número de legumbres y número de semillas de plantas de frijol cultivar DOR 364

Concentraciones de EMS (mM)	NLP <sup>1</sup>	NSL <sup>2</sup>	NSP <sup>3</sup>
0	16,5	6,0 a	97,9 a
20	15,2	3,4 b	40,2 b
30	14,0	3,0 b	37,5 b
40	11,3	3,1 b	33,4 b
50	11,1	2,7 b	28,8 b
60	13,4	3,2 b	40,6 b
E.E. ( $\bar{y}$ ) $\pm$	2.1 ns*	0.5	9.2

Letras diferentes en una misma columna indican diferencia significativa a un  $\alpha < 0.05$  de acuerdo con la prueba no paramétrica Kruskal Wallis y el test de rango múltiple Scheffe

<sup>1</sup>NLP: número de legumbres por planta; <sup>2</sup>NSL: número de semillas por legumbre; <sup>3</sup>NSP: número de semillas por planta

El largo y ancho de las legumbres y las semillas, también se afectó con la aplicación de EMS. Se observó una reducción significativa de estas variables, en la respuesta de las plantas procedentes de semillas tratadas con EMS (Tabla 10).

## Resultados y Discusión

No hubo diferencia significativa en el largo y ancho de las legumbres ni en el ancho de las semillas entre las distintas concentraciones de EMS (Tabla 10). En dependencia de la concentración de EMS, el largo de las semillas presentó diferencias significativas, pero no existió disminución continua de esta variable con el incremento del mutágeno (Tabla 10).

Tabla 10. Efecto de diferentes concentraciones EMS en el largo y ancho de legumbres y semillas de plantas de frijol cultivar DOR 364

Concentraciones de EMS (mM)	Legumbres		Semillas	
	Largo	Ancho	Largo	Ancho
	(mm)			
0	107,80 a	11,87 a	11,55 a	7,03 a
20	83,54 b	9,26 b	11,00 b	6,45 b
30	82,45 b	8,61 b	10,72 c	6,36 b
40	82,39 b	8,75 b	11,03 b	6,34 b
50	78,32 b	8,42 b	10,72 c	6,30 b
60	82,90 b	9,49 b	11,36 a	6,35 b
E.E. ( $\bar{y}$ ) $\pm$	1,80	0,34	0,18	0,06

Letras diferentes en una misma columna indican diferencia significativa a un  $\alpha < 0.05$  de acuerdo con la prueba no paramétrica Kruskal Wallis y el test de rango múltiple Scheffe

Similar a lo ocurrido con otros componentes del rendimiento previamente evaluados, el peso de legumbres por planta presentó una reducción significativa con la aplicación de 20 mM de EMS (Fig. 5). No hubo diferencias en esta variable entre el tratamiento con 20 mM y las demás concentraciones de EMS (Fig. 5). El peso de las semillas por legumbre y el peso de las semillas por planta, en correspondencia con el peso de las legumbres, también se afectaron a causa del tratamiento con EMS (Fig. 6 y 7). El peso de las semillas mostró diferencias numéricas en dependencia del tratamiento, pero no se detectaron diferencias estadísticas entre las concentraciones de EMS estudiadas (Fig. 6 y 7).

## Resultados y Discusión

El peso de 100 semillas es una variable ampliamente utilizada para diferenciar entre tratamientos teniendo en cuenta el rendimiento. En esta variable, no se observaron diferencias significativas entre el control y los tratamientos donde se aplicaron 20, 30 y 60 mM de EMS (Fig. 8). Una reducción significativa en el peso de 100 semillas ocurrió cuando las concentraciones de EMS incrementaron a 40 y 50 mM sin diferencia entre ellas (Fig. 8).

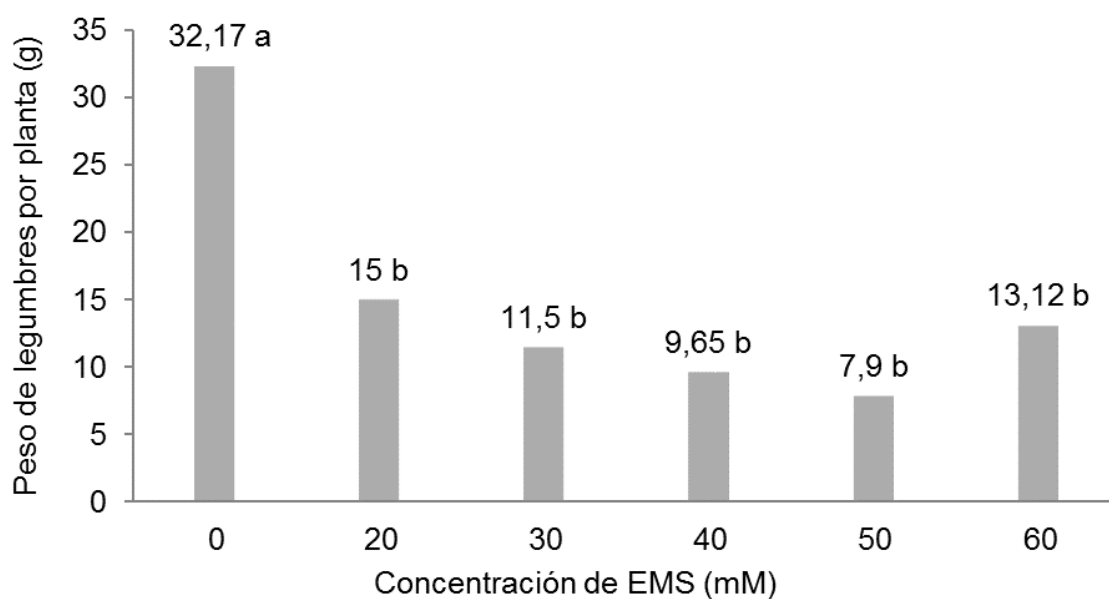


Figura 5. Peso de las legumbres cosechadas a partir de plantas tratadas con diferentes concentraciones de EMS

Medias seguidas de letras diferentes indican diferencia significativa a un  $\alpha < 0.05$  de acuerdo con la prueba no paramétrica Kruskal Wallis y el test de rango múltiple Scheffe

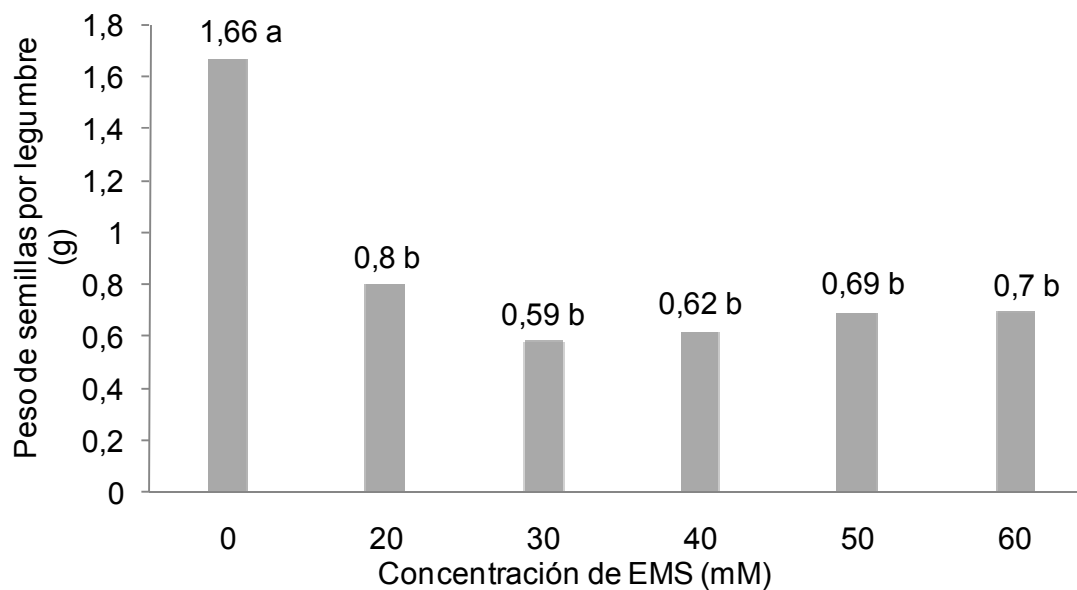


Figura 6. Peso de las semillas colectadas a partir de legumbres de plantas tratadas con diferentes concentraciones de EMS

Medias seguidas de letras diferentes indican diferencia significativa a un  $\alpha < 0.05$  de acuerdo con la prueba no paramétrica Kruskal Wallis y el test de rango múltiple Scheffe

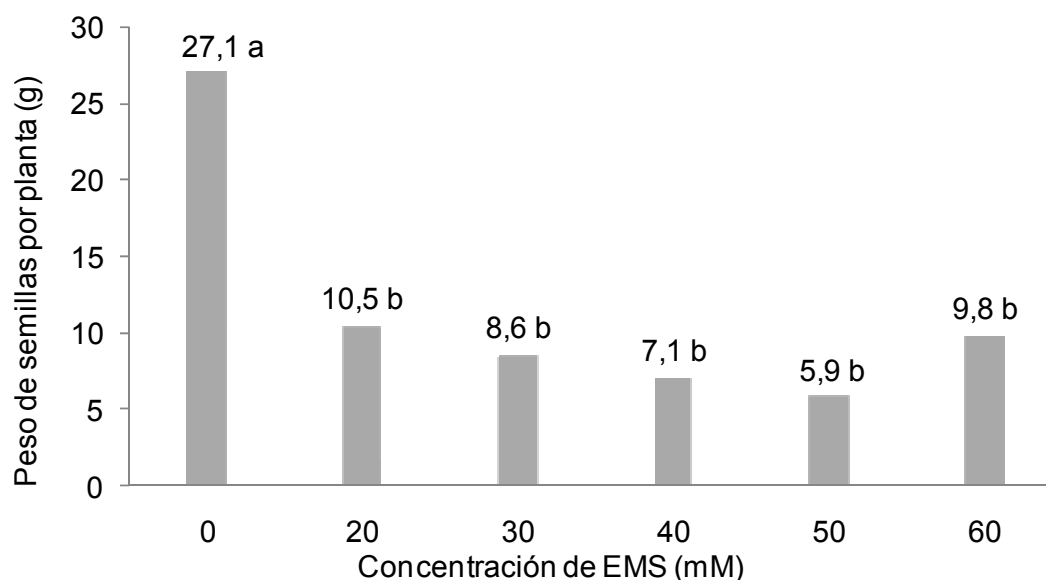


Figura 7. Peso de las semillas cosechadas a partir de plantas tratadas con diferentes concentraciones de EMS

Medias seguidas de letras diferentes indican diferencia significativa a un  $\alpha < 0.05$  de acuerdo con la prueba no paramétrica Kruskal Wallis y el test de rango múltiple Scheffe

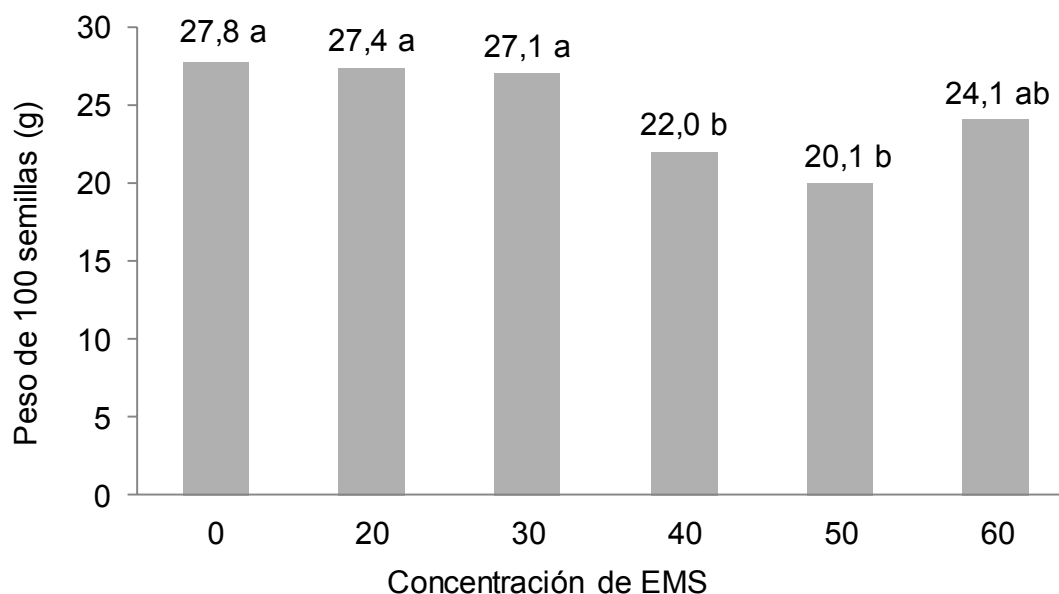


Figura 8. Peso de 100 semillas cosechadas a partir de plantas tratadas con diferentes concentraciones de EMS

Medias seguidas de letras diferentes indican diferencia significativa a un  $\alpha < 0.05$  de acuerdo con la prueba no paramétrica Kruskal Wallis y el test de rango múltiple Scheffe.

En esta investigación varios componentes del rendimiento fueron analizados, la mayoría de ellos solo permitieron diferenciar la respuesta entre el control y las plantas provenientes de semillas tratadas con EMS. De forma general, se observó una reducción del rendimiento a causa de la aplicación del mutágeno. Esta disminución del rendimiento, estuvo en correspondencia con la afectación que presentaron las plantas originadas de semillas tratadas con EMS, en el desarrollo vegetativo. El largo de las semillas y el peso de 100 semillas fueron las variables que permitieron detectar diferencias entre las concentraciones de EMS estudiadas. Sin embargo, en ambos casos encontramos una respuesta no esperada de las plantas procedentes de semillas tratadas con 60 mM de este mutágeno. Es de destacar, que en este tratamiento sobrevivieron pocas plantas y azarosamente quedaron distribuidas a razón de una planta por bolsa, por lo que el incremento en componentes del rendimiento, pudo estar influenciado por una

## Resultados y Discusión

---

mayor disponibilidad de nutrientes y que en estos casos las plantas no tuvieron afectación por la competencia.

En línea con los resultados de esta investigación, la afectación de los componentes del rendimiento en plantas de frijol provenientes de semillas tratadas con EMS, fue descrita previamente para el cultivar BAT 93 por Porch *et al.* (2009). Varios han sido los informes sobre la disminución de los componentes del rendimiento en plantas tratadas con diferentes agentes mutagénicos, aplicación de EMS en trigo (Naresh y Vaishali, 2016). En adición, la aplicación de radiaciones gamma provocó afectación en el número de legumbre por planta y las dimensiones de estas en cuatro genotipos de frijol: Rojo de Seda, Vaina Blanca, Chaparrastique y Ferromás (Alvarado Martínez *et al.*, 2014). Sin embargo, estos autores indicaron que el número de semillas por legumbre de las plantas irradiadas, en dos de los genotipos estudiados fue superior al de las plantas control. En el caso del peso de 100 semillas los resultados obtenidos en esta investigación son similares a los descritos en las investigaciones mencionadas.

### 5. Conclusiones

Después de analizar nuestros resultados arribamos a las siguientes conclusiones:

1. Basados en la germinación, desarrollo y crecimiento de las plantas, la sobrevivencia, los componentes del rendimiento y la frecuencia de variaciones morfológicas y fenológicas, de las variables evaluadas, 30 mM de EMS es la concentración apropiada para establecer una población de mutantes en el cultivar de frijol DOR 364. Con esta concentración se pudo generar el mayor número de cambios fenotípicos en una población relativamente pequeña y con alta eficiencia.
2. El metano sulfonato de etilo afectó la germinación, crecimiento y desarrollo de las plantas de frijol. El porcentaje de plantas germinadas y el área foliar jugaron un papel importante en la determinación de la concentración óptima de este mutágeno.
3. Se caracterizó la morfología y la fenología de las plantas provenientes de las semillas tratadas con metano sulfonato de etilo y se demostró la influencia del EMS en el retardo de las etapas fenológicas del frijol.
4. El metano sulfonato de etilo influyó sobre los componentes del rendimiento y la sobrevivencia total de las plantas provenientes de semillas tratadas.

### **6. Recomendaciones**

1. Emplear la dosis de 30 mM para crear poblaciones de mutantes de frijol a partir de la variedad DOR 364.
2. Aplicar este protocolo para la determinación de la concentración óptima en otras variedades de frijol.



### Bibliografía

Acostas J, Kelly J, Gepts P (2007) Prebreeding in Common Bean and Use of Genetic Diversity from Wild Germplasm. *Crop Science Society of America* 47: 44-59

Alvarado Martínez OA, Guevara Campos LA, Ramírez L, Yacoletty C (2014) Evaluación de materiales criollos y mejorados de frijol (*Phaseolus vulgaris*), irradiados con rayos gamma en la búsqueda de tolerancia a la sequía, San Andrés, municipio de Ciudad Arce, La Libertad (Doctoral dissertation, Universidad de El Salvador). 128 p

Auerbach C, Robson JM (1946) Chemical production of mutations. *Nature* 157:302

Bellucci E, Goretti D, Bittocchi E, Rossi M, Nanni L, Attene G, Papa R (2010) Nucleotide diversity analysis in wild and domesticated *Phaseolus vulgaris* L. from Mesoamerica. *International Congress on Legume Genetics and Genomic*

Bonny S, (2003) Why are most Europeans opposed to GMOs: Factors explaining rejection in France and Europe. *Electronic journal of Biotechnology* 6: 7-8

Borkar AT & More AD (2010) Induced flower colour mutations in *Phaseolus vulgaris* Linn through physical and chemical mutagens. *Advances in Bioresearch* 1: 22-28

Broughton WJ, Hernandez G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) model food legumes. *Plant and Soil*. 252: 55-128

CNIA-INTA. (1995) Variedad mejorada de frijol rojo DOR 364 Informe anual. Programa de frijol. Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria

Cooper JL, Till BJ, Laport RG, Darlow MC, Kleffner JM y col. (2008) Tilling to detect induced mutations in soybean. *BMC Plant Biol*. 8:9

Dhakshanamoorthy D, Selvaraj R, Chidambaram A. (2010) Physical and chemical mutagenesis in *Jatropha curcas* L. to induce variability in seed germination, growth and yield traits. *Rom.J. Biol-Plant Biol* 55:113-125

## Bibliografía

---

Emrani N, Harloff HJ, Gudi O, Kopisch-Obuch F & Jung C (2015) Reduction in sinapine content in rapeseed (*Brassica napus* L.) by induced mutations in sinapine biosynthesis genes. *Molecular Breeding* 35: 1-11

Esteras C. Picó M. (2008) Tilling: una herramienta para el estudio de la función de los genes y la generación de nueva variación. Universidad Politecnica de Valencia

FAO (2005) Tomado de: <http://www.fao.stat.org>. Consultado [9-11- 2015]

FAO (2014) Tomado de: <http://www.fao.stat.org>. Consultado [9-2- 2016]

Fernández FP, López M (1986) Etapas de desarrollo de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). CIAT.Colombia. p 34

González M (2011) Towards a Tilling platform for functionalgenomies in piel de Sapo melons. *BMC Research notes* 4:289

González M (2014) Desarrollo de una plataforma de Tilling en melón (*Cucumis melo* L.). Universidad Autónoma de Barcelona. p 264

Griffiths A (1998) Introducción al análisis genético. Editorial Mc Graw Hill, quinta edición. Madrid – España. Tomado de: <http://mutacionupelipb.webnode.es/agentes-mutagenicos/> . Consultado [26-10-2015]

Kamble GC & Petkar HJ (2015) Biotechnological Comparative Assessment of Mutagenic Agents on Morphological Traits and Phenology in Wild Chickpea. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 4:50-95

Knoll JE, Ramos ML, Zeng Y, Holbrook CC, Chow M y col. (2011) Tilling for allergen reduction and improvement of quality traits in peanut (*Arachishypogaea* L.). *BMC Plan Biol* 11:81

Kodym A, Afza R (2003) Physical and chemical mutagénesis. *Methods MolBiol* 236:189-204

## Bibliografía

---

Konzak CF, Nilan RA, Wagner J and Foster RJ (1965) Efficient chemical mutagenesis in the use of induced mutations in plant breeding. *Radiation Botany* (suppl.) 5: 49-70

Koorneef, M, Dellaert LW, Van der Veen JH (1982) EMS and radiation induce mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. *Mutat Res* 93: 109-23

Landge SP, Barve YY, Gupta RK, Bhadauria SS, Thakre RP & Pawar SE (2009) Development of B. Napus Canola Quality Varieties Suit-able for Indian Agro-climatic Conditions by Induced Mutations. In *Induced plant mutations in the genomics era. Proceedings of an International Joint FAO/IAEA Symposium*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. p 322-326

Lazarov R (1965) Coefficients for determining the leaf area in certain agricultural crops. *Sofia. Plant.Science*.2:2

Lightner J, Caspar T (1998) In J Martinez-Zapater, J Salinas, *Methods on Molecular Biology*, Vol 82. Humana Press, Totowa, NJ, pp 91-104

Ma Y, Bliss FA (1978) Seed proteins of common bean. *Crop. Sci.* 17: 431-437

Mangaiyarkarasi R, Girija M & Gnanamurthy S (2014) Mutagenic effectiveness and efficiency of gamma rays and ethyl methane sulphonate in *Catharanthus roseus*. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 3(5), 881-889

MINAGRI, (2015) Lista oficial de variedades comerciales 2015. Registro de variedades comerciales, Subdirección de Certificación de Semillas. Ministerio de la Agricultura, La Habana, 34p

Mora O. (1997) Origen e importancia del cultivo de la caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) *Rev. Fac. Agron. Maracay. Venezuela*. 23:225-234

Motto M, Soressi GP & Salamini F (1979) Growth analysis in a reduced leaf mutant of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica*, 28(3), 593-600

## Bibliografía

---

Mutant Variety Database, encontrado en el sitio oficial de la agencia internacional de la energía atómica (IAEA). Tomada de: <https://mvd.iaea.org/> .Consultado [20-1-2016]

Naresh Pratap S, Vaishali (2016) Characterization of wheat (*Triticum aestivum*) for stay green trait. Journal of Applied and Natural Science, 8:107-111

ONEI, Oficina Nacional de Estadística e Información (2016). Anuario estadístico de Cuba 2016

Pankhurst CE, Blair MW, Broughton WJ (2004) TILLING the beans. Proc. Phaseomics III Conf., University of Geneva

Pinheiro C, Baeta JP, Pereira AM, Dominguez H, Ricardo C (2007) Mineral elements correlations in a Portuguese germplasm collection of *Phaseolus vulgaris*

Porch TG, Blair MW, Lariguet, Patricia, GCPCE, Broughton WJ (2009). Generation of a Mutant Population for TILLING Common Bean Genotype BAT 93. J Amer Socfor Horti Sci 134: 348-355

Quintero E, Gil V, Guzmán L, Saucedo O (2004) Banco de germoplasma de frijol del CIAP: fuente de resistencia a la roya. Workshop Cuba-Bélgica, Santa Clara

SE Secretaría de Economía (2012) Informe Análisis de la Cadena de Valor del Frijol. Dirección General de Industrias Básicas de México

Sega GA (1984) A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. Mutat Res 134 (2-3): 113-42

Shirley BW, Hanley S, Goodman HM (1992) Effects of ionizing radiation on a plant genome: analysis of two *Arabidopsis* transparent testa mutations. PlantCell 4(3):333-47

Socorro A, Martín D (1989). Granos. Pueblo y Educación. La Habana, Cuba, 318 p

## Bibliografía

---

Soner SR and İlhan ÇM (2007) TILLING (Targetting Induced Local Lesions in Genomes) Technology for Plant Functional Genomics. Journal of Applied Biological Sciences 1: 77-80

Suárez Crestelo E (2006) I curso de capacitación en mejoramiento genético en arroz. La Habana, CU, II Arroz. Tomado de <http://agr.unne.edu.ar/fao/>. Consultado [26-10- 2015]

Till BJ, Cooper J, Tai TH, Colowit P, Greene EA, Henikoff S, and Comai L (2007) Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. BMC Plant Biol. 7:19

Till BJ, Reynolds SH, Weil C, Springer N, Burtner C y col (2004) Discovery of induced point mutations in maize genes by Tilling. BMC Plant Biol 4:12

Tomlekova NB (2010) Induced mutagenesis for crop improvement in Bulgaria. Plant Mutation Reports, 2: 4-27

US National Library of Medicine. Tomado de <http://toxnet.nlm.nih.gov/> .Consultado [20-1-2016]

Wu JL, Wu C, Lei C, Baraoidan M, Bordeos A. y col (2005) Chemical and irradiation induced mutants of indica rice IR64 for forward and riverse genetics. Plant Mol Biol 59 (1): 85-97