

D.L.
01
T(520)
C.3

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMIA

EVALUACION DE MUTACIONES INDUCIDAS POR RADIACION
GAMMA (Co-60) EN DOS VARIEDADES DE
Phaseolus vulgaris L.

TESIS

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA



EN EL GRADO ACADEMICO DE

LICENCIADO EN CIENCIAS AGRICOLAS

GUATEMALA, JULIO DE 1984

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR

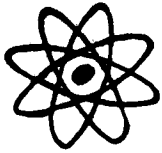
Dr. Eduardo Meyer Maldonado

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA

DECANO	Ing. Agr. César A. Castañeda S.
VOCAL 1º	Ing. Agr. Oscar René Leiva Ruano
VOCAL 2º	Ing. Agr. Gustavo A. Méndez G.
VOCAL 3º	Ing. Agr. Rolando Lara Alecio
VOCAL 4º	Prof. Heber Arana
VOCAL 5º	Prof. Leonel Gómez
SECRETARIO	Ing. Agr. Rodolfo Albizúrez Palma

TRIBUNAL QUE PRACTICO EL EXAMEN GENERAL PRIVADO

DECANO	Dr. Antonio A. Sandoval S.
EXAMINADOR	Ing. Agr. Carlos Orozco Castillo
EXAMINADOR	Ing. Agr. Manuel Martínez
EXAMINADOR	Ing. Agr. José M. Leiva P.
SECRETARIO	Ing. Agr. Carlos Fernández Pérez



DIRECCION GENERAL DE
ENERGIA NUCLEAR

GUATEMALA, C. A.

SA-030/84

27 de junio de 1984

Señor Decano de la
Facultad de Agronomía
Ing. Agr. César A. Castañeda S.
Universidad de San Carlos
Ciudad Universitaria, Zona 12

Señor Decano:

En atención al Nombramiento que emitiera la Decanatura para asesorar al Perito Agrónomo Samuel Salazar López en su trabajo de Tesis: "EVALUACION DE MUTACIONES INDUCIDAS POR RADIACION GAMMA (CO-60) EN DOS VARIEDADES DE Phaseolus vulgaris L."; por este medio hago de su conocimiento que ha sido concluida la asesoría y revisión final.

Por lo expuesto anteriormente, considero que la investigación - realizada por el Perito Agrónomo Salazar López, llena los requisitos de una Tesis de Grado para ser presentada y discutida en el Examen - General Público que deberá sustentar.

Atentamente,

Ing. Agr. José Luis Rueda Calvet
JEFE SECCION AGROPECUARIA

mlr

DIAGONAL 17 29-78, ZONA 11

GUATEMALA, GUATEMALA

TEL: 760679/82

APARTADO POSTAL 1421

TELEX: 5516 PETGUA GU



FACULTAD DE AGRONOMIA

Ciudad Universitaria, Zona 12.

Apartado Postal No. 1545

GUATEMALA, CENTRO AMERICA

Referencia	_____
Asunto	_____

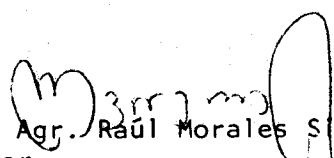
Junio 26, 1984

Señor Decano
Facultad de Agronomía
Ing. Agr. César A. Castañeda
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

Señor Decano:

En cumplimiento a la designación que de su oficina se me hiciera para asesorar al estudiante SAMUEL SALAZAR LOPEZ en su proyecto de tesis titulado: "EVALUACION DE MUTACIONES INDUCIDAS - POR RADIACION GAMMA (Co.⁶⁰) EN DOS VARIEDADES DE Phaseolus vulgaris L.", me permito informarle que he revisado dicho proyecto el cual considero llena los requisitos para ser presentado ante la Facultad como trabajo de tesis para la obtención del Título de Ingeniero Agrónomo por dicho estudiante.

Atentamente,


Ing. Agr. Raúl Morales Silva
Asesor.

*rmh

Guatemala,
Julio 28, 1984

HONORABLE JUNTA DIRECTIVA
HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

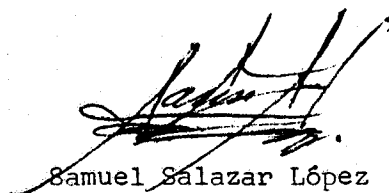
De acuerdo a las normas establecidas en la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración el trabajo de tésis titulado:

"EVALUACION DE MUTACIONES INDUCIDAS POR RADIACION
GAMMA (Co^{60}), EN DOS VARIEDADES DE Phaseolus --
Vulgaris L.".

Con el objeto de llenar el requisito previo a optar el Título de Ingeniero Agrónomo, en el Grado Académico de Licenciado en Ciencias Agrícolas.

Esperando vuestra aprobación, me suscribo

Atentamente,



Samuel Salazar López

*rmh

ACTO QUE DEDICO

A DIOS

A MIS PADRES:

**Gerónimo Salazar Véliz
Raquel López de Salazar**

A MIS HERMANOS:

**Amelia, Manases, Melquisedec, Anna, David,
Geron, Manolo.**

A MIS FAMILIARES

**A MIS AMIGOS Y
COMPAÑEROS DE TRABAJO.**

TESIS QUE DEDICO

A: Mi Patria Guatemala.

A: La Facultad de Agronomía.

A: Mis Asesores:
Ing. Agr. José Luis Rueda Calvet.
Ing. Agr. Raúl Morales Silva.

A MIS AMIGOS:

Eduardo Pretzanzin
Julio Carrión A.
George Ramírez
William Neftalí Florez Urizar
Gad Echeverría
Rafael Morales

A LAS FAMILIAS: Moreno Verganza
Arévalo Cardoza

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a las siguientes personas y entidades que contribuyeron a la realización de este tesis:

- A1 Ing. Agr. Raúl Morales Silva e Ing. Agr. José Luis Rueda Calvet, por su valiosa dedicación, sugerencias y orientación para llevar a término cada una de las partes de la presente investigación.
- A1 Ing. Agr. Edgar Martínez Tambito, por sus observaciones y cambios sugeridos para una mayor claridad de esta tesis.
- A1 Ing. César A. García G. y al Lic. Oscar Manuel Cobar Pinto, del Depto. de Química de la Facultad de Agronomía por su valiosa ayuda en los análisis de laboratorio.
- A1 Personal del laboratorio de ANACAFE, por su orientación en los análisis de laboratorio.
- A1 Catedrático de CALUSAC, Alejandro de la Rosa, por su encomiable dedicación brindada en la traducción de bibliografía en inglés.
- A1 Ing. Agr. Marco Tulio Aceituno e Ing. Mario Melgar por su colaboración en la elaboración de programas para computadora del análisis estadístico en el presente trabajo.
- A1 Lic. Luis Mejía y al Ing. Eduardo Pineda de la DGEN, por su valioso apoyo.
- A Imelda del Carmen Moreno, Febe Lam y Manuel Cosme, por su colaboración brindada en la realización del presente trabajo.
- A Todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron en la realización del presente estudio.

Por medio de la presente, quiero manifestar mi agradecimiento a la Dirección General de Energía Nuclear del Ministerio de Energía y Minas, por su invalorable ayuda a la realización del presente estudio, en cuanto al apoyo y utilización de las fuentes de irradiación e infraestructura.

INDICE GENERAL

Página

INDICE DE CUADROS

INDICE DE FIGURAS

RESUMEN

1.	INTRODUCCION	1
2.	HIPOTESIS	2
3.	OBJETIVOS	2
4.	REVISION DE LITERATURA	4
4.1	Los radioisótopos en la agricultura al servicio de la humanidad.	4
4.1.1	Alimentación.	5
4.1.2	Lucha contra los insectos.	5
4.1.3	Mutaciones.	5
4.1.4	Conservación de alimentos.	7
4.1.5	Recursos hídricos.	8
4.2	Radiaciones alfa, beta, gamma.	6
4.2.1	Qué es la dosis de irradiación.	9
4.3	Algunos aspectos sobre la sensibilidad y mutabilidad de dos var. de frijol por influencia de rayos gamma Co-60 y etil-metan-sulfonato (EMS).	9
4.4	Componentes de rendimiento y comparación de métodos de selección en frijol (<u>Phaseolus vulgaris L.</u>), después del tratamiento mutagénico (Rad. Gamma).	11
4.5	Diseño de mejoramiento por mutaciones en frijol.	12
4.6	Evaluación comparativa de frecuencias de mutación y comportamiento genético de mutantes inducidos por irradiación gamma aguda y crónica en frijol común (<u>Phaseolus vulgaris L.</u>).	13

	Página
4.7 Resúmenes sobre técnicas nucleares utilizadas en granos.	15
4.7.1 Consecuencia de la radiación gamma en el contenido de proteína en soya.	15
4.7.2 Inducción de mutaciones en el contenido de proteína de arroz (<u>Oryza sativa L.</u>).	16
4.7.3 Mejoramiento de la proteína en el frijol de soya (<u>Glycine max. L.</u>), usando mutaciones.	16
4.7.4 Experiencias del mejoramiento en frijol (<u>Phaseolus vulgaris L.</u>) y soya (<u>Glycine max. L.</u>) usando mutaciones inducidas.	17
4.8 Recomendaciones sobre métodos para determinación Nit. total en el mejoramiento de la proteína en su calidad y cantidad.	17
4.8.1 La digestion kjeldahl.	18
4.8.2 Combustión de Dumas.	18
4.8.3 Activación por alta energía de neutrones.	18
4.8.4 Activación por medio de energía baja de neutrones.	18
4.8.5 Activación o estimación con energía alta de rayos gamma.	19
4.8.6 Inducción de electrones por emisión espectroscópica.	19
4.8.7 Reacción del biuret.	19
4.9 Recomendaciones sobre métodos para determinación de aminoácidos en la calidad proteínica de la semilla.	20
4.9.1 Hidrolisis de proteínas para aminoácidos generales.	20
4.9.2 Pruebas de crecimiento microbiano.	20
4.9.3 Reacción con 2-cloro-3,5-dinitropiridina.	20
4.9.4 Determinación por medio de una capa fina en cromatografía (Electroforesis).	21
4.9.5 Reacción con ácido indolacético.	21

	Página
4.9.6 Combustión para el total de sulfuro.	21
4.9.7 Reacción con ácido glyoxílico para triptófano.	22
4.10 Fisiología de la planta.	22
4.11 Sugerencias para el fitomejoramiento en la calidad proteínica de leguminosas o gramíneas.	22
4.11.1 Lineamientos para colaboradores del programa cultivo de líneas mutantes.	23
4.12 Evaluaciones del fitomejoramiento para proteína de algunas var. brasileñas usando radiación gamma.	25
 5. METODOLOGIA	 26
5.1 Localización de las generaciones M_1 , M_2 , M_3 .	26
5.2 Análisis del suelo.	26
5.3 Fertilización.	27
5.4 Tratamiento e irradiación.	27
5.5 Materiales genéticos	27
5.6 Siembra.	29
5.6.1 Preparación del terreno.	29
5.6.2 Cultivo generación M_1 .	29
5.6.4 Cultivo generación M_3 .	30
5.7 Metodología de selección.	30
5.7.1 Selección de mutantes morfológicos.	31
5.7.2 Selección individual de mutantes no morfológicos.	31
5.7.3 Selección Individual en la generación M_3 .	32
5.8 Cosecha.	32
5.8.1 Procedimiento cosecha M_1 .	32
5.8.2 Procedimiento cosecha M_2 .	32
5.8.3 Procedimiento cosecha M_3 .	33
5.9 Análisis de laboratorio.	33
5.9.1 Análisis de laboratorio posibles.	33
5.10 Diseño experimental	33
5.10.1 Modelo estadístico.	33
5.10.2 Análisis estadísticos del estudio.	34

	Página
5.10.3 Distribución de los tratamientos de las generaciones M_1 , M_2 , M_3 .	34
5.10.4 Distribución específica de la generación M_2 .	36
6. RESULTADOS Y DISCUSION	40
6.1 Efectos anatómicos y fisiológicos en la generación M_1 .	41
6.1.1 Alteraciones y características genéticas de las variedades en estudio.	41
6.1.2 Bajo porcentaje de germinación en el campo, letalidad, reducción en crecimiento y desarrollo de las plantas.	46
6.1.3 Sobrevivencia, esterilidad, peso de 100 semillas, número de semillas por planta y manchas cloróticas.	47
6.1.4 Consideraciones finales.	50
6.2 Cambios genéticos en la generación M_2 .	53
6.2.1 Mutaciones clorofilicas.	53
6.2.2 Mutaciones y cambios morfológicos en la M_2 .	55
6.2.3 Consideraciones específicas sobre caracteres genéticos, morfológicos, proteínicos y de selección en inducción de mutaciones.	57
6.3 Variación en proteína para las muestras analizadas.	62
6.3.1 Evaluaciones en generación M_3 .	63
7. CONCLUSIONES	65
8. RECOMENDACIONES	67
9. APENDICES	69
9.1 <u>Apéndice No. 1</u> : Guía de cuidados técnicos y culturales, calendarizados durante las generaciones M_1 , M_2 , y M_3 .	70

	Página
9.2 <u>Apéndice No. 2:</u> Metodología micro-kjeldahl, resultados de análisis proteínico.	71
9.3 <u>Apéndice No. 3:</u> Cuadros de efectos fisiológicos, generación M ₁ .	76
9.4 <u>Apéndice No. 4:</u> Cuadros generales de análisis estadístico; Andevas, Pruebas de Tukey y análisis de regresión.	81
10. BIBLIOGRAFIA	85

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro No. 1: Comportamiento en la generación M_2 de var. de frijol común (<u>Phaseolus vulgaris</u> L.), tratados con mutágenos físico-químicos.	
Cuadro No. 2: Porcentaje de mutaciones clorofilicas y morfológicas, inducidas por irradiación aguda y crónica.	15
Cuadro No. 3: Análisis químico del suelo.	26
Cuadro No. 4: Irradiación aguda en lotes de semilla.	27
Cuadro No. 5: Características de componentes de rendimiento, datos en monocultivo, var. Jutiapán.	28
Cuadro No. 6: Características de componentes de rendimiento, datos en monocultivo, variedad San Martín.	28
Cuadro No. 7: Número de semillas por planta en M_1 .	43
Cuadro No. 8: Número de plantas sobrevivientes a la floración.	43
Cuadro No. 9: Rendimiento que se obtuvo en M_1 , de la variedad Sn. Jutiapán, en número de semillas.	44
Cuadro No. 10: Peso en gramos de las semillas de la variedad Jutiapán, M_1 .	45
Cuadro No. 11: Rendimiento que se obtuvo en M_1 , de la variedad Sn Martín, en número de semillas, y peso de 100 semillas en gramos.	48

	Página
Cuadro No. 12: Peso en gramos de las semillas de la variedad de San Martín, M ₁ .	49
Cuadro No. 13: Individuos morfológicos por tratamiento analizados para proteína, Var. Jutiapán, M ₂ .	58
Cuadro No. 14: Individuos a análisis de laboratorio, incluyendo mutantes anormales, M ₂ .	59
Cuadro No. 15: Cambios morfológicos por tratamiento, analizados para proteína var. San. Martín. M ₂ .	59
Cuadro No. 16: Mutaciones clorofilicas en M ₂ , variedades Jutiapán y Sn. Martín.	60
Cuadro No. 17: Resultados estadísticos para precocidad M ₂ .	60
Cuadro No. 18: Análisis de proteína usando el método micro-kjeldahl, para 208 muestras seleccionadas.	73
Cuadro No. 19: Germinación de la variedad Jutiapán en el campo, M ₁ .	76
Cuadro No. 20: Altura de plantas de la variedad Jutiapán, M ₁ , (45 días d.s.).	77
Cuadro No. 21: Floración de la var. Jutiapán, M ₁ .	78
Cuadro No. 22: Germinación de la variedad San Martín en el campo, M ₁ .	79
Cuadro No. 23: Altura de plantas de la variedad San Martín en M ₁ .	80

Cuadro No. 24:	Cuadros generales de andevas M_1 , M_2 , M_3 .	Página 81
Cuadro No. 25:	Cuadros generales de análisis de medias por la prueba de Tukey de M_1 y M_2 .	83
Cuadro No. 26:	Análisis de regresión-correlación, M_2 .	84

INDICE DE FIGURAS

Figura No. 1:	Distribución de tratamientos en el campo, generación M_1 .	35
Figura No. 2:	Distribución del diseño en el campo de la generación M_2 .	37
Figura No. 3:	Líneas de mutantes morfológicos, var. Jutiapán, generación M_3 .	38
Figura No. 4:	Siembra de la selección individual de mutantes no morfológicos, generación M_3 .	39
Figura No. 5:	Rendimiento en semillas cosechadas de M_1 .	51
Figura No. 6:	Efectos en la germinación de la generación M_1 .	52
Figura No. 7:	Comparación de mutaciones inducidas (Co-60) y cambios morfológico, en M_2 .	56
Figura No. 8:	Comparación de germinación en M_3 de selección No Morfológicos.	61
Figura No. 9:	Cambios químicos.	64

RESUMEN

Al existir buena variación genética en el material con que se trabaja, el mejorador tiene mayor ventaja en obtener las características que busca; de ahí la importancia de evaluar la técnica de inducción de mutaciones como herramienta auxiliar en la producción de cambios artificiales heredables, que sirvan en la investigación de fitomejoramiento o en trabajos aplicados.

En síntesis los objetivos del presente trabajo fueron evaluar diferentes dosis de rayos gama de Co-60, siendo 0, 8, 15, 20 y 30 kR, para identificar aquéllas que produjeron más mutaciones y letalidades cerca del 20%. Así como realizar selección de material que presentará variantes en cuanto a precosidad, tipo de hoja, grosor del tallo, coloración del grano y otras mutaciones morfológicas. También reportar las diferencias en sensibilidad a la radiación de las variedades tratadas, usando como criterio los efectos fisiológicos dados en M_1 . Realizar selección y análisis de laboratorio para contenido de proteína en individuos de las dos variedades irradiadas, con el fin de recuperar individuos de frijol (Phaseolus vulgaris L.), con un mayor potencial en el mejoramiento de la calidad y cantidad proteínica, resultados que pueden servir de apoyo a estudios más amplios en trabajos para mejorar la calidad nutricional del frijol.

Los tratamientos (dosis kR) se aplicaron en dos variedades de Phaseolus vulgaris L. (var. Jutiapán y var. Sn. Martín), irradiando lotes de semillas dentro de un aparato que tiene una fuente de Co-60, el cual está en la Dirección General de Energía Nuclear del Ministerio de Energía y Minas (DINARD 5L).

En las generaciones M_1 , M_2 los tratamientos fueron dispuestos en el campo en parcelas experimentales de bloques al azar, con el fin de disminuir los efectos de la heterogeneidad ambiental, aunque se recomienda como no necesario en el estudio. En la generación M_1 , usando parámetros biométricos, se evaluaron los cambios anatómicos y fisiológicos producidos por las distintas dosis de irradiación. En la generación M_2 , se siguieron dos tipos de selección: una para recuperar individuos con cambios estructurales o morfológicos y otra realizada al azar. En la generación M_3 se observó la heredabilidad de los cambios morfológicos mostrados en individuos provenientes de M_2 , y a la vez se multiplicó el material seleccionado al azar. De estas plantas se escogieron

las más representativas y se llevaron a análisis de proteína, para luego hacer la selección conveniente.

De los resultados se concluye que se debe partir de materiales genéticos mejorados y a la vez es necesario llevar este material a una selección de pureza varietal, antes de someterlo a irradiación. La irradiación aguda en frijol provocó en la M_1 los efectos fisiológicos y anatómicos que se manifiestan sólo en esta generación, como reducción en altura de planta, disminución del número de semillas por dosis de tratamiento, escasa sobrevivencia a altas dosis, esterilidad, etc. Las dosis que alcanzaron un 20% de letalidad en M_1 , son 20 y 30 kR, especialmente en la var. San Martín. La dosis de 30 kR provocó un 34% de disminución en altura de planta en la var. San Martín y menor emergencia en el campo para ambas variedades, lo que indica que se pueden aumentar las dosis si se compara con los efectos esperados para un LD_{50} o un GR_{30-50} . También en 20 y 30 kR se observó menor floración en la var. Jutiapán. comparando el testigo con las dosis altas, en cuanto al peso de 100 semillas en M_1 , se dio una reducción del 58% para la var. Sn. Martín y cerca del 50% en la var. Jutiapán.

Se concluye que la metodología de selección que se usó en la M_1 , no es la más adecuada en trabajos con inducción de mutaciones (Bulk/trat.), no siendo necesario usar bloques al azar en M_1 y M_2 , pero sí es recomendable hacer ensayos replicados de la M_4 en adelante. De los resultados obtenidos en la M_2 , se encontró que la var. Jutiapán mostraba una mayor sensibilidad mutagénica en el No. de cambios clorofilicos/100 plantas. La var. Jutiapán mostró más mutaciones y cambios morfológicos en la M_2 , pero se pudo constatar que la mayoría de cambios obtenidos en la M_2 no son mutaciones sino alteraciones debidas a efectos ambientales en general. Sin embargo se obtuvieron buenos resultados para precocidad y algunos mutantes de hoja ancha son reportados.

Aunque se reconoce que el contenido proteínico está altamente influenciado por el ambiente es conveniente indicar que en la var. Jutiapán, los materiales irradiados tuvieron un mayor rango de contenido proteínico (del 16% al 26%) que el testigo (del 20% al 23% para las dos variedades analizadas).

Finalmente se recomienda que, si el propósito es el mejoramiento nutricional del frijol u otro cultivo de grano, en grabajos posteriores se utilice la metodología de progenies u otras convenientes.

1. INTRODUCCION

Entre los cultivos de mayor importancia para la alimentación de nuestro país, se encuentra el frijol (Phaseolus vulgaris L.) (7), por ser una leguminosa de buen valor proteínico, lo cual eleva su importancia en el área rural, donde se consume más que la carne en dietas combinadas con otros granos (7,16).

Se conoce también la buena existencia de variabilidad de esta leguminosa en el área guatemalteca. Sin embargo en tanto se tenga una gran variabilidad, es posible utilizar nuevas técnicas auxiliares por ejemplo en características como bacteriosis, virus o para mejoramiento nutricional y entre éstas técnicas se dispone actualmente de la inducción de mutaciones con sustancias químicas y el empleo de los radioisótopos en la investigación agrícola (rayos gamma, Co-60).

En nuestro medio agrícola, la nueva técnica de inducción de mutaciones por medio de radiación gamma (34), puede convertirse en el futuro, en una herramienta práctica del mejoramiento, no sólo en frijol sino también en otros cultivos, con relación a la cantidad y calidad de la proteína, enfermedades, etc. (8).

En el presente estudio, la inducción de mutaciones por radiación Gamma (30), se hará sometiendo a un bombardeo radioactivo la semilla de dos var. de frijol común, haciendo uso adecuado del radioisótopo denominado Co-60, como fuente de irradiación aguda para los distintos tratamientos en la variedades de frijol: Sn Martín y Jutiapán (18).

El material irradiado se evaluó en el campo en un mismo ambiente, durante tres generaciones (M_1, M_2, M_3), en las que se estudió las variantes de caracteres morfológicos y fenológicos, luego se llevó a los individuos seleccionados a análisis de laboratorio, con el fin de recuperar a aquéllos que muestren mejores resultados en el porcentaje de proteína, como índices del mejoramiento de la calidad proteica en el Phaseolus vulgaris L. (5,20).

2. HIPOTESIS

Hipótesis a)= La irradiación de semillas de frijol con Co-60, causará mutaciones morfológicas y fisiológicas que incrementarán la variabilidad genética original de dichas semillas. Por lo tanto será posible efectuar selección con el propósito de obtener genotipos con caracteres morfológicos o proteicos positivos.

Hipótesis b)= Diferentes dosis de irradiación con cobalto-60 tendrán diferentes efectos sobre las semillas de frijol, existiendo una dosis que producirá un alto índice de mutaciones con mínimo efecto de letalidad.

3. OBJETIVOS

Objetivos Generales:

- a.- Hacer selección en base a la variabilidad genética, producida por las mutaciones inducidas, sobre dos variedades de Phaseolus vulgaris L., sometidas a irradiación aguda (Co-60), (15,30).
- b.- Comprobar que el empleo de las radiaciones es útil en el mejoramiento de los cultivos, además incluir en la revisión de literatura, información sobre usos de los isótopos en la agricultura, como en otras ciencias (27).

Objetivos Específicos:

- a.- Evaluar la dosis de Krads que se usarán para identificar aquéllas que produzcan más mutaciones y letalidades del 20% (42).
- b.- Realizar selección y análisis de laboratorio de proteína en las dos

variedades irradiadas, con el fin de recuperar individuos de frijol (Phaseolus vulgaris L.), con un mayor potencial en el mejoramiento de la - calidad y cantidad proteínica. Resultados que pueden servir de apoyo a estudios más amplios sobre el fitomejoramiento proteico y nutricional; del frijol, por medio de mutaciones inducidas usando radiación, en el agro guatemalteco (3,35).

- c.- Hacer selección de material que presente variantes en cuanto a precosidad, tipo de hoja, grosor del tallo, coloración del grano o mutaciones morfológicas usando técnicas convencionales (19).
- d.- Impulsar el uso de los radioisótopos en la investigación agronómica y nutricional que en futuro se realice en el país.
- e.- Reportar las diferencias en sensibilidad, que las variedades tratadas muestren ante las diferentes dosis de irradiación (Irradiación aguda) (18,21).

4. REVISION DE LITERATURA

En nuestro país estamos actualmente ingresando al grupo de naciones que utilizan la energía atómica con fines pacíficos, especialmente en la agricultura, la cual necesita diversificar su tecnología, para hacer más eficiente la economía agrícola nacional. De acá que es necesario tener conocimientos básicos o relacionados con esta nueva técnica y sus múltiples aplicaciones en la agricultura, tomando también en cuenta que se hace necesaria la investigación de estos aspectos en el agro guatemalteco. Así con el fin de dar un panorama de sus beneficios, la presente revisión de literatura, muestra diversos estudios sobre el uso de radiaciones en el mejoramiento nutricional de granos y a la vez reúne información general sobre el uso de la energía atómica al servicio del ser humano.

4.1 Los Radioisótopos en la Agricultura al servicio de la humanidad

La energía atómica es, para la mayoría, los reactores nucleares. Pocos saben que hay otro aspecto de esa energía que ha transformado su vida cotidiana en los últimos 20 a 30 años. En 1957 se creó el Organismo de Energía Atómica y uno de sus objetivos iniciales más importantes era fomentar el empleo de los radioisótopos y de las fuentes de irradiación en la investigación, la industria, la agricultura y la medicina. Hoy son contadas las personas que aprecian hasta qué punto se ha conseguido ese objetivo. ¿Cuántas saben, por ejemplo, que los radioisótopos y la irradiación controlada se emplean para mejorar los cultivos de plantas alimenticias, para conservar alimentos, para descubrir aguas subterráneas, para esterilizar productos médicos, para analizar hormonas, para radiografiar tuberías en el control de procesos industriales y en el estudio de la contaminación ambiental?

La primera aplicación "práctica" de una sustancia radioactiva como "trazador" la realizó George de Hevesy, uno de los primeros precursores del empleo de los materiales radioactivos, principalmente para investigaciones biológicas y químicas (33,35).

4.1.1 En alimentación

Existen diferentes métodos para aumentar el rendimiento de un cultivo, utilizando radiación atómica, que producen variabilidad con el fin de:

- a. Producir variedades de plantas alimenticias de elevado rendimiento y con alto contenido de proteínas.
- b. Producir variedades resistentes a las enfermedades y al clima o variedades precoces.
- c. Localizar y utilizar con eficiencia los recursos hídricos.
- d. Determinar la absorción de abonos y función de
- e. Combatir o erradicar las plagas.
- f. Evitar las pérdidas de las cosechas durante el almacenamiento.
- g. Mejorar la productividad y sanidad de los animales domésticos.

4.1.2 Lucha contra los Insectos

Se ha estimado que, a escala mundial, las pérdidas de las cosechas, ocasionadas por los insectos pueden ascender al 1% de la cosecha total, cantidad igual al total de la cosecha de un país como los Estados Unidos de América o la Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas. Por ello la técnica de los insectos estériles (TIE), puede ser útil, como se ha comprobado en nuestro país, en trabajos realizados por MOSCAMED. La TIE consiste en administrar dosis esterilizantes de radiación ionizante a insectos machos criados en laboratorio (35).

4.1.3 Mutaciones

En todas las partes del mundo se han realizado muchos millares de experimentos durante los últimos 30 años incluyendo actualmente a Guatemala para obtener mutantes de semillas por irradiación con el fin de conferirles las propiedades deseadas. Esto es posible porque la irradiación, se aplica adecuadamente, cambia en general solamente ciertos aspectos de los caracteres genéticos de la planta. No obstante, antes de obtener los resultados deseados los progresos pueden ser lentos, pues existe gran número de variables y se debe investigar todas las var., producidas. No obstante, el método puede

producir los resultados deseados con mucha mayor rapidez que los métodos tradicionales en fitotécnica, sin sustituir a éstos sino como una herramienta útil. Por este método se han producido un considerable número de nuevas variedades de plantas.

Hasta ahora se han cultivado en gran escala más de 200 variedades de plantas mutantes, las cuales abarcan una zona considerable de las tierras cultivables (28,33,35).

Un buen ejemplo del éxito obtenido con la fitogenética mutacional es la obtención de Hungría de una nueva variedad de arroz resistente al añublo que es una enfermedad muy nociva para el cultivo.

Se probó primeramente una variedad francesa, Cesariot, que se sabía que poseía una buena resistencia a ésta y otras infecciones. No obstante, la variedad Cesariot maduraba muy tardíamente en Hungría y en los veranos frescos no producían el rendimiento adecuado o fallaba por completo. La finalidad de los cambios genéticos necesarios en este caso está clara. Era necesario conseguir mutaciones que experimentasen una maduración precoz, pero sin perder la resistencia al añublo.

Así mediante estudios mutacionales relativamente sencillos se resolvió el problema inmediato: Se obtuvo una variedad mutante de arroz de maduración precoz, resistente a las enfermedades, que podía utilizarse directamente y que también era útil para ulteriores cruces genéticos. Este mutante se puso en circulación para su empleo a escala comercial en 1976 con el nombre de "Nucleory-2A".

En muchos países existen en cultivo docenas de otros mutantes igualmente logrados. Por ejemplo, los cereales de tallo corto y rígido de alto rendimiento (en los que los abonos producen mayor cantidad de grano en lugar de hacer crecer los tallos o las hojas), que se utilizan en la llamada "Revolución verde".

La única fuente de esencia de menta en los Estados Unidos era la variedad Mitcham antes de que contrajese la enfermedad denominada Verticillum. Todos los intentos de producir variedades resistentes a la enfermedad mediante la cría de híbridos fracasaron por ocasionar alteraciones inaceptables en el sabor de la esencia. Mediante la fumigación del suelo y la limitación de los cultivos se consiguió un éxito parcial en la lucha contra la enfermedad. Pero, por

irradiación se obtuvo un mutante resistente a la infección que conservaba el sabor original de la esencia de menta. Actualmente este mutante es de uso general y la economía conseguida mediante su introducción se eleva a millones de dólares anuales.

En varios países se han producido satisfactorios mutantes de cebada. De hecho, el 92% de la superficie cultivada con cebada en Checoslovaquia hoy día se siembra con mutantes inducidos por irradiación y con descendientes procedentes de cruces con las variedades normales.

4.1.4 Conservación de Alimentos

En un mundo que sufre hambre es un despilfarro excesivo permitir la pérdida del 25 al 30% de las cosechas debido al deterioro causado por los microbios y las plagas, lo que es todavía más lamentable es que esas pérdidas son aún mayores en los países en desarrollo. Muy a menudo, la prolongación del período de conservación de ciertos alimentos (tales como el pescado y la fruta) durante algunos días es suficiente para evitar su pérdida. Evitar el deterioro de alimentos es de capital importancia, especialmente en países de clima cálido y húmedo.

Para la irradiación de alimentos se distinguen cuatro niveles de intensidad:

- a. Dosis de irradiación suficientes para reducir el número de organismos viables, este método se denomina "radappertización" (de Nicholas Appert, que inventó el enlatado en 1960).
- b. Dosis de irradiación suficientes para reducir el número de microorganismos patógenos específicos no esporógenos viables, este método se denomina "radacidación".
- c. Dosis de irradiación suficiente para mejorar las propiedades de conservación al causar una reducción considerable del número de microorganismos específicos viables causantes de descomposición; este método se denomina "radurización".
- d. Dosis de irradiación suficiente para detener los procesos fisiológicos más bien que los microbiológicos. A este grupo pertenecen la inhibición de la germinación de las patatas y el retraso en la maduración de los frutos mediante dosis relativamente pequeñas de irradiación.

4.1.5 Recursos Hídricos

En los estudios sobre las aguas superficiales, los métodos nucleares sirven para medir la escorrentía procedente de las lluvias y de la nieve, el caudal de ríos y otras corrientes, las pérdidas de agua de lagos, depósitos y canales, y la dinámica de lagos y depósitos. Hoy día no cabe prácticamente concebir la realización de estudios hidrológicos sobre las aguas subterráneas sin recurrir a las técnicas isotópicas. Estas técnicas son sencillas y de aplicación relativamente rápida (33).

4.2 Radiaciones Alfa, Beta, Gamma

El hombre ha estado sometido siempre a las radiaciones naturales. Las ha recibido del sol y del espacio extraterrestre, de las sustancias radioactivas naturales que hay en nuestro planeta, de las estructuras en que habitamos, y de los alimentos y del agua que consumimos. Nuestro propio cuerpo es radioactivo (radiación de fondo) (35).

El término "radiación" tiene un sentido muy amplio y aunque abarca emisiones como la luz y las ondas de radio, se suelen emplear por lo general para designar a la radiación "ionizante", es decir, la que puede producir partículas cargadas (iones) cuando incide en una sustancia.

Hay varios tipos de radiaciones ionizantes: alfa, beta, gamma, rayos X y neutrones, y cada una de estas radiaciones posee características diferentes. Los átomos que emiten radiaciones se denominan radioactivos.

La radiación alfa, consiste en partículas de carga positiva y la emiten elementos que se dan en la naturaleza, como el uranio y el radio, y también elementos artificiales. La radiación alfa no penetra más allá de la superficie de la piel y la puede frenar por completo una hoja de papel.

La radiación beta, consiste en electrones, es más penetrante que la radiación alfa y puede penetrar de uno a dos centímetros en el agua o en los tejidos humanos. Basta para frenarla con lámina de aluminio de unos pocos milímetros de espesor.

La radiación "gamma", puede ser muy penetrante y atravesar un cuerpo humano de parte a parte, pero queda casi completamente absorbida por una capa de hormigón de un metro de espesor.

Los rayos X constituyen una forma de radiación penetrante más familiar. Los neutrones pueden ser también muy penetrantes (27).

4.2.1 ¿Qué es la dosis de Irradiación?

Recibir una dosis de irradiación significa que uno ha estado expuesto a las radiaciones, es decir, que ha absorbido energía radiante, ahora bien, como ocurre con el café, el coñac o los medicamentos, sus posibles efectos sólo se podrán evaluar si se sabe la cantidad de irradiación recibida y la tasa y forma en que se ha recibido. Por ejemplo, uno puede beber un vaso de Whisky sin sentir ningún efecto, pero ¿qué pasará si uno bebe diez vasos? Para conocer el resultado, hay que saber entre otras cosas si los diez vasos se bebieron en el espacio de veinte minutos o de veinte días.

La radiación gamma de Co-60, normalmente utilizada tiene una energía de un millón de electrones voltio ($1^{\circ} 33$ Miu) y una longitud de onda de 10^{-10} cm.

La unidad especial de dosis absorbida para cualquier tipo de material es el rad, donde 1 rad, representa la absorción de 100 ergios de energía radiante por gramo de material o igual a 10^{-2} joule/Kg. (32,35).

En relación a la unidad especial de exposición a la radiación (emitida) se indica que es el roentgen (R), donde $1 R = 2.85 \times 10^{-4}$ coulomb/Kg aire. Para fines prácticos y trabajando con material biológico el sector de conversión de rad a roentgen es casi 1 siendo $f = 0.965$, por lo tanto se puede tomar una dosis de rad equivalente a roentgen, pero se estima más conveniente utilizar la terminología roentgen (34,22).

4.3 Algunos aspectos sobre la Sensibilidad y Mutabilidad de dos variedades de Frijol por influencia de rayos Gamma Co-60 y Etil-metan sulfonato (EMS).

Comúnmente, la sensibilidad según Yankulov (1980), se expresa con la detención del crecimiento y el desarrollo, y/o la disminución de la fertilidad y del número de plantas sobrevivientes. Este estudio se determinó basándose en el porcentaje de plantas sobrevivientes en la primera generación, M_1 (42).

En la generación siguiente M_2 , fueron sembradas todas las semillas de

las plantas sobrevivientes, calculándose la mutabilidad en función del porcentaje de mutaciones clorofílicas producidas, ya que por estudios realizados se sabe que éstas aparecen con una frecuencia similar a la de otros tipos de mutaciones (Kawai 1969). Posteriormente se realizó el análisis bioestadístico de los datos obtenidos (9).

Material Genético. Como material básico se utilizaron las variedades de frijol negro Selección 11 y Bolita 41 (9).

La obtención de una correlación entre la cantidad de mutaciones inducidas y algunos de los caracteres que manifiestan la sensibilidad de las plantas de una variedad, podría orientar a los mejoradores en la elección de la dosis más efectiva de los agentes mutagénicos se recomienda, en las dos variedades, el incremento de las dosis utilizadas provocó la disminución del porcentaje de plantas sobrevivientes.

En el análisis de la misma, resulta evidente que el porcentaje de dichas mutaciones aumentó con el incremento de la dosis, mostrando la variedad Bolita 41 un porcentaje mayor de mutaciones con ambos mutágenos (42).

Se pudo establecer una correlación inversa entre la supervivencia y las mutaciones clorofílicas, siendo los valores de r : -0.94^{++} y -0.87^{++} para los mutágenos químicos y físicos, respectivamente, una relación similar fue establecida por CONSTANTIN (1968), en un estudio acerca de la influencia de la humedad de semillas de algodón sobre estos dos caracteres.

Para nuestro interés, el cambio de efectividad en un mutágeno con el aumento de la dosis tiene gran importancia en los trabajos de mutagénesis, porque eso determina su efectividad biológica.

RAMULU (1971), observó en sorgo, una dependencia inversamente proporcional entre la efectividad de los mutágenos y la dosis (14,53).

La efectividad menor de las dosis altas se debe al hecho de que con ellas el porcentaje de plantas que mueren aumenta rápidamente, por lo que se pierden muchas mutaciones.

Esto indica que el esfuerzo de los investigadores por aumentar el porcentaje de mutaciones mediante altas dosis de agentes mutagénicos, está limitado biológicamente en forma específica por cada especie y variedad (52).

4.4 Componentes de Rendimiento y comparación de Métodos de Selección en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) después del tratamiento mutagénico (Radiación Gamma Co-60)

En este experimento se usó la variedad de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Canario 107, con dos contenidos de humedad (9.1% seco y 20% húmedo), al momento de la aplicación de la dosis de radiaciones gamma (Co-60), (0,4,12, y 20 kr), a razón de 600 semillas por dosis (24).

Se usó la siguiente Terminología:

- S= materiales seleccionados por vigor.
- A= materiales seleccionados al azar.
- Ts= testigo seco.
- Th= testigo húmedo.
- rh= irradiado húm.

Se pudo observar que la mayoría de estas medidas en los tratamientos con irradiación e inclusive algunos tratamientos del testigo, S, Ts A Th y S Th, son superiores a la del testigo seco; aunque no hubo diferencias significativas dentro de las mismas, estos datos Jalil y Yamaguchi (1965) (44).

Para el carácter peso de cien semillas, se observó que solamente una media del tratamiento S 4000 rs fue inferior a la media del testigo seco, esto está acorde parcialmente con los resultados de Rawlings, Hanway y Gardner (1958), los cuales obtuvieron que la media de peso de cien semillas de todos los tratamientos irradiados fueron mayores a la media de los testigos, no siendo así para los otros caracteres (23). Confirmación al incremento de las medias de la segunda a la cuarta generación ha sido señalado por Trujillo y Ríos (1972) en trigo, después del tratamiento de la semilla con Ems. El comportamiento de las medias, sin embargo, en la segunda generación después del tratamiento mutagénico depende también de las dosis de radiación aplicadas y los caracteres en estudio (Mellado, Trujillo y Méndez, 1972) (23,45).

Con el propósito de evaluar una selección temprana directa en base al vigor de las plantas y una selección completamente al azar se establecieron las relaciones de ambos grupos, los valores de F de las relaciones de los seleccionados entre los de al azar son mayores pero al considerarlos en su conjunto, no se presenta una diferencia notable de un grupo con respecto al otro (31).

Esto muestra que es muy arriesgado realizar selecciones directas tempranas, ya que los materiales aparentemente vigorosos y rendidores, se encuentran en gran estado heterocigótico y bajo la influencia ambiental y que, por lo tanto, es necesario considerar en general a un gran número de individuos con diferentes expresiones fenotípicas y realizar las selecciones directas en generaciones posteriores a partir de M_3 , donde puede tenerse la mayor seguridad de homocigosis, igualdad de competencia ambiental y bajo consideración de los diferentes caracteres involucrados en el rendimiento, para lo cual es necesario el conocimiento previo de los mismos. Para nuestro caso deben tener especial interés, el número de vainas llenas totales. Por lo tanto una selección en M_2 debe estar basada principalmente en materiales tomados al azar en donde se incluyen plantas con todo tipo de expresión fenotípica en aquéllas que para algún determinado carácter hayan mutado visiblemente y que sean, a la vez, indicadores de variabilidad inducida, la cual debe ser evaluada para caracteres de rendimiento y calidad en posteriores generaciones.

Olivares, Trujillo y Martínez (1973) consideran en su estudio sobre selección en trigo en caracteres de rendimiento (número de tallos, peso de cien semillas, rendimiento promedio por tallo y por plantas), que una previa selección en M_3 podrían ser apropiada para obtener líneas superiores en M_4 (31,37).

4.5 Diseño de mejoramiento por mutaciones en frijol

En este experimento efectuado con cuatro variedades (14), de Phaseolus vulgaris L., que fueron crecidas y autofecundadas antes del tratamiento mutagénico, para asegurar su homocigocidad según Hussein y Disouski (1976). Las semillas bien desarrolladas de la misma edad fueron seleccionadas para los tratamientos mutagénicos (0,4,6,8 y 10 Kr. radiación Gamma, Co-60 en el lab. de Energía Atómica de Egipto en el Cairo. Otras fueron tratadas con EMS). Por tratamiento se tomó una muestra de 100 semillas. Luego la semilla de cada una fueron crecidas en una porcelana conteniendo 10 surcos, cada uno con 10 plantas. Todas las plantas M_1 supervivientes, hasta la madurez se cosecharon individualmente, para crecer la generación M_2 . Las plantas M_1 con buena fertilidad y vigor fueron seleccionadas. Las semillas de cada planta M_1 fueron sembradas individualmente como una familia M_2 de c/var. progenitora, fueron

crecidas 10 fam. como testigo. El tamaño de c/fam. M_2 varió, entre 15 y 20 plantas, dependiendo del número de semillas disponibles de c/planta M_1 . Durante la generación M_2 , todas las plantulas mutantes clorofilicas y aquéllas con crecimiento anormal fueron desechadas. Hubo mucha variación en varios caracteres durante la generación M_2 y la selección pudo hacerse para un número de mutantes que se han continuado por autofecundación por varias generaciones (2,17).

Los caracteres estudiados fueron:

- Número de semilla por planta (sólo en M_5).
- Peso de semilla por planta (en M_5 y M_6).
- Ctdo. proteico por 100 gr. de harina (en M_5 y M_6).
- Rendimiento por planta (M_5 y M_6).

El contenido proteico fue estimado usando el met. de análisis de "Kjeldahl". Una muestra de 25 semillas al azar de c/mutante y de las líneas parentales correspondientes fue molida para la harina (16).

Es interesante notar que la mayoría de mutantes seleccionados y continuando en este estudio fueron inducidos por irradiación gamma, mientras que sólo un mutante fue inducido por EMS (14).

4.6 Evaluacion comparativa de frecuencias de mutación y comportamiento genético de mutantes inducidos por irradiación Gamma aguda y crónica en frijol común, Phaseolus vulgaris L.

Antes de resumir el procedimiento experimental, del presente trabajo, es necesario describir claramente los términos M_1 , M_2 (generaciones) etc., usados comúnmente y que se refieren a las plantas irradiadas y crecidas (crónicas), siendo éstas las M_1 . La progenie de estas plantas son M_2 , las siguientes son la M_3 , así sucesivamente.

300 semillas fueron irradiadas para cada dosis y luego sembradas, cosechándose hasta la madurez de las semillas. La mitad de las semillas se observaron en el invernadero y la otra en el campo hasta la M_3 . Las observaciones de mutaciones fueron llevadas en el invernadero y generalmente fueron clasificadas en dos categorías principales: las mutantes clorofilicas que cambien el color de la hoja y el tallo y mutantes morfológicos que cambien el hábito de crecimiento, el color y el tamaño de la planta o forma (29).

Para la irradiación crónica, las plantas de frijol fueron crecidas concéntricamente alrededor de una fuente de Cesio-137 en el campo Gamma, desde su germinación a la cosecha.

Gaul (34), señaló que para medir la frecuencia de mutaciones inducidas por radiación, el método de "Número de mutaciones por 100 plantas M_1 " no es un criterio válido debido que subestima la frecuencia a medida que aumentan las dosis de radiación. Sugirió que número de mutantes por 100 plantas M_2 es un método mejor para esta medida. Se usó el segundo método para el cálculo de la frecuencia de mutaciones. Los resultados también muestran que la frecuencia de mutación inducida por radiación crónica, son tan altas como las inducidas por radiación aguda.

Las mutaciones observadas en el experimento fueron clasificadas en dos categorías: clorofilicas y morfológicas. Un total de 130 mutaciones fueron aisladas, de la irradiación aguda de la semilla y 195 de las plantas irradiadas crónicamente. Del tratamiento agudo de las semillas el 41% de las mutaciones fueron clorofilicas, mientras que las irradiadas crónicamente, el porcentaje de mutaciones clorofilicas fue mucho más alto (77%).

Hasta el momento todas las mutaciones inducidas observadas han sido de naturaleza recesiva; no se han encontrado mutaciones dominantes en este trabajo. Normalmente un solo cambio en un gen recesivo daría origen por herencia mendeliana simple a 3 normales y un simple mutante, en la progenie autofecundada. Así fueron crecidas 50 semillas de cada planta M_2 , para determinar la proporción de la segregación. Estadísticamente, si una planta heterocigótica segrega de 13 a 37% de mutantes se considera una herencia mendeliana simple y no es rechazado por la prueba de Chi-cuadrado, proporción 3:1. Si una planta segrega por encima o debajo del 13% ó 37%, se considera, que es una desviación de lo esperado normalmente.

Cuadro No. 2

Tratamiento	<u>No. de mutaciones aisladas</u>				Total
	<u>Clorofilicas</u>		<u>Morfológicas</u>		
	No.	%	No.	%	
Irradiación Aguda	53	40.8	77	59.2	130
Irradiación crónica	150	76.9	45	23.1	195

4.7 Resumen sobre técnicas nucleares utilizadas en granos

4.7.1 Consecuencia de la radiación gamma en el contenido de proteína en soya.

Entre las generaciones M_4 - M_5 de las líneas anteriores seleccionadas en el frijol de soya, expuestas a 15 Krad, como dosis gamma, se obtuvo un incremento en el contenido, de proteína, de aproximadamente un 10% (16). El incremento en el contenido de proteína no parece estar relacionado o a expensas del contenido de aceite.

No se reportó un cambio significativo, o que se haya notado en el color de la semilla, en el peso de 100, resistencia al encajamiento o sea resistencia contra la dehiscencia de la planta, sensibilidad en su fotoperíodo de o por planta individual.

Un número de análisis de aminoácidos, llevado a cabo con un analizador de aminoácidos (16,17), sobre semillas individuales en las líneas. De acuerdo con Crocomo, Sodek y Da Cruz (1973), las líneas revelaron un pequeño incremento de líneas en comparación con el testigo. La técnica usada en la preparación de la muestra para el análisis no dio un resultado exacto del contenido de Cisteína y ctdo. de methionina. Los datos sin embargo, fueron no muy extensos,

debido a que sólo 12 determinaciones se han efectuado hasta ahora, sobre el espectrum de aminoácidos (37).

4.7.2 Inducción de mutaciones en el contenido de proteína de arroz (Oryza sativa L.).

Un número bastante grande de mutantes con contenido alto de proteína fue hallado por Tanaka (1969), almacenándolos en su banco de germoplasma, como mutantes morfológicos derivados de una vieja variedad Nrin 8, en donde se irradiaron semillas de la var. Nihombare, expuestas a rayos gamma, con dosis de 20 y 30 Kr. de las cuales se aislaron mutantes, con un alto ctdo. de proteína, obteniendo una productividad alta, lo cual es un éxito.

El método de pedigree fue empleado para seleccionar las variantes con alto ctdo. de proteína en las generaciones M_2 y M_3 . Cerca de 6,000 plantas M_2 y 440 líneas y 201 plantas M_3 produjeron alto ctdo. de proteína, en las semillas de arroz, café, se obtuvo más del 11% de proteína, con una humedad del 12% (26,40).

4.7.3 Mejoramiento de la proteína en el frijol de soya (Glycine max. L.), usando mutaciones.

De acuerdo con Smutkupt y Gymantasiri (1973), las mutaciones en el frijol de soya, coordinadas por un proyecto de investigación tiene como objetivo, la producción del mejoramiento en la cantidad de proteína, así como el mejoramiento de las características agronómicas (4).

La semilla de soya de Sansai en Tailandia, en una var. local y la var. S.J.2., una var. mejorada, fueron tratadas con rayos Gamma, con 5 dosis; 5, 10, 20 y 30 Kr. como dosis agudas.

En el manejo del mat. tratado, fue utilizada una selección, ambas var. fueron analizadas por su contenido de proteína y también para su rendimiento. Fue hallado que 4 líneas Sansai originadas de plantas M_1 , anormales, tenían un contenido de proteína, con un rango del 43 al 46%. En otras líneas Sansai teniendo un alto contenido de proteína variando de 47 a 50% (en base a mat. seca) obteniéndose, rendimientos más bajos, comparados a las plantas o de las plantas testigo. Las línea con más alto rendimiento de la var. S.J.2 se

seleccionaron en la M_5 . Semillas de la M_7 fueron analizadas para el contenido de proteína. Las líneas tratadas tuvieron un rango de proteína de 37.56% a 42.33% con un promedio de 39.57. Sólo 7 líneas se sacaron de las 15 líneas mostradas como superiores en contenido de proteína arriba del promedio.

4.7.4 Experiencias del mejoramiento en frijol (Phaseolus vulgaris L.) y soya (Glycine max. L.) usando mutaciones inducidas.

Este trabajo fue realizado por Rubaihayo (1973) en semillas de frijol de ejote blanco, comestible, denominado Banja 2 y México 142, también en frijol de Soya en la var. Kukulasa 4, las cuales fueron sometidas a distintas dosis de radiación Gamma.

La generación M_1 , fue sembrada en septiembre, observándose algunas desviaciones morfológicas en cada semilla. La generación M_2 fue plantada en abril de 1973 y se observaron varios mutantes morfológicos en cada plantación. Algunos de los efectos de la radiación observada en la M_1 , no fueron llevadas a la generación M_2 , éstos son algunos efectos: cambio en color de la vaina, enanismo, entre otros observados (8,39).

4.8 Recomendaciones sobre Métodos para determinación de Nitrógeno total en el mejoramiento de la proteína en su calidad y cantidad.

En junio 1968 un grupo de fitomejoradores, químicos, físicos y nutricionistas, fueron empleados en conjunto por la FAO/IAEA. (División de Energía Atómica para la Agricultura y la Alimentación). El panel se llevó a cabo en Rostanga Suecia. En resumen se llegó a dos conclusiones generales, que fueron dadas por el Panel de Rostanga (16).

a. El incremento en la proteína existente en los países un desarrollo es posible por medio del mejoramiento de la proteína en la semilla de cereales y leguminosas, por cambio o procedimientos genéticos, es decir por medio del mejoramiento en la planta.

b. Que el factor más limitante en el fitomejoramiento, en su esfuerzo por mejorar el ctdo. de proteína, es la falta de métodos de selección adecuados para escoger el ctdo. de proteína y su calidad. Las recomendaciones siguientes son un sumario de las discusiones, que en gran parte concuerdan con los trabajos

realizados por Tulman, Neto y Sarafi en 1975 y 1973, respectivamente. Así se hace un esfuerzo para comparar métodos en cuanto a su exactitud analítica y reproducción (16).

4.8.1 La Digestión Kjeldahl

Este método es uno de los más usados comúnmente (Apéndice I). Depende de la conversión que se da de el Nitrógeno a sales de amonio, luego de esta digestión el amonio puede ser determinado por: Destilación del amonio en Acido bórico y Nitritación con un ácido estándar, usando indicadores (cualitativamente).

4.8.2 Combustión de Dumas.

Este método se basa en la combustión de material biológico con un catalizador de CuO y con tem. de casi 800 gra. Centi. y con una absorción de gas N, producido por efectos físico-químicos. Pueden darse algunos problemas como los siguientes:

- a. Una incompleta combustión si la cocción no es fuerte.
- b. Se puede dar una mixtura pobre de las muestras y los catalizadores.

4.8.3 Activación por alta energía de neutrones.

El procedimiento de análisis, se basa en la reacción del N^{14} , $(n, 2n) N$ y requiere, de un recurso de 14-17 MV neutrones. Con un generador de neutrones comercial ahora en el mercado en tiempo de activación es de 100 seg. y el tiempo por análisis puede ser de 60 seg. La exactitud y la reproductividad del método ha sido probado por un buen número de experimentadores en la unidad de activación en operación, para el análisis de N, sobre alimentos, dentro de una escala amplia de trabajos en E.E.U.U. (R.A. Luse).

4.8.4 Activación por medio de energía baja de neutrones.

Tiwari, ha investigado la posibilidad de usar N^{14} (N térmico) N^{15} , en la reacción para determinación del N en la semilla. La carrera de los rayos gamma, emitidos en cantidades de 10^{-4} seg. y que requiere una alta resolución de Ge (LI) detectores para resolver su complejo espectro, así también un cristal

de MaI como detector puede ser usado para contar los 10.8 MeV rayos gamma de N.

Se estima sobre bases teóricas que unos 400 análisis se pueden realizar/día a un costo de 1 a 2 dólares por análisis.

4.8.5 Activación o estimación con energía alta de rayos Gamma.

Este método se basa en la reacción nuclear del N^{14} (gamma n,) N^{13} y ha sido encontrado muy manejable para la estimación de proteína en los cereales. Usando un Betatron 18-MeV (35 rad/min a 1 m. de distancia) en un tiempo de 10 min. es posible el análisis. De acuerdo con los resultados del método Kjeldahl, son muy buenos, pero por el rutinario análisis de N su costo, en cuanto al Betatron y los detectores serán muy altos para tratar de comparar o hacer competitivos a este método.

4.8.6 Inducción de electrones por emisión espectroscópica.

Este método se apoya en la emisión de electrones (IEE o "ESCA") de las capas exteriores en los átomos por incidencia de radiación X o Gamma. El número de electrones emitidos con cierta energía es medida sobre o en base a el número de átomos de determinado tipo, (i.e. elementos) presentes en la muestra. El equipo, comercialmente es posible encontrarlo y nos puede dar una determinación cuantitativa de "N", "S" (sulfuro), Carbono y otros elementos, para que se pueda determinar también la relación S/N ó N/C, automáticamente, dado que el equipo es usualmente manejado por una computadora. La presente experiencia, nos indica que el "N" puede ser determinado o ser medio en un tiempo de 10 seg., el "S" en cerca de 5 min. y el "C" en cerca de un minuto. La muestra puede ser finalmente molida y entregada a la radiación X en una capa delgada (o cinta engomada).

4.8.7 Reacción del biuret.

El agente biurético (Sulfato de Cu, en solución alcalina), reacciona específicamente con la unión de péptidos, y forma un complejo coloreado que nos indica generalmente el ctdo. de proteína. Esta prueba tiene fuente de error, dado que varias proteínas de semilla, producen diferentes coloraciones

o valores del color (112).

4.9 Recomendaciones sobre métodos para determinación de aminoácidos en la calidad proteínica de la semilla.

4.9.1 Hidrolisis de proteínas para aminoácidos generales.

Este primer paso es necesario para la mayoría de técnicas de análisis, debiéndose llevar cuidadosamente sobre los subsecuentes análisis de aminoácidos, los cuales deben ser exactos. Tres tipos de hidrolisis son utilizados para este tipo de propósito particular: acidez, alcalina y enzimáticas. Otros agentes (orgánicos) para hidrolisis (ácido Tolueno-Sulfónico) ha sido recientemente sugerido, sin embargo, la alta concentración de polisacáridos en las semillas interfieren con la determinación del Triptófano.

4.9.2 Pruebas de crecimiento microbiano.

El crecimiento de ciertos organismos (Leucococcus, Lacto-bacillus y Streptococcus), en un medio donde faltan aminoácidos y están suplidos por un solo aminoácido, se puede comprobar en la muestra, su contenido de aminoácido. La técnica tiene la ventaja de un alto grado analítico y una exactitud que requiere sólo un simple equipo. Sin embargo, un control estricto de los procedimientos microbiológicos es esencial para obtener resultados significativos. La aplicación de las pruebas de replicas (usualmente 4) y la comparación frecuente con los Stándar, es requerida. Anteriormente la Hidrolisis de la muestra es necesaria. Esta técnica generalmente es utilizada para uno o varios aminoácidos en lugar de todos los aminoácidos de la composición proteica (Bolinder) (16).

4.9.3 Reacción con 2 cloro-3,5-dinitropiridina.

Este método requiere de una hidrolisis inicial de la semilla cultivada con papaina, después de que los hidrosilatos son mixtados o revueltos con fosfatos en una centrífuga, entonces el precipitado es teñido con un reagente. Y luego extractado con Acetato Etilico (supernatant). Estos pasos hacen el

método algo laborioso pero ha sido utilizado en el CYMMYT, en selecciones para alto ctdo. de lisina en maíz (G. Janson).

4.9.4 Determinación por medio de una capa fina en cromatografía (Electroforesis).

Los aminoácidos básicos, pueden ser fácilmente separados uno de otro, por la acidez y neutralidad de los aminoácidos. Usando en esta técnica capas finas de cromatografía o de electroforesis sobre una capa fina de Acetato. Este método requiere primeramente la hidrólisis de la muestra. La cuantificación con un densímetro pueden permitir una buena exactitud y una relatividad analítica alta (M. Denic) (16).

4.9.5 Reacción con ácido indolacético.

Este método es corrientemente de bajo desarrollo, pero nos puede dar una determinación de "Metionina", así como Cisteina o Metionina sola cruda en una sustancia o suspensión harinosa por una alcalinización con ácido indolacético, pH. bajo y temp. de 40-60°C. Para usar reagentes marcados radioactivamente, la extensión de la alkylation (por lo tanto el grupo o cantidad de methionina más cisteina), puede ser determinada por la cantidad de niveles incorporados dentro de las proteínas de la semilla. Investigaciones más amplias son necesarias para poder standarizar tal metodología (G. Janson).

4.9.6 Combustión para el total de sulfuro.

Como el contenido de Sulfuro en los aminoácidos Methionina y Cisteina, dan cuenta de por más del total del sulfuro en las semillas, su información se debe estimar como muy buena en cuanto al total de sulfuro o azufre en la semilla. Esto se puede realizar por combustión a alta temp., como en un mechero de inducción y ser medido de acuerdo al sulfuro que se oxide. El equipo comercial es posible hallarlo y nos permite un tiempo de análisis de 10 min. por muestra (R.A. Luse).

4.9.7 Reacción con ácido glyoxílico para Triptófano.

El reagente de Hopkins-Cole, es muy usado para la determinación del Tryptófano libre o del triptófano unido peptídicamente en la proteína pura soluble. ha sido encontrado para múltiples usos, este reagente luego de ciertas modificaciones para la determinación de los enlaces del Triptófano en la proteína de la semilla es usado. Bajando el contenido de ácido sulfúrico en el medio se evita la decoloración de la harina de semilla a un T° elevada necesaria para la reacción (G. Janson).

4.10 Fisiología de la Planta

Cultivos de hábitos determinados con baja producción de hojas y poco tiempo de floración en cuanto a rango. La compatibilidad y eficiencia de la fijación-N y tierra Nitrogenada utilizada por las leguminosas en otras áreas, donde básicamente la investigación fisiológica es necesaria y relevante para el mejoramiento de las leguminosas. Los cereales y leguminosas sin duda va a contribuir a darnos una gran cantidad de proteína para su consumo en el mundo. Sin embargo la cosecha de las raíces, casaba, camote, papas, que son alimentos imprescindibles para millones de personas, también deberían incluirse en los programas de mejoramiento y selección de proteína. Considerando la importancia de la proteína de las semillas para la nutrición animal y humana en el mundo (6,27). Existe una sorprendente falta de información acerca de los procesos de la síntesis de la proteína en las semillas. Los conocimientos de los mecanismos genéticos y fisiológicos envueltos, nos pueden ayudar a poner en pleno, los esfuerzos para mejorar la proteína de las semillas y puede llegar a darnos mejores bases específicas. En poco tiempo la investigación dirigida para definir las necesidades de nutrición, la producción proteínica, la utilización a nivel local, serían más ayudativas al cultivarlas para enfrentar tal problema.

4.11 Sugerencias para el Fitomejoramiento en la calidad proteínica de leguminosas o gramíneas.

a. Cuando se produce para una mayor cantidad o una calidad mejorada de proteína existente en el rendimiento alto de var. de cereales y leguminosas el

mejorador puede considerar las necesidades nutricionales de la población local y buscar aquellos mejoramientos que van a darnos un beneficio grande en cuanto a la dieta del consumidor (17,22).

El incremento de proteína/Ha., es generalmente más importante que el incremento en el % de proteína por hectare. Puesto que la calidad proteínica se debe mantener, tomando en cuenta que las var. de grano, leguminosas, son de bajo rendimiento, su mejoramiento, su desarrollo fitogenético debería incluir un aumento tanto de producción así como el mejoramiento de su calidad proteica, (incremento de aminoácidos esenciales deficientes, así como su digestibilidad, y disminución de antimetabolitos).

b. Se debe observar también que la selección mayor de una población, nos da la pauta de encontrar más mutantes proteicos mejorados en su rendimiento y calidad.

c. El mejorador debe tener a mano o contar con colecciones extensas de germoplasma con fines de hibridación y otros programas de mejoramiento. Las colecciones pueden ser seleccionadas por su calidad de proteína. Es recomendable estudiar la correlación que puede ser medida fácilmente entre el contenido de proteína o calidad y caracteres como tamaño de la semilla o forma, número de semillas por planta de las hojas, alturas de planta, etc.

d. Es bien conocido que las condiciones ambientales influyen la calidad y cantidad de la proteína de la semilla. Estas diferencias en la planta inducidas por una des-uniformidad del ambiente (diferencias de clima, época, ambientes, etc.) pueden ser mayores que las diferencias de o producidas por mutaciones genéticas (inducidas).

4.11.1 Lineamientos para colaboradores del programa cultivo de líneas mutantes.

a. El sitio de siembra seleccionado debe ser, en un suelo característicamente representativo de la región de donde se cultivó el grano. Debe ser muestreado el local o terreno, a fin de evitar lo menor posible una obvia variabilidad del suelo. El sitio no debe localizarse sobre viejas parcelas o lotes experimentales donde se hayan aplicado, diferentes clases de fertili-

zantes en distintas cantidades en otros años. Un área con alta cantidad de residuos orgánicos no es conveniente. El sitio o terreno debe localizarse de tal manera que no existan influencias, extrañas por ejemplo de árboles, de caminos y que el perímetro del terreno sea amplio en espacio y también en sus límites. Si el riego es una práctica del cultivo, el área experimental debe tener facilidades de irrigación.

b. En cuanto a prácticas culturales; el suelo debe prepararse para la siembra de la semilla de acuerdo a las mejores prácticas de la región. Evitar el daño por insectos, pájaros, roedores, etc. El uso de herbicidas, pesticidas y fungicidas debe ser minimizado, dado que estos químicos pueden desuniformizar el ctdo. de N" en la semilla.

c. Para el área experimental entera, la cual se tomarán para análisis muestras de grano, la aplicación de fertilizantes, deben ser iguales en porcentaje o cantidad, tiempo y método.

d. Para la Replicación y Control; cuando se separan las líneas mutantes de una gran cantidad de material existente se recomienda un diseño en bloques al azar y por lo menos 4 replicas a usarse. Las parcelas replicadas no necesitan ser más grandes de 9 met², pero deben tener por menos 1 mt². En el caso de líneas M₃ o M₄, donde el número de parcelas replicadas no sea posible sembrarlas, se hace usualmente en líneas de 1 a 2 mt. de largo. La línea testigo (var, parentales) deben incluirse a intervalos regulares (ejem. c/10 parcelas o surcos). Es recomendable que la mejor corriente varietal, o la que tenga mayor habilidad combinatoria, deben ser incluidos en los tratamientos, para dar una comparación. También las producciones de las replicas deben de llevarse a cabo en base a varias localidades y para diferentes épocas o número de años.

e. El espaciamiento normal entre surcos y entre plantas debe ser seguido, también entre planta, de acuerdo al cultivo y la región, pero tomando en cuenta que se debe hacer espaciamiento para obtener uniformidad de las plantas, a fin de evitar las influencias nocivas sobre el contenido de proteína, en el frijol se recomienda distanciar doble entre plantas.

4.12 Evaluaciones del fitomejoramiento para proteína de algunas var. brasileñas usando radiación Gamma.

Este trabajo fue realizado en el Centro de Energía Nuclear para la Agricultura, Piracicaba Brazil, por "Crocomo y colaboradores, sobre variación en el contenido de proteína de algunas var. brasileñas, de frijol. Los resultados de estas investigaciones muestran que el promedio del contenido de proteína de las 8 var. era 24%, siendo el rango de 22.7 a 26.7%. El contenido de proteína de las plantas simples de estas var. mostraron un promedio de 23%, siendo el rango de 16.7 al 31.9%. Análisis de progenies de plantas simples mostraron que por lo menos en 3 variedades, Carioca, Pirata y Rico 23, la variación debe por lo tanto ser eficaz o efectiva. Análisis de 3 pequeñas colecciones analizando 201 líneas enseñaron un promedio de contenido de 24.3% con un rango de 14.1 al 35.8%. Análisis de aminoácidos de semilla en vaina o en bolsa, de cada una de las 8 variedades, muestran un contenido de Lisina, con un rango de 4.9 a 7.3%, con un promedio de 6.7% y el contenido de Methionina con un rango de 0.6 a 0.8%, con un promedio de 0.7% (6,7,8).

5. METODOLOGIA

5.1 Localización de las generaciones M_1 , M_2 , M_3

Las dos variedades de frijol irradiadas serán sembradas en un terreno de la zona 12 de la ciudad de Guatemala, campos de la Dirección de Energía Nuclear (antigua planta Gulf). El terreno a ser utilizado en la M_1 tendrá un área de 118.65 m² y el área de las generaciones M_2 y M_3 será de 1350 m².

La ciudad de Guatemala se encuentra a una altitud de 4.900 p.s.n.m., con una temperatura promedio de 21°C.

5.2 Análisis del suelo.

Se tomaron dos muestras de suelo, del terreno donde las var. fueron sembradas y después de analizadas en el laboratorio de Suelos del ICTA, dieron los siguientes resultados:

Cuadro No. 3 ANALISIS QUIMICO DEL SUELO

Muestra	pH.	ppm.		meq/100 ml de Suelo	
		P	K	Ca.	Mg.
1	6.5	4.25	118	11.85	2.16
2	6.6	4.50	113	13.83	3.12

- Para fines de fertilización= pH; ligeramente ácido P; bajo, K; bajo, Ca; alto Mg; adoc.
- Relación Ca: Mg, es aceptable
- Relación Ca: K, es muy alto indicándonos que habría una respuesta alta a la fertilización con K.
- Relación Mg: K, es alta, confirmándonos una respuesta al K.
- Correlación pH: P nos indica que el P está disponible en mínima cantidad

para el cultivo, con buena respuesta a la fertilización con P.

5.3 Fertilización

En las generaciones M_1 , M_2 , M_3 , al momento de la siembra (en 10 m²) se aplicarán:

0.75 Lb. de N (UREA)

0.70 Lb. de P (EN T.S.P.)

1.00 Lb. de K (FERTILIZANTE)

Treinta días después de la siembra se aplican:

0.75 Lb. de N (UREA)

Se coloca el fertilizante en bandas laterales a lo largo de los surcos, separado de las semillas 5 cms y enterrados 7 cms de la base de los tallos.

5.4 Tratamientos e irradiación

Fuente: Radiaciones Gamma de Co-60

Irradiador: Dynarad 5L

Intensidad: 290 krad/hora

Material a irradiar: 2 lotes de semillas de frijol.

Cuadro No. 4 IRRADIACION AGUDA DE LA SEMILLA

Tratamiento	Dosis	Tiempo de exposición
A	0	0
B	8	1 min. 39 seg.
C	15	3 min. 6 seg.
D	20	4 min. 8.4 seg.
E	30	6 min. 12 seg.

5.5 Materiales Genéticos

Se sembrarán semillas irradiadas de las siguientes var., de frijol,

mejoradas por el ICTA:

ICTA/Jutiapán; D-35=DOR 42=FF1012 - CB-CB-CM (2) / CM (4), derivada del cruce de ICA Pijao X Turrialba -1, tolerante al virus del mosaico dorado, maduración moderadamente tardía, hábito II, flores de color púrpura, vainas de color verde pálido al momento de la madurez. Se adapta a climas intermedios, especialmente en zonas donde el período de lluvias no es corto, o donde se dispone de riego.

Cuadro No. 5 CARACTERISTICAS DE COMPONENTES DE RENDIMIENTO
DATOS EN MONOCULTIVO VAR. JUTIAPAN.

GENOTIPO	Hábito	Sem/ vaina	Peso de 100 sem.	Tallo	Vainas/ tallo	Total
ICTA- Jutiapán	II	6.8	18.3	8.0	9.2	19.2

San Martín: Selección de la colección criolla conocida como San Martín vaina blanca de San Martín Jilotepeque, Chimaltenango, Var. precoz de hábito III con flores color púrpura, vainas de color rojizo pálido adaptadas al altiplano central tolerante a antracnosis.

Cuadro No. 6 CARACTERISTICAS DE COMPONENTES DE RENDIMIENTO
DATOS EN MONOCULTIVO VAR. SAN MARTIN.

GENOTIPO	Hábito	Sem/vaina	Peso de 100 sem.	Vainas/planta
San Martín	III	5.0	26.0	12

Estas dos variedades, se estudian durante 3 generaciones. Las generaciones M_1 y M_2 serán o son sembradas en un diseño de bloques al azar. La M_3 se sembrará en plantas/surco, con el fin de incrementar el material seleccionado en la M_2 y poder así efectuar análisis de proteína en el laboratorio.

5.6 Siembra

5.6.1 Preparación del terreno.

Inicialmente se chapeará el terreno. Luego se hace una aradura, seguidamente se hacen 2 ó 3 pasadas de rastra. La preparación del terreno para las tres generaciones será mecanizada.

El terreno a utilizar será o es un terreno aún no sembrado con cultivos anuales, a fin de cumplir con las recomendaciones dadas por el organismo (FAO/OIEA), para los colaboradores del programa en el cultivo de líneas mutantes (15,16).

Antes de sembrar se tratará el terreno con Furadán % 5 granulado o Volatón granulado, para controlar plagas del suelo (Ver apéndice).

5.6.2 Cultivo generación M_1 .

Se utilizarán 2 semillas por postura, eliminándose una plantula para asegurar una población homogénea (15). Con un total de semillas a sembrar de: 600.

Una onza = 100 semillas.

La siembra se hace a mano dejando entre surcos 0.50 m. y entre plantas a 0.30 m. La profundidad de siembra se hace a 0.15 m. Se hace una resiembra a los 15 días de la siembra.

5.6.3 Cultivo generación M_2 .

Se utiliza una semilla por postura, a fin de obtener una población homogénea y representativa de los posibles mutantes a recuperar durante la evaluación del cultivo.

Total de semilla a sembrar = 3,000/var, 600 semillas/tratamiento.

No. potencial de plantas a tener, incluyendo testigos= 6000/var.

60 onzas= 3.75 lbs. (6,000 semillas aproximadamente).

La siembra es manual, con una distancia entre surcos de 0.60 m. y una distancia entre plantas de 0.20 m. siendo las medidas recomendables para este tipo de experimento (15,16).

La profundidad de siembra recomendable es de 0.10 m. promedio (ver

distribución en el numeral 5.10.3), dejando unos quince días para la siembra.

5.6.4 Cultivo generación M_3 .

Para la siembra se toman de cada planta seleccionada e identificada de 2 a 3 vainas (22), del mismo nudo o inflorescencia, para que sean representativas del mismo evento mutacional guardando un orden por familias, derivadas de semillas con una misma mutación o mutaciones. Se disponen en líneas de siembra o lotes distribuidos al azar en bloques o repeticiones, por las gradientes del suelo, aunque se considera opcional tal medida, debido al carácter primordial de reproducción, del material mutante morfológico y seleccionado de la generación M_2 , para su análisis de laboratorio en la M_3 .

Se toman 10 semillas a sembrar por planta seleccionada.

Las distancias de siembra son las mismas para surcos y de 0.10 m. entre plantas.

En base a la cantidad de individuos mutantes morfológicos y no morfológicos seleccionados se hace el diseño de siembra para la M_3 , presentando en la figura No. 1.

5.7 Metodología de Selección

Durante el desarrollo de las generaciones M_1 , M_2 y M_3 se lleva un récord de los cambios observados en las plantas, respecto a las siguientes características agronómicas, con el fin de seleccionar los mejores genotipos:

- % de germinación
- Días al inicio de floración
- Días a madurez fisiológica
- Días a cosecha
- Alturas de la planta, a los 15 días, a la floración y a la madurez.
- Tamaño de hojas a la madurez
- Porcentajes de mutantes clorofilicas
- Color de la flor
- Color de semilla
- Brillo de la semilla
- Peso de 100 semillas (14% de H°)

- Color de vaina madura

En base a la bibliografía consultada (16,44,52) y fitomejoramiento, se efectúa para M_2 , dos tipos o formas de selección (38), descritas como sigue.

5.7.1 Selección de Mutantes Morfológicos.

Durante el crecimiento y cultivos de los distintos tratamientos de la M_2 , se observan y aislan los cambios morfológicos considerados como mutantes, en relación a la población control. Serán enmarcados como mutantes, en relación a la población control. Serán enmarcados haciendo uso del reconocimiento en la variación de las características y/o cambios agronómicos (parámetros biométricos), mencionados inicialmente y para lo cual se usan cuadros especiales, para cada cambio morfológico detectable (Cuadros 13 y 15) (35).

Tomando en cuenta que en la generación M_2 se espera que se presenten los efectos mutagénicos, llamados quimera (22), se procura detectar y recuperar los siguientes mutantes morfológicos (14):

Tipos de Mutantes Morfológicos a recuperar:

- Mutantes Enanas.
- " Precoces.
- " Para color de flor.
- " Crecimiento semideterminado o indeter.
- " De vainas anormales, compactas, muy grandes.
- " Deformes.
- " De hoja anormal, fina y pequeña, corrugadas grande y gruesa.
- " Tardías.
- " Clorofilicas y amorfas.
- " Para color de vaina y grano.
- " De tipo no previsto.

5.7.2 Selección Individual de Mutantes no Morfológicos.

Se programó y planificó una selección general de posibles plantas M_2 , con mutantes nutritivas, basándose en su desarrollo, vigor, rendimiento, aspecto general satisfactorio, con el fin de someterlos también a análisis proteínicos.

Cada mutante aislado o seleccionado se identificará con el objetivo de llevar completo un pedigree a las sucesivas generaciones, además de poder llevar un mejor control para su cosecha y ubicación en el campo. Esta identificación servirá también en los análisis de laboratorio y otras evaluaciones.

Las características morfológicas observadas como mutantes en los individuos seleccionados en la generación M_2 , se anotan y se ratifican en la siguiente generación M_3 , observando si mantienen su uniformidad o por el contrario se pierden.

5.7.3 Selección Individual en la generación M_3 .

Se efectuó una selección en los individuos o reproducidos de individuos morfológicos y de la selección de plantas no morfológicas, aislando aquéllas que son más representativas del carácter mutable y por su mejor desarrollo. Para llevarlos a análisis de proteína. También para evaluar líneas de pureza genética en sucesivas generaciones.

5.8 Cosecha

5.8.1 Procedimiento cosecha M_1 .

Todas las semillas de las plantas de la generación M_1 sobrevivientes a los distintos tratamientos de irradiación Gamma, se cosecharon masivamente (bulk), por tratamiento y por bloque (22). De c/u de estas cosechas se anotará el peso de 100 semillas y se seleccionará al azar las semillas para sembrar la M_2 . Se guardan en bolsas de papel, previamente identificadas.

5.8.2 Procedimiento cosecha M_2 .

Se cosecha al inicio los individuos, seleccionados e identificados como mutantes morfológicos, guardándose en bolsas cada uno.

Seguidamente en base a la identificación de los individuos "no morfológicos" (identificación dada en apéndice 2), sigue cosechando en forma individual, separándolos en bolsas y respectivamente indentificados (14).

El resto de plantas de cada variedad, se cosechan por tratamiento y por bloque en forma masal.

5.8.3 Cosecha M_3 . (Ver selección individual en M_3).

5.9 Análisis de Laboratorio

Para fines del presente estudio se harán únicamente análisis de proteína, en base al método Micro-Kjeldahl, en el laboratorio de química analítica de la facultad de Agronomía, aprovechando para standarizar el método en la facultad. Sus pasos son descritos con más detalles en el apéndice No. 2 de este trabajo (14).

El material genético seleccionado en la M_2 e incrementado en la M_3 , servirá para hacer los análisis de proteína (16).

5.9.1 Análisis de laboratorio posibles.

a. Químicos:

- De proteína.
- De aminoácidos, metionina, triptófano, cisteína.

b. Físicos:

- Digestibilidad.
- Tiempo de cocción, sabor, espesor del caldo.

Cabe mencionar que por falta de recursos y equipo no se podrán efectuar todos los análisis.

5.10 Diseño Experimental

Para las generaciones M_1 y se usará un diseño de "Bloques al Azar". Cada tratamiento tendrá cinco repeticiones (14,22). La M_3 se sembrará en planta/surco, con la finalidad de incrementar el material genético seleccionado (10,53).

5.10.1 Modelo estadístico.

$Y_{ij} = M + T_i + B_j + E_{ij}$

Y_{ij} = Observación en la unidad experimental del bloque j con el tratamiento i

M=	Media global
Ti=	Efecto del tratamiento i
Bj=	Efecto del bloque j
Eij=	Error experimental en la unidad experimental del bloque i con el tratamiento j.

5.10.2 Análisis estadísticos del estudio.

Los resultados del estudio se evaluarán estadísticamente de acuerdo al diseño utilizado en el campo y al análisis que cada objetivo del proyecto requiera. Para este trabajo recurrimos a la valiosa colaboración del Centro de Estadística y Cálculo de la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala.

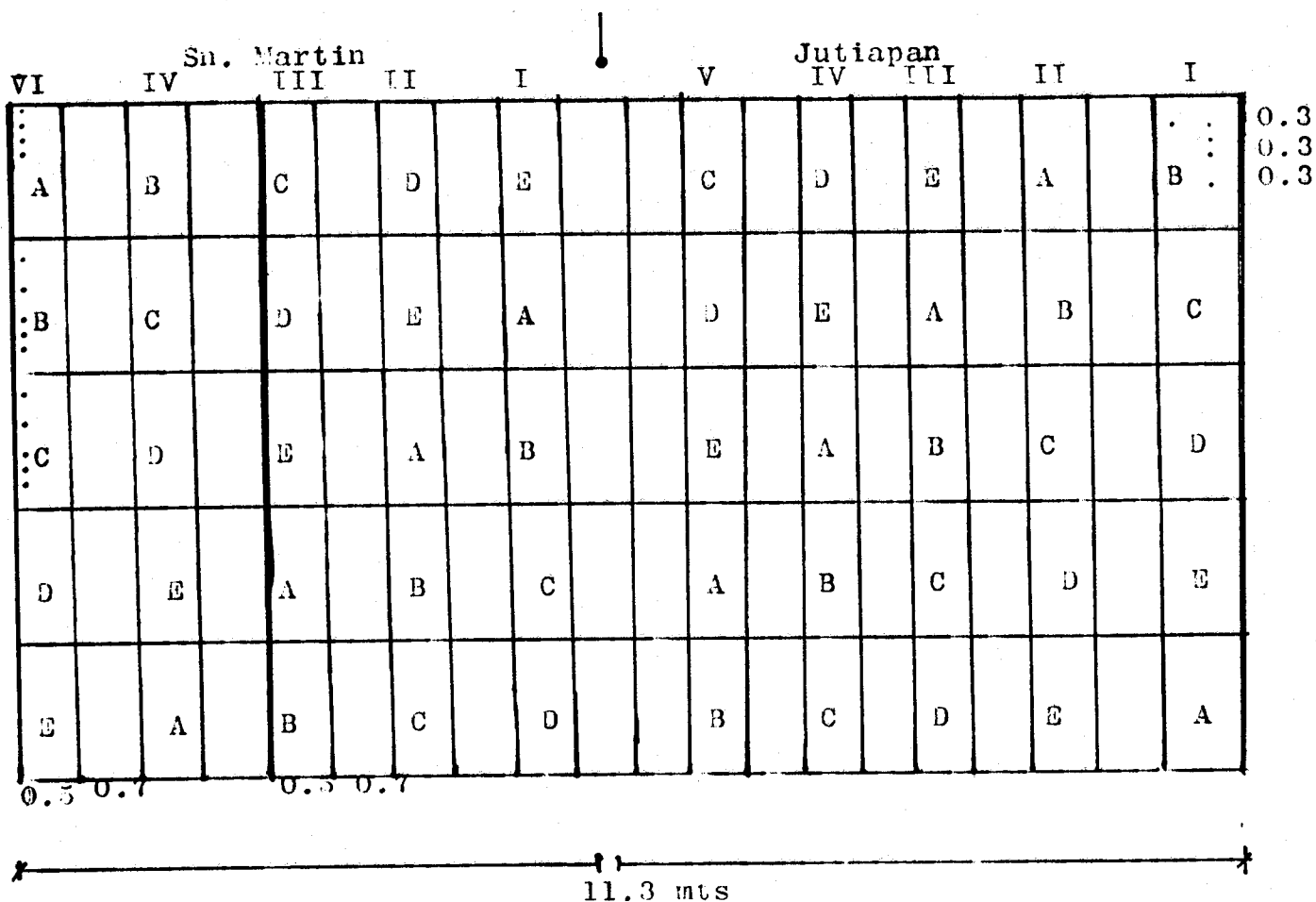
Se someterán a:

- a.- Análisis de Varianza, con el fin de determinar diferencias entre tratamientos.
- b.- Pruebas de medias, para determinar diferencias de efectividad entre medias de mutaciones de los tratamientos.
- c.- Análisis de tendencias, Regresión y correlación del modelo lineal, geométrico, cuadrático, logarítmico y gamma de las variables, respuesta que tengan diferencia significativa y las diferentes dosis de kR.
- d.- Porcentajes.
- e.- Promedios.

5.10.3 Distribución de los tratamientos de las generaciones M_1 , M_2 , M_3 .

La distribución de los tratamientos en el campo, del experimento o parcelas experimentales, se muestran en las siguientes figuras, se incluyen la M_1 , M_2 y M_3 respectivamente.

FIGURA No. 1
DISTRIBUCION DE TRATAMIENTO EN EL CAMPO
GENERACION: M_1



5.10.4 Distribución específica de la generación M_2 .

Las líneas de progenie seleccionadas de las dos var. de Ph. vulgaris L., serán crecidas en cinco repeticiones de c/tratamiento, con las siguientes características:

- a.- El tamaño de las parcelas es de 3.6 X 4 mts. (4 m^2), con 120 semillas o plantulas por parcela.
- b.- El largo de los surcos es de 4 m. en c/parcela o repetición (15,16,49).
- c.- Los surcos se ubicaron perpendicularmente a la gradiente de pendiente y heterogeneidad del suelo, según el muestreo de suelos.
- d.- El número de surcos por parcela es de seis, dejando el último y primero de cada parcela o repetición, como surcos marginales para evitar el efecto de borde.
- e.- Las repeticiones serán aleatoriamente dispuestas en el campo, en cada bloque (cinco bloques/var.).
- f.- El largo de cada bloque es de 18 m. X 4 m. de ancho, espaciados entre sí por una calle de 1 m., ubicada a lo largo de cada bloque (ver figura No. 2).
- g.- Extensión del diseño= $18 \text{ m.} \times 50 \text{ m.} = 400 \text{ m}^2$.
 Área marginal= $(7 \times 50) \text{ m.} + (4 \times 25) \text{ m.} = 450 \text{ m}^2$.
 Superficie total e la
 parcela experimental = 1350 m^2 .
- h.- Sigue distribución en la figura No. 2.

FIGURA No. 2

DISTRIBUCION DEL DISEÑO EN EL CAMPO DE LAGENERACION: M₂

B O D E G A .

J U T I A P A N

3.6 m.

6' .6' .6' Testigo	8 kR	15 kR	20 kR	30 kR
30 kR	Testigo	8 kR	15 kR	20 kR
20 kR	30 kR	Tes.	8 kR	15 kR
15 kR	20 kR	30 kR	Tes.	8 kR
8 kR	15 kR	20 kR	30 kR	Tes.

.20

4 m.

20' mts.

S A N M A R T I N

3.6 m.

Testigo	8 kR	15 kR	20 kR	30 kR
8 kR	15 kR	20 kR	30 kR	0 kR
15 kR	20 kR	30 kR	0 kR	8 kR
20 kR	30 kR	0 kR	8 kR	15 kR
30 kR	0 kR	8 kR	15 kR	20 kR

.20

4 m.

20 Mts.

FIGURA No. 3

LINEAS DE SIEMBRA PARA CAMBIOS MORFOLOGICOS

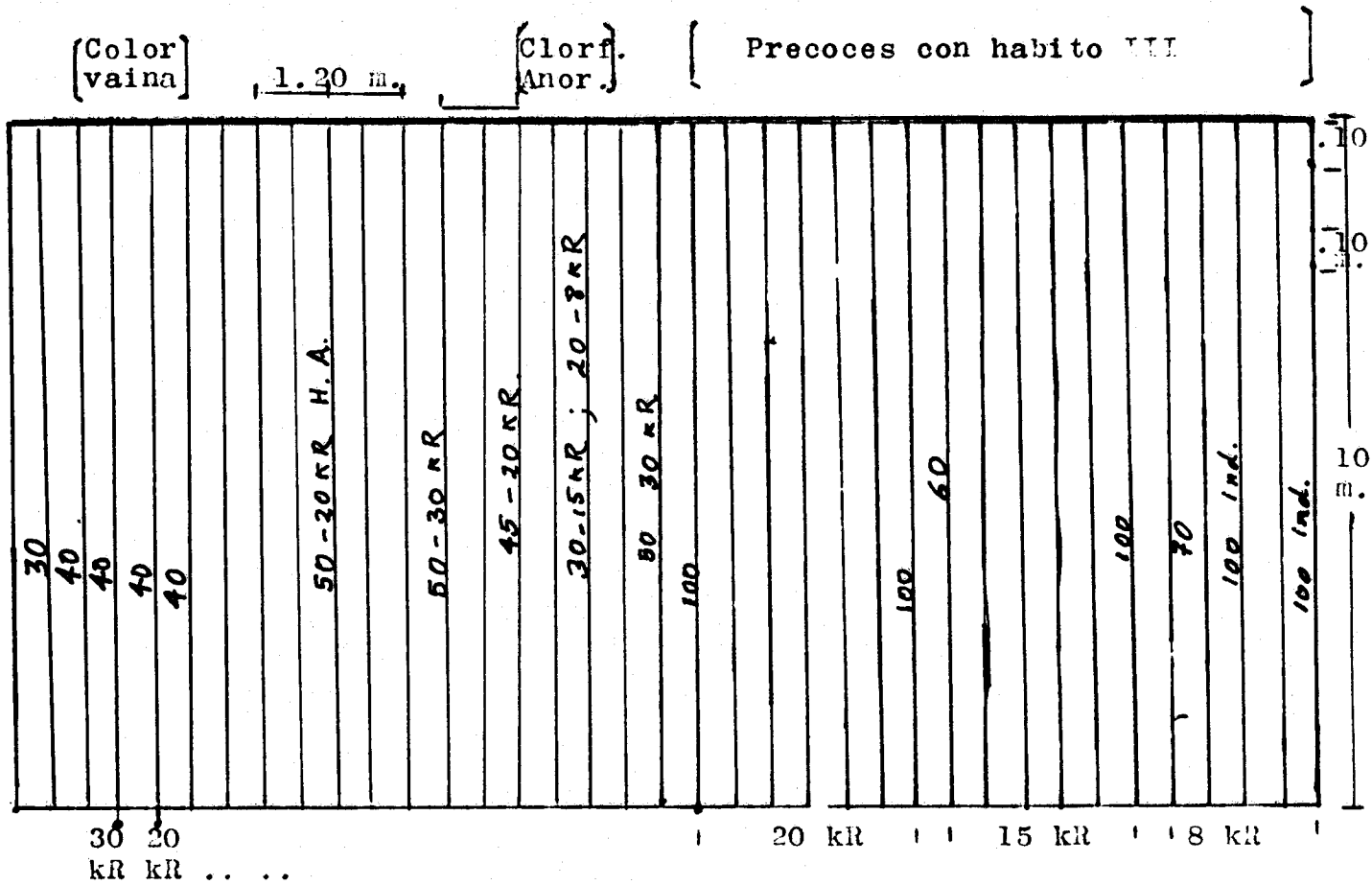
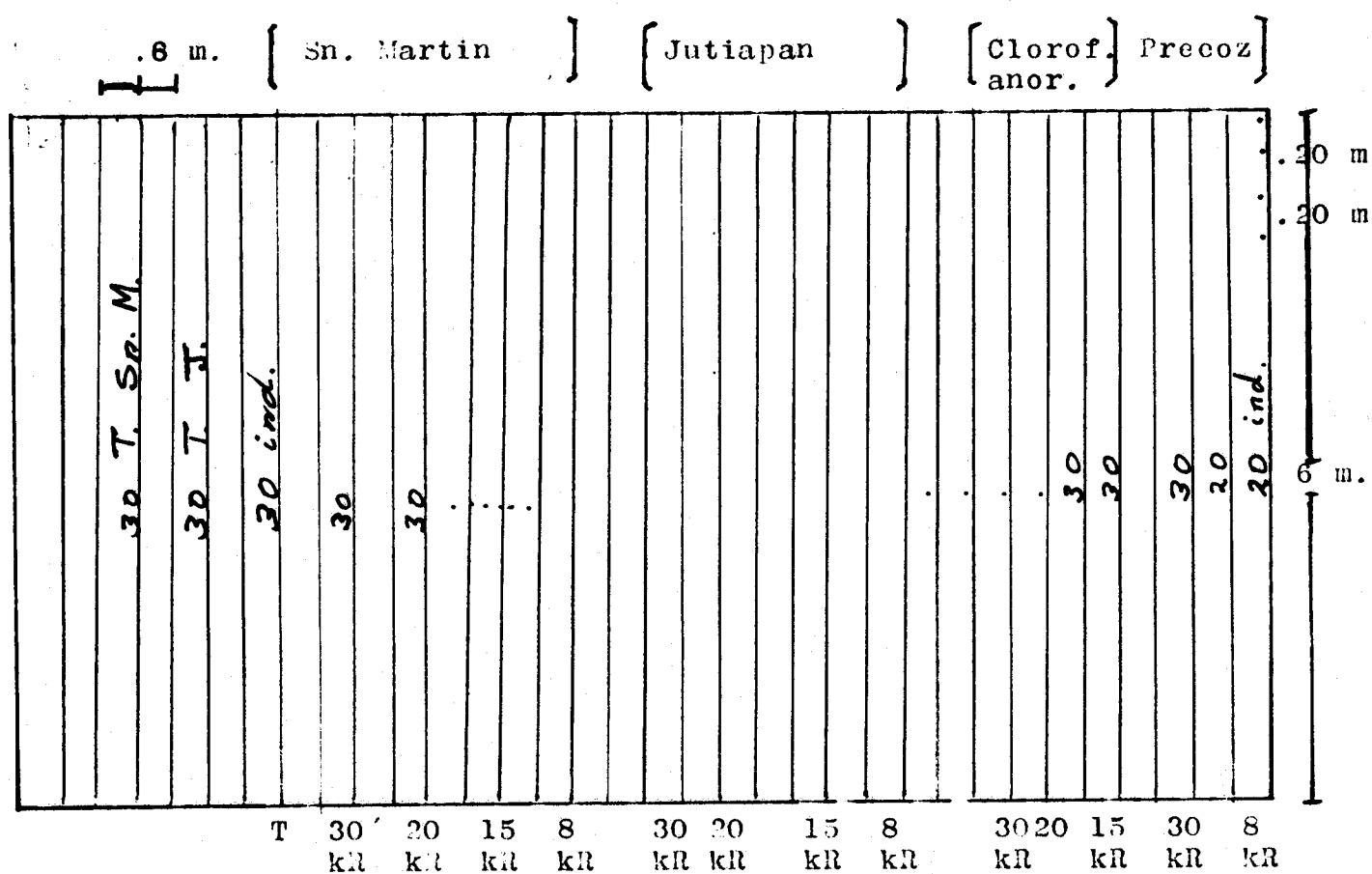
VAR JUTIAPAN, GENERACION: M_3 

FIGURA No. 4

SIEMBRA DE LA SELECCION INDIVIDUAL DE MUTANTESNO MORFOLOGICOS, GENERACION: M₃

6. RESULTADOS Y DISCUSION

El presente estudio, luego de haber realizado el trabajo de campo, dejó una serie grande de resultados, los cuales para su discusión se presentan siguiendo un orden por generaciones, de M_1 a M_3 y sus factores más importantes y de interés en ambas variedades, siguiendo los objetivos del trabajo de Tesis.

Algunos resultados son similares en presentación y análisis estadístico, los así considerados no se presentan en su totalidad en la parte de discusión, pero se pueden encontrar y analizar de acuerdo a la sección de apéndices.

En síntesis se presentan los resultados en cuadros, figuras y análisis estadísticos, con la siguiente orientación, para M_1 , se hace una discusión profunda sobre efectos fisiológicos de todas las plantas sembradas y sometidas a distintos tratamientos radioactivos, tales como germinación, sobrevivencia, letalidad y otros.

En M_2 se enfoca más hacia la aparición de mutaciones morfológicas o tipos de mutaciones (ver metodología de selección). Su relación con el quimerismo en M_1 , tasas de mutación, su consideración real, con la interacción del ambiente. Frecuencias de mutantes clorofílicas y su repercusión en la sensibilidad de las variedades en estudio; finalmente sobre el tipo de selección para proteína.

En M_3 se refiere más a la observación de las características transmitidas de la anterior generación (M_2) y su heredabilidad genética. También se analizan los contenidos proteínicos de los individuos seleccionados y se dan cuadros de resultados discutiendo, las variaciones encontradas. Se dan sugerencias para realizar estudios futuros siguiendo metodologías apropiadas en inducción de mutaciones.

El tipo de Diseño experimental utilizado, fue el de bloques al azar, considerado adecuado para reducir los efectos de heterogeneidad ambiental; sin embargo se reconoce que no era necesario para un estudio de esta naturaleza, al menos durante tres generaciones.

Se elaboraron 25 ANDEVAS con datos transformados, 12 análisis de medias (Tukey) y 7 análisis de regresión y correlación distintos modelos, porcentajes y promedios (ver metodología y apéndice No. 4).

6.1 Efectos anatómicos y fisiológicos en la generación M_1 .

Entre las variables estudiadas para medir los distintos efectos fisiológicos están: la altura de planta a los 15 y 45 días del ciclo vegetativo del cultivo, porcentaje de germinación, días a la floración, días a la madurez fisiológica, días a la cosecha, No. de plantas sobrevivientes, porcentaje de mutantes cloróticas, etc. (Ver inciso 5.7). Listas de estas variables aparecen en los cuadros No. 21 al No. 29 (apéndice No. 3), y apéndice no. 4.

6.1.1 Alteraciones y características genéticas de las variedades en estudio.

Antes de discutir cada uno de los efectos fisiológicos, se considera de interés hacer una breve mención sobre algunos aspectos de mejoramiento relacionados con las variedades en estudio.

Ambas variedades se propagan esencialmente por autofecundación, con un porcentaje pequeño de cruzamiento natural, siendo cerca de un 5%. Debemos mencionar además que sus genótipos por lo tanto son altamente homocígotos, especialmente en la var. Jutiapán, mejorada por cruces y autofecundaciones, siendo menos para la var. San Martín, que es derivada de selecciones de un material criollo. También sabemos que la base del mejoramiento en cultivos no produce variabilidad sino que actúa sobre ella. Por lo que según trabajos realizados en inducción de mutaciones es aconsejable partir de materiales mejorados a los cuales se desea incorporar características deseables (50), tales como resistencia al frío o al calor, mejoramiento proteico, etc. No con esto debemos descartar la metodología normal de mejoramiento, sino adherirnos a ella, presentando una herramienta útil en la obtención de variabilidad por inducción de mutaciones de forma práctica y con el provecho de sus ventajas, al ser adecuadamente conducidas.

Las mutaciones observadas en la M_2 son ocasionadas por agentes mutagénicos (físicos o químicos) al entrar en contacto con la semilla original (M_1). En este caso se usaron rayos gamma (Co-60), tratando lotes de semillas con diferentes dosis de radiación. Cabe mencionar que las variedades que se usaron no tenían un buen porcentaje de pureza genética. Debido a la inexperiencia en el campo de mutaciones inducidas y tiempo limitado para el estudio, esto

repercutió más adelante en los resultados de la generación M_2 . Otro aspecto importante no contemplado fue el análisis de plantulas a nivel de invernadero con el fin de determinar la mejor dosis de irradiación. Sin embargo se considera que estos aspectos tuvieron poca repercusión sobre este trabajo, ya que el estudio de los cambios fisiológicos ocasionados por la radiación en la M_1 nos permiten escoger la mejor dosis y dar algunas recomendaciones para futuros trabajos con el frijol. Ahora bien los cambios en la M_2 , están relacionados con la dosis que se use y la mejor dosis se puede determinar a partir de los índices GR50 ó LD50. Tomando en cuenta lo anteriormente expuesto podemos decir que además del efecto mutagénico que es transmitido para otras generaciones (M_2 , M_3), las radiaciones pueden producir efectos fisiológicos y anatómicos, que se manifiestan únicamente en la generación M_1 (quimerismo).

Estos efectos anatómicos y fisiológicos serán analizados seguidamente para las diferentes dosis, en relación a aquéllas que causen drástica reducción en la sobrevivencia de la planta (+ del 20%), esterilidad, peso de semilla, No. de semillas por planta, plantas con manchas cloróticas, reducción en la altura de la planta y emergencia o germinación en condiciones de campo y de laboratorio (ver del Cuadro No. 7 al No. 12).

CUADRO No. 7

NUMERO DE SEMILLAS POR PLANTA EN M₁

Tratamiento	Sem/plant Jutiapan	No. plant x Trat.	%	Sem/plant Sn. Martin	Plantas X Trat.	%
Testigo	84	63	100	70	69	100
8 kR	88	66	105	73	69	104
15 kR	58	60	69	74	63	105
20 kR	40	57	48	55	61	78
30 kR	41	53	49	56	37	80

CUADRO No. 8

NUMERO DE PLANTAS SOBREVIVIENTES A LA FLORACION M₁

Trat.	Bloque I	Bloque II	Bloque III	Bloque IV	Bloque V
<u>Var. JUTIAPAN:</u>					
0 kR	13	14	12	14	10
8 kR	13	15	12	12	14
15kR	13	14	14	13	9
20kR	13	14	12	8	10
30kR	14	4	11	13	11
<u>Var. Sn. Martin:</u>					
0 kR	14	14	14	14	13
8 kR	14	14	14	13	14
15kR	14	12	14	12	11
20kR	13	10	13	14	11
30kR	7	9	7	6	8

= El tratamiento más fuerte ha afectado la sobrevivencia.

RENDIMIENTO QUE SE OBTUVO EN LA
1ra. GENERACION EN LA VARIEDAD
JUTIAPAN

CUADRO No. 9

NUMERO DE SEMILLAS

	BLOQUE I	BLOQUE II	BLOQUE III	BLOQUE IV	BLOQUE V	Total de Semillas
Testigo	587	1555	407	1242	1500	5291
8 Kv	1170	1316	1145	758	1425	5814
15 Kv	496	819	904	839	313	3470
20 Kv	775	337	715	350	85	2262
30 Kv	876	150	452	31	655	2164

PESO DE 100 SEMILLAS EN GRAMOS

	BLOQUE I	BLOQUE II	BLOQUE III	BLOQUE IV	BLOQUE V
Testigo	19.1	19.5	23	23.5	20
8 Kv	20	18.5	18	18	21
15 Kv	26	19.5	19.5	16.5	21.5
20 Kv	23.1	19.5	21.5	20.5	23
30 Kv	20.5	19	21.5	21.5	20.5

6.1.2 Bajo porcentaje de germinación en el campo, letalidad, reducción en crecimiento y desarrollo de las plantas.

Según Yankulov, Isasi y Abreu (1980) (53). Estos efectos se manifiestan solamente en la generación M_1 . La reducción en la altura de plantulas, es un índice que se usa para determinar la mejor dosis de irradiación; sin embargo en el presente estudio esto no se realizó. Pero sí se hicieron mediciones alrededor de los 15 días, cuando la primera hoja termina su crecimiento y luego su altura de planta en la época de floración, siendo los mismos resultados para la altura a la madurez fisiológica o en época de cosecha del cultivo (apéndice No. 3).

La altura de plantulas y altura a la madurez fisiológica es un método sencillo para determinar el efecto de un tratamiento mutagénico en una semilla (34). Generalmente si la dosis es alta unido a este efecto también se espera un retardamiento de la cosecha. Si se sigue el criterio GR_{50} , o disminución en un 50% de la altura de la planta o bien el criterio LD_{50} , o letalidad para un 50% de los individuos tratados (34). Hemos enfocado este criterio debido a que no observamos tal incidencia de letalidad o crecimiento en el campo, por lo que podemos decir que nuestras dosis no han alcanzado ninguno de los criterios. Sin embargo nuestro estudio estaba orientado a detectar menores efectos (31), (Cuadros 23,28).

La semilla de plantas sometidas a dosis altas y bajas no presentan ninguna diferencia en cuanto a su apariencia y tamaño. en la M_1 se hizo mayor resiembra en las dosis altas, especialmente en los tratamientos de 20 y 30 kR, como es de esperarse. Esta letalidad no se manifestó en la siguiente generación. Esto está de acuerdo con la literatura consultada.

De acuerdo al análisis estadístico (apéndice No. 4) en la var. Jutiapán no hubo diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo, pero sí son altamente significativos para la var. San Martín, especialmente el tratamiento de 30 kR que provocó un 34% de la disminución de la altura (Cuadro No. 28). Considerando además la altura de planta, las variedades San Martín y Jutiapán tuvieron un GR de 30 y 20 respectivamente, un $GR=50$, es considerado el óptimo. Esto significa que en ambas variedades podemos aumentar la dosis en investigaciones futuras, guardando las mismas condiciones en que fueron tratadas estas semillas. De acuerdo a Gaul, (1963) (34), en trabajos con radia-

ción gamma para obtener suficientes mutantes, las dosis adecuadas en cereales son aquéllas que causan de un 30 a 50% de reducción del crecimiento en las plantas (GR). Existen investigadores que prefieren usar dosis bajas pues las altas están generalmente asociadas a aberraciones cromosómicas, letalidades y esterilidad.

6.1.3 Sobrevivencia, Esterilidad, Peso de 100 semillas, Número de semillas por planta y Manchas cloróticas.

En la sobrevivencia y la emergencia de plántulas en el campo se observó que las mayores dosis afectaban en mayor grado; es decir que existe una correlación directa entre las dosis y los daños que causan (Cuadro No. 8). En el caso de la prueba de germinación en el laboratorio de las semillas irradiadas, en donde se probaron alrededor de 12 diferentes dosis (de 8 hasta 40 kR) no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. (Esto no está de acuerdo con lo reportado para Phaseolus vulgaris por otros autores. Posiblemente se incurrió en algún error de dosimetría ya que una dosis de 40 kR debería de haber causado una alta letalidad).

En cuanto a sobrevivencia, no se encontró mayor efecto significativo para Jutiapán (Cuadro No. 8), este dato fue influenciado por la resiembra de la M_1 . En los tratamientos de 20 y 30 kR, se realizó mayor resiembra. No sucedió así en la var. San Martín como se mencionó antes (apéndice No. 4, Andevas 22,23). Se reconoce que la resiembra desvirtuó parte del análisis en lo referente a la influencia de la irradiación sobre las características estudiadas. En la M_1 se presenta muy poca manifestación de manchas cloróticas o clorofílicas, se observó que la mayoría de estas plantas no sobreviven para la siguiente generación y son completamente estériles, muriendo a los pocos días de haber emergido. Esto concuerda en parte con Blixt, Ehrenberg y Gelin 1960 (2); Zacharías y Ehrenberg, (1962) (54). Blixt observó, en Suecia, manchas cloróticas en arveja y notó que éstas eran más típicas de la M_1 , pero también vio que la mayor parte de las plantas clorofílicas de la M_2 , eran obtenidas de plantas que tenían estas manchas (51). Por lo tanto se puede recomendar que se seleccione las plantas M_1 que presenten más manchas y sectores cloróticos y ver qué sucede en la M_2 , comparándolas entre ellas mismas y con el testigo.

RENDIMIENTO QUE SE OBTUVO
EN LA 1ra. GENERACION EN LA
VARIEDAD SAN MARTIN

CUADRO No. 11

NUMERO DE SEMILLAS

	BLOQUE I	BLOQUE II	BLOQUE III	BLOQUE IV	BLOQUE V	Total de Semillas
Testigo	282	1441	1304	491	1287	4805
8 Kv	849	1067	1019	690	1390	5051
15 Kv	826	912	900	1060	941	4639
20 Kv	631	602	873	707	554	3367
30 Kv	161	325	539	376	674	2075

PESO DE 100 SEMILLAS EN GRAMOS

	BLOQUE I	BLOQUE II	BLOQUE III	BLOQUE IV	BLOQUE V
Testigo	26.6	28.5	26.5	26.5	27.5
8 Kv	31	26.3	27.5	29.5	27.5
15 Kv	30.5	28	28	29.5	29.5
20 Kv	31	27.5	30.9	29.5	26.5
30 Kv	37.5	29	28	28	29

Comparando dos repeticiones del tratamiento de 15 kR, en el peso de 100 semillas, una de 26 gr. y otra de 16 gr/100 sem., se observó una variación alta (Cuadros No. 9 y 11), se supone que ésto es debido al efecto fisiológico de la radiación en la M_1 y al efecto del ambiente. Es decir en las dos variedades no se halló diferencia significativa para el peso de 100 semillas por planta. Probablemente fue el No. de vainas el que disminuyó. Esto se puede relacionar también con la baja esterilidad a mayores dosis. Si el No. de semillas/tratamiento tuvo una diferencia significativa, pero no el peso de las mismas, de ésto puede concluirse que en todos los tratamientos, se obtuvo un número de semillas por vaina, esperaríamos mayor peso de semillas para algunos tratamientos, si se hubiese alterado el número de semillas por vaina. El número reducido de semillas/tratamiento observado en la M_1 , para 20 y 30 kR (Cuadros No. 7, 9 y 11) en ambas variedades (apéndice No. 4, andevas 18,25) se debió al No. de plantas sobrevivientes. Lo mismo ocurrió en altura de planta, en la var. Jutiapán.

Al analizar la floración en la var. Jutiapán se observó una menor floración en los tratamientos de 20 y 30 kR, ésto pudo ser debido a una caída de la flor. Esto no tiene ninguna relación con el No. de semillas/planta. Por lo tanto el No. bajo de semillas en los tratamientos de 20 y 30 kR se debe al hecho de que hubo un menor No. de plantas sobrevivientes y una alta oborción de flores, especialmente para la var. Jutiapán.

6.1.4 Consideraciones finales.

Tomando en cuenta las dosis más altas a que fueron sometidas las semillas, su efecto no se compensó con los abonos. La tendencia más marcada fue la disminución del No. total de semillas por tratamiento, especialmente el de 30 kR tanto para la var. Jutiapán que disminuyó en un 50%, como para la San Martín que mermó hasta cerca del 58%.

Se pretendía que los datos de sobrevivencia presentados en Cuadro No. 8 y apéndice No. 4, andevas 22 y 23; fueran usados como criterio para seleccionar la dosis más adecuada (LD50). Sin embargo se ve que las dosis más altas no alcanzaron establecer este criterio y por lo tanto se recomienda en futuras investigaciones hacer un análisis más exacto de la dosimetría.

FIGURA No. 5

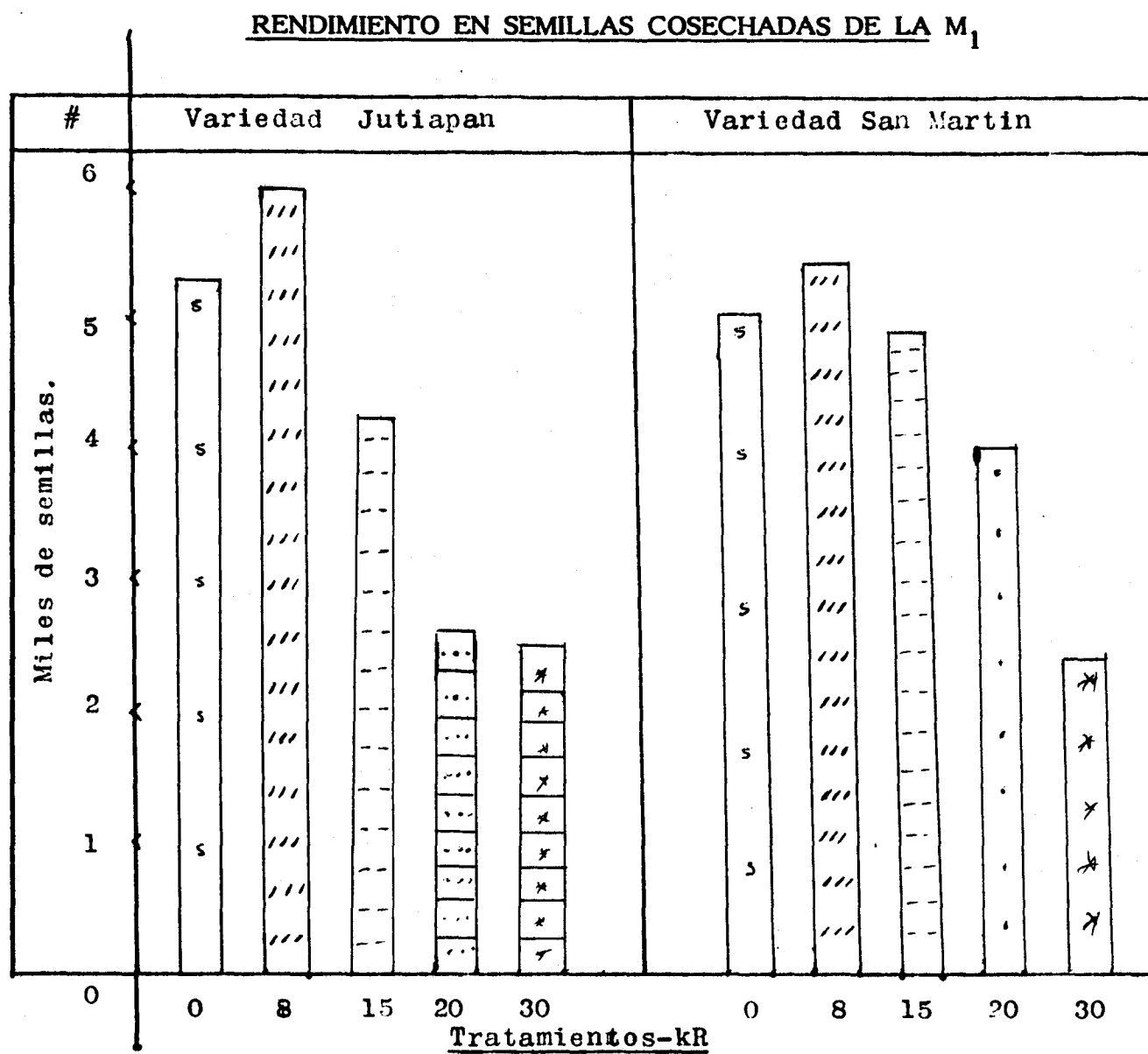
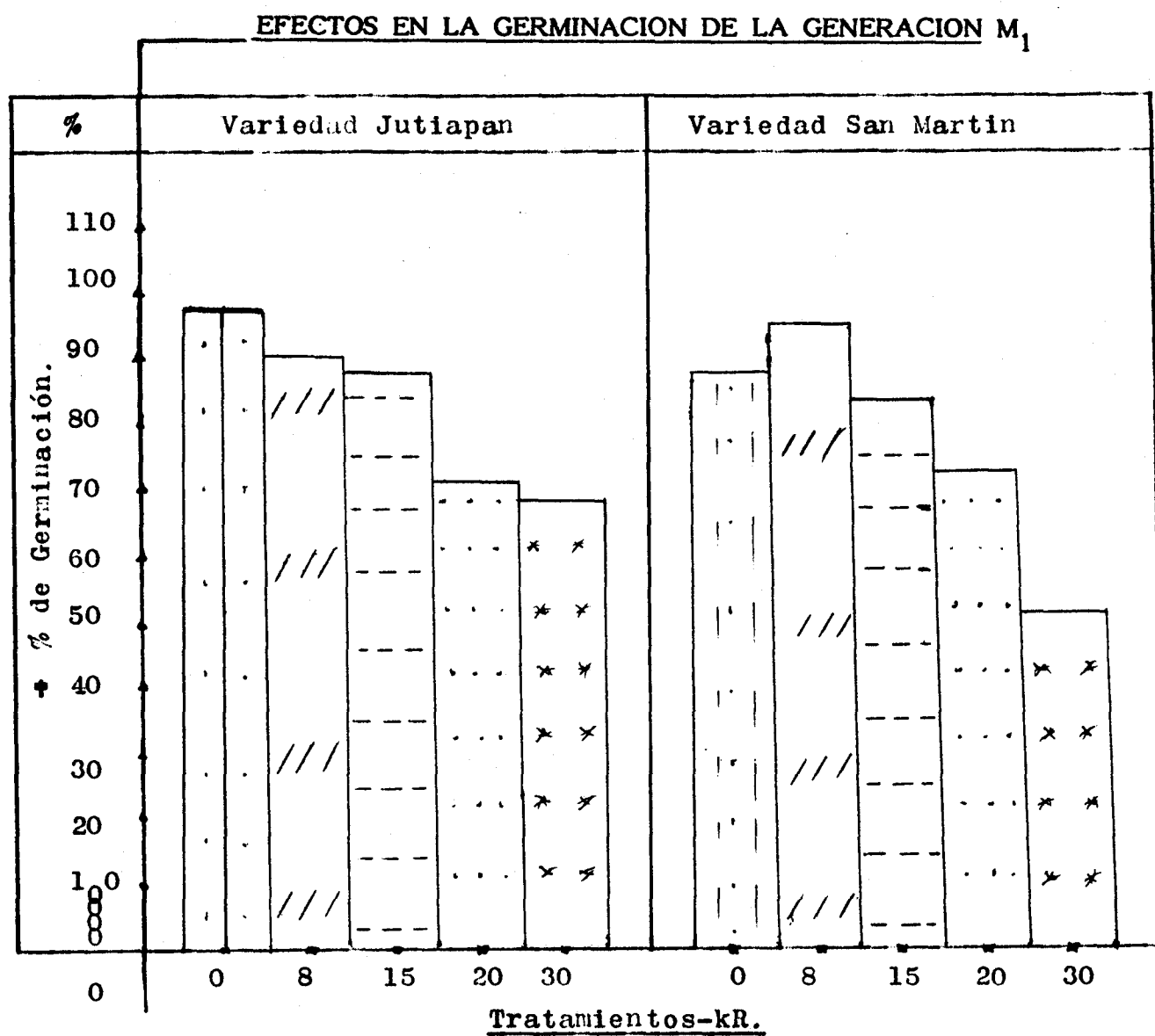


FIGURA No. 6



† = El % es en relación al número total de plantas sembradas por tratamientos en M_1 .

6.2 Cambios genéticos en la generación M_2 .

En esta generación es donde aparecen las mutaciones de diferentes tipos, que son identificadas por distinto fenotipo en algunas o más características, en relación al testigo. Estos cambios provienen de las alteraciones causadas por el agente mutagénico en el ADN de la planta (22,34,47).

En general el embrión de una semilla lleva en sí varias células iniciales para la formación de una planta completa o partes de la misma. Al ser irradiadas estas células pueden ocurrir mutaciones al azar, que generarán variación y heterogeneidad dentro de la población y segregación en las siguientes generaciones. Es de interés mencionar en esta discusión, que durante el desarrollo de las células iniciales afectadas, se pueden dar en la planta dos tipos de selección: diplontica o intrasomática y haplontica o gamética. La diplontica actúa desde la irradiación de la semilla y la haplontica ocurre desde el inicio de formación de los gametos (22). Así suponiendo que tenemos condiciones normales sin selección, la ocurrencia de una mutación recesiva sería de 0.25, según las leyes de Mendel, pero si ocurre una mutación recesiva en dos células iniciales, posteriormente su tasa de segregación sería de 0.125, esto será discutido con mayor amplitud. Nuestro enfoque se basa en que debido a dichos factores, las mutaciones morfológicas esperadas en una población no muy grande serán escasas o de tasas bajas. Otros tipos de mutaciones que son mencionados por varios autores, entre ellos Tullman Neto (51), son las mutaciones clorofilicas, relacionadas con la eficiencia mutagénica o sea con la efectividad del mutagénico para producir mutaciones (18,21).

6.2.1 Mutaciones Clorofilicas.

Este tipo de mutación no presenta mayor utilidad a simple vista, en su mayoría son plantas con franjas cloróticas, albinas, plantas verde claro, carentes de cloroplastos o bien como pudimos observar plantas completamente amarillas, con poco vigor y desarrollo. Kawai (1969), Halsel y Mikaelson (1968) consideran que son muy importantes por su relación con la eficiencia mutagénica. Al analizar en ambas variedades la cantidad de mutaciones clorofilicas/tratamiento y la frecuencia de mutaciones clorofilicas/100 plantas, en forma general, se observó que al incrementarse la radiación, también se

incrementaba el No. de mutaciones clorofílicas. Esto se notó hasta la dosis de 20 kR, luego se dio decrecimiento en la frecuencia mutacional de 30 kR (Cuadro No. 16 y apéndice No. 4). Esto concuerda con los resultados obtenidos por Moh y Alan en 1969.

Como se dijo antes las mutaciones clorofílicas pueden usarse como un indicador de la dosis más adecuada a usar. Así en nuestro caso la dosis de 20 kR tuvo una mayor frecuencia de mutaciones clorofílicas. Podría existir alguna asociación entre alta frecuencia de mutaciones clorofílicas y porcentaje de proteína, pero a la fecha entre los investigadores no hay un completo acuerdo acerca de esto. Por lo que es un criterio útil para sugerir la dosis, sin embargo no es absoluto.

También se realizó un análisis de regresión y correlación entre las mutaciones clorofílicas y los cambios morfológicos positivos (Cuadro No. 13, 14 y 15). En cuanto a esto sabemos que la frecuencia de mutaciones inducidas dependen de la naturaleza del genotipo a irradiar. En el presente caso ambas variedades se comportaron diferente en lo que respecta a la cantidad de mutaciones clorofílicas por 100 plantas. La var. Jutiapán estadísticamente tuvo mayor frecuencia de mutaciones clorofílicas por 100 plantas y mostró un mayor índice de características positivas. Esto está en concordancia en lo que se dijo antes, en cuanto a la correlación que existe entre estos dos aspectos.

Chomon (1972) demuestra que no hay correlación entre mutantes clorofílicos y mutaciones viables. Kawai (1969), menciona que los tratamientos con dosis altas no han producido mutantes con buena productividad. Tullman Neto (51), menciona que no sería ventajoso utilizar altas dosis, con frecuencia alta de mutaciones, si nuestro objetivo es la productividad o aspectos comerciales.

Tomando en cuenta todos los datos la var. Jutiapán fue la que se mostró menos sensible, sin embargo fue la que mostró mayor número y frecuencia de mut./clorofílicas/100 plantas. Esto pudo deberse a fallas en el proceso de selección de semillas M_2 . Hubiese sido mucho más efectivo sembrar todas las semillas provenientes de plantas M_1 , para tener mayor oportunidad de conseguir las mutaciones o cambios buscados. Cabe mencionar que el contenido de humedad en las semillas originales de ambas variedades no se estimó, por lo que no podemos decir o discutir acerca de su influencia en la frecuencia de mutaciones

corofilicas obtenida.

6.2.2 Mutaciones y cambios morfológicos en la generación M_2 .

La mayoría de mutaciones inducidas son recesivas, debido a ésto se obtienen en M_2 , otras en M_3 (31,40,48).

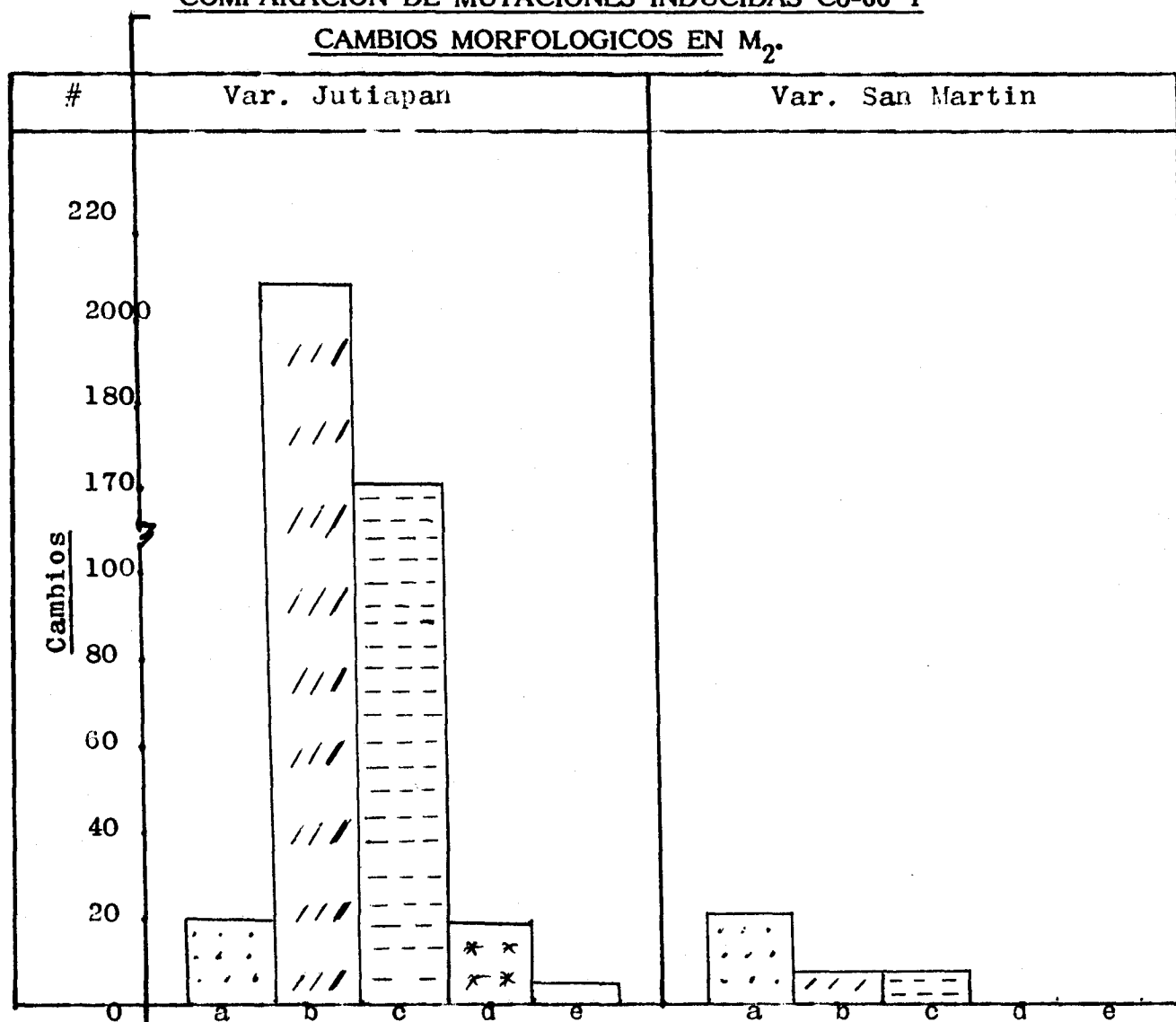
Se obtuvieron varios cambios en las plantas M_2 , a los que se llamaron cambios morfológicos, pero como discutiremos éstos en su mayoría no se consideran mutaciones. La mayor parte de los cambios morfológicos se obtuvieron en la var. Jutiapán (Cuadro No. 14).

Empezaremos analizando el cambio en el carácter o tipo de hábito de las variedades en estudio. En relación al hábito se le llamó inicialmente semideteminado, debido a la presencia de una flor minúscula en la punta de la guía y conservando sus características en forma de arbusto. Esto difiere de su clasificación en la var. Jutiapán como de Tipo II (Arbusto-indeterminado). Ahora bien se observó que el hábito Postrado-indeterminado o tipo III, es muy similar en la Jutiapán. Por ésto nos inclinamos a creer que estos cambios en M_2 se debieron a efectos ambientales en general (figura No. 2), ésto puede explicar la similitud de características en el hábito de crecimiento de las plantas observadas. Además en mutaciones inducidas se espera que la tasa o frecuencia de mutaciones morfológicas sea menor al 12.5% debido a efectos químicos. No sucedió así en cambios observados (no mutaciones), los cuales ocurren en una frecuencia alta. En el campo se observó que estos cambios aparecían por sectores, es decir por ejemplo en el bloque I y tratamiento de 15 kR, se seleccionaron 65 plantas, así se dio también para 8 kR y 20 kR (Cuadro No. 14). Esto no concuerda con el criterio de frecuencia de mutaciones inducidas esperadas. Con la característica de hábito de crecimiento se observó asociada la precocidad en floración y madurez de plantas de este tipo. Observándose bastante uniformidad o alta homogeneidad, ésto permite concluir que los genes para precocidad poseen una alta homocigosis. Pero se recomienda que estas plantas de acuerdo con la selección de proteína se evalúen en M_4 , en su fecha exacta de maduración, comparándolas con el testigo. Los precoces de la var. Jutiapán son altamente significativos en comparación al testigo.

En la var. San Martín se obtuvo una precocidad significativa con un rango de 2 a 3 días (Cuadro 15). En relación a ésto es recomendable para ambas

FIGURA No. 7

COMPARACION DE MUTACIONES INDUCIDAS Co-60 Y
CAMBIOS MORFOLOGICOS EN M₂.



Referencias :

a= mutaciones clorofilicas.

d= color de vaina

b= cambios morfologicos totales incluye, c,d,ye ..

e= Hoja ancha y gruesa.

c= precoces habito III

variedades, seleccionar los individuos más precoces y evaluarlos en su rendimiento en sucesivas generaciones, o establecer bien su precocidad, con el fin de que se puedan poner a disposición de mejoradores.

El color de la vaina era otro cambio estimado morfológico (apéndice No. 4, andeva 8 y cuadro 13). Las plantas diferían del color verde normal a un marrón oscuro, pero se estableció que provenían de plantas con las mismas características en M_1 , lo que indica presencia de impurezas, en el material original. Se recomienda hacer selección de pureza, en futuros estudios.

En relación a mutantes para color de flor y testa de la semilla no se obtuvieron en nuestro estudio (9), pero sí se recuperaron algunos mutantes para hoja ancha en la var. Jutiapán (apéndice No. 4, andeva 10 y cuadro 13), derivadas de mutaciones cromosómicas o macromutantes (26,42).

6.2.3 Consideraciones específicas sobre caracteres genéticos morfológicos, proteínicos y de selección en inducción de mutaciones.

a.) Cuando se da el caso que existan varias células iniciales, en el embrión del individuo tratado con dosis altas de radiación, podríamos obtener más de una mutación en una célula, por ejemplo, una selección y una mutación para precocidad. Esto puede darse y es un riesgo del aumento de dosis, por ello muchos investigadores no usan dosis altas (48).

b.) Como se vio, el número de cambios morfológicos es muy alto y se nota también que el número de semillas irradiadas en la M_1 fue bajo. Concluimos que no todos los cambios son debidos a mutaciones inducidas. ahora bien como se explica esta variabilidad. En cuanto a ésto se menciona lo siguiente: desde un inicio las variedades no fueron aisladas (fig. 2), aumentando de esta forma la posibilidad de cruces naturales, también el efecto de un distinto ambiente para la var. Jutiapán, pudo causar alteraciones. Se incluyen las mezclas de semillas en la var. original y el tipo de muestreo aplicado en semillas M_2 (Bulk/tratamiento). Constituye algo no usual en la metodología para mutaciones inducidas. Sin embargo se obtuvieron cambios positivos, por ejemplo en precocidad, hoja ancha y contenido de proteína. Además se obtuvo conocimientos de la aplicación de los daños fisiológicos causados por la radiación en M_1 en ambas variedades.

CUADRO No. 13

INDIVIDUOS MORFOLOGICOS POR TRATAMIENTO
ANALIZADOS PARA PROTEINA Var. JUTIAPAN

Ind. \ Trat.					
	0 kR	8 kR	15 kR	20 kR	30 kR
-Control	8	0	0	0	0
-Precoces Semideter- minados	0	26	41	65	0
-Clorofi- licos Anormales	0	2	4	4	0
-Hoja Ancha gruesa.	0	0	2	2	0
-Color de flor	0	0	0	0	0
-Color de vainas	0	0	0	8	3
-Color de grano	0	0	0	0	0
	8	28	47	71	3

CUADRO No. 14

INDIVIDUOS A ANALISIS DE LABORATORIO
INCLUYENDO MUTANTES ANORMALES

		Tratamientos				
Individuos		0 kR	8 kR	15 kR	20 kR	30 kR
Morfologicos.	Var. Jutiapan	8	28	47	82	3
	Var. Sn. Martin	8	4	0	3	1
Selección No Morfol.	Jutiapan	3	5	6	6	4
	Sn. Martin	3	4	6	5	3
		* analisis en duplicados y triplicados.				

CUADRO No. 15

CAMBIOS MORFOLOGICOS/TRATAMIENTO ANALIZADOS
PARA PROTEINA VAR. SAN MARTIN

Tratamientos.					
Individuos	0 kR	8 kR	15 kR	20 kR	30 kR
- Control	8	0	0	0	0
- Precoces	0	4	0	2	1
* Clorofil. Anormales	0	0	3	6	2
- Otros	0	0	0	0	0
Tot.	8	4	3	8	3

* no se tomaron en cuenta para analisis de laboratorio.

CUADRO No. 16

MUTACIONES CLOROFILICAS EN M₂
VAR. JUTIAPAN Y SAN MARTIN

Tratamiento en kR	Jutiapan mut/100 plantas	Sn. Martin mut/100 plantas	Jutiapan No. de mutantes	Sn. Martin No de mutantes
0	0	0	0	0
8	0.47	0	2	0
15	0.70	0.76	3	3
20	2.3	1.4	9	6
30	1.5	0.73	6	3

- Tc= 2.94 es significativo (5%). Existe poca diferencia entre var.
- Tc= 2.4 N.S. para analisis de diferencia con No. de mutantes.

CUADRO No. 17

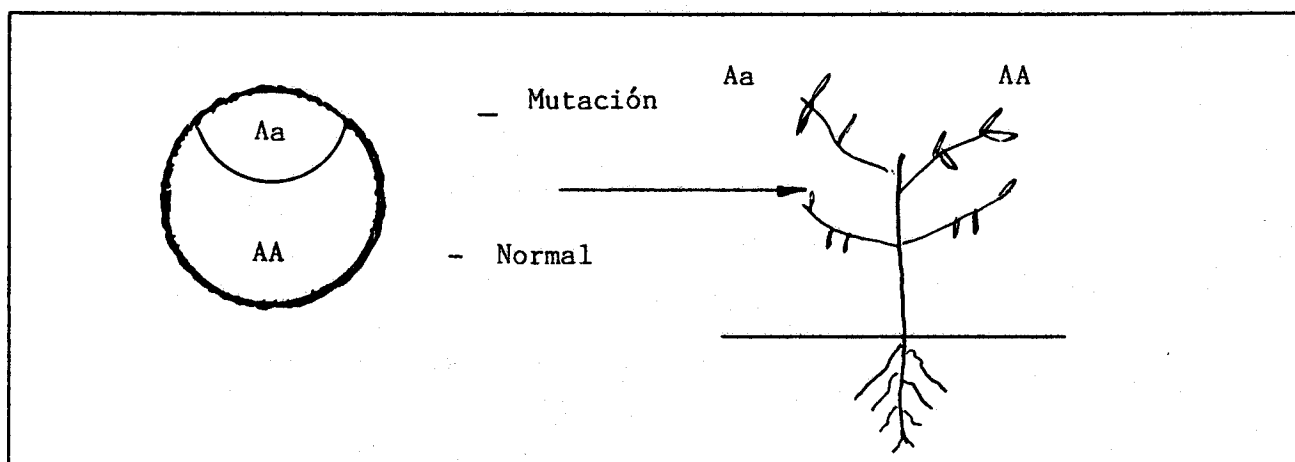
RESULTADOS ESTADISTICOS PARA PRECOCIDAD

Media de floración, Var. Jutiapan= 48 días (85% floración) Se efectua una prueba de $T = \frac{\bar{X} - U_0}{S_x}$ Media precoces= 39 días ; Tc= -10.87; altamente signific.
Media de cosecha, var. Jutiapan= 93 días . Media cosecha de precoces= 84 días . Tc= -23.53; altamente significativo.
Media de floración, Var. Sn. Martin= 31 días (85% floración) Se efectua una prueba de $T = \frac{\bar{X} - U_0}{S_x}$ Media precoces= 27 días ; Tc= -8.96; Significativa al 5%.
Media de cosecha, var. Sn. Martin= 90 días. Media cosecha precoces= 87 días ; Tc= -16.00; Significante.

c.) Es sugerido por Konsak y Mikaelson (1977), en relación a una metodología adecuada de selección y cultivo del material irradiado; es conveniente hacer una cosecha individual, luego propagar el material M_2 en progenies o líneas, utilizando de 20 a 40 semillas por planta, la razón se debe a que en su mayor parte las mutaciones son recesivas, por lo que al aumentar la población, estaremos aumentando la posibilidad de encontrar mutaciones.

d.) Consideramos hacer una breve reseña del problema de mutaciones y quimerismo (22). Imaginamos el embrión para facilitar el caso. Si se tienen dos células iniciales y una ha cambiado para manifestación recesiva en un gen (Aa) así: ver figura 8.

FIGURA No. 8
CAMBIOS QUIMERICOS



¿Qué sucede al sembrarla en M_1 ? En la formación de una parte de la planta tendrá genotipos Aa y otra parte AA. Luego en M_2 , si en la planta tenemos en total 40 semillas o vainas, entonces en las 20 semillas afectadas se tendrá o espera una distribución con 5= AA; 10= Aa; 5= aa, y en las 20 semillas normales se esperan sólo genotipos AA (todos). Ahora bien al hacer la suma de frecuencia de genotipos tendremos:

Sumatoria: 5 AA + 20 AA = 25 AA.

Así tenemos: 25 AA

10 Aa

5 aa.

Esto en toda la planta, entonces en lugar de observarse un 25%, según las leyes de Mendel, se tiene un 12.5% de mutación recesiva. La proporción disminuye más aún, si se aumenta el No. de células iniciales afectadas, por lo tanto también disminuye la proporción de mutaciones recesivas, ésta es la situación del quimerismo. Pero no siempre en un embrión se espera esta proporción debido a que se puede ver afectado por la muerte de células iniciales, en tal caso la célula de mutación recesiva o heterocigota es de proporción normal. Un tanto relacionado a esto es el hacer selección para productividad en generaciones avanzadas (31,34,37).

6.3 Variación en proteína para las muestras analizadas.

Según trabajos hechos para proteína se muestra que el porciento de proteína está sujeto a la influencia ambiental. Puede notarse su variación año con año o de generación a generación, por lo que se recomienda, hacer un estudio replicado en las generaciones avanzadas (M_4 , M_5), esto es con el objetivo de comprobar la persistencia de la característica en cada generación e ir haciendo selección en aquellos individuos que mantengan su porciento proteico (48). Otro factor a tomar en cuenta es la digestibilidad que posee la proteína, es conveniente que sea alta.

Con respecto al método utilizado (apéndice No. 2), la digestión Kjeldahl (9), en su fase de molienda de la semilla, se recomienda que el tamiz a usar para obtener la harina de semilla sea bastante fino ($X = 40$ mallas/pulg.) y si se incluye la cáscara, deberá homogenizarse bien la mezcla. Cabe decir que el embrión es la parte más rica en proteína, aportando aproximadamente el 48%, los cotiledones un 22% y la cáscara un 6%.

Es conveniente además estandarizar el método usando una proteína de referencia como la caseína (Dr. Bresani del INCAP, comunicación personal) o bien tomar un frijol estándar, digiriéndolo siempre que se analicen muestras, en forma periódica, pudiéndose conservar almacenado en forma de harina.

En cuanto a la selección del material analizado se pueden escoger algunos individuos con bajo porciento de proteína, con la visión de que a menos proteína sea mayor el porcentaje de metionina, por lo que es conveniente hacer selección de individuos con un 22% de proteína. También se recomienda no hacer análisis de taninos y fenoles, debido a que si se cocina el frijol y remueve el caldo,

se quita los efectos de flatulencia. Si se puede evaluar el material seleccionado, para tiempo de cocción, por ser más importante en la calidad proteínica del frijol.

6.3.1 Evaluaciones en generación M_3 .

Dentro de los individuos variantes seleccionados en M_2 y reproducidos en M_3 , resultó una variación para menor y mayor cantidad de proteína en porcentaje. Muchos resultados mostraron significancia con respecto al rango de proteína en el testigo (ver apéndice No. 2), por ejemplo en J/8/15 se presentó un 17.2% de proteína y el menor que se obtuvo fue de 16% de proteína en J/15/64. Mientras que otros dieron valores más altos como la muestra J/20/129 y la J/20/128 con 24% y 26% de proteína respectivamente y pertenecientes a los precoces indeterminados.

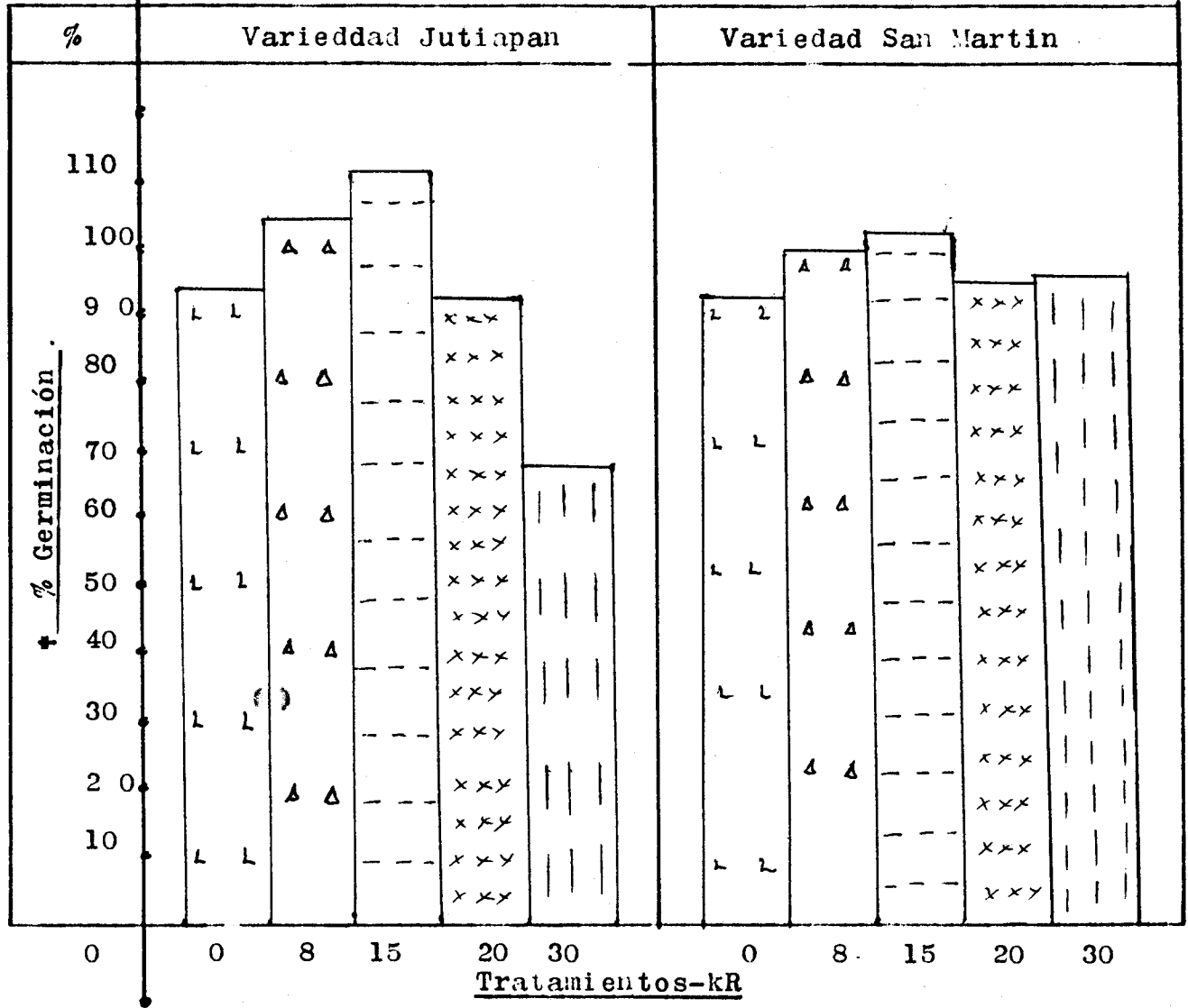
Basados en estos resultados se recomienda hacer una selección considerando el nivel intermedio y unos de menor %, para llevarlos a análisis de aminoácidos, Digestibilidad, cocción y nueva evaluación de proteína. Se pueden hacer análisis de NPR o eficiencia proteica, luego analizar este material con mezclas de otros granos en cuanto a contenido de aminoácidos deficientes y comparar con el valor nutritivo de la leche.

Se presentan en la tabla de análisis de proteína (apéndice No. 2), los individuos analizados con un rango de 16 a 26% de proteína. De acuerdo a este rango se tomarán aquéllos que tengan de un 23 a 26%, para una nueva evaluación replicada en M_4 . Luego los mejores individuos se llevarán a otro ensayo en M_5 . Dichos individuos provienen en su mayor parte de la var. Jutiapán.

En la selección al azar de las variedades, no se encontró grandes o mayores resultados, a excepción de algunos de 24 y 25% de proteína (apéndice No. 2), ésto debido al bajo número de plantas analizadas o seleccionadas. Se incluyen miles de individuos para trabajos con proteína, según Parodi (36), Konsak (20). Sin embargo los valores más altos son significativos por lo que se llega a la conclusión de que tanto los individuos variantes en morfología como los no morfológicos seleccionados al azar, pueden ser afectados por la radiación en el porcentaje de proteína. Esto también demuestra que las mutaciones para el carácter de proteína pueden darse muy al azar en ambos tipos de selección.

FIGURA No. 9

COMPARACION DE GERMINACION EN LA M₃
DE LA SELECCION, NO MORFOLOGICOS.



† = El % es referido al número de plantas sembradas en M₃.

7. CONCLUSIONES

- a. Se debe partir de materiales genéticos mejorados para realizar estudios de mejoramiento con mutaciones inducidas por irradiación.
- b. La inducción de mutaciones usando radiación gamma (Co-60), es una herramienta útil en la obtención de variabilidad para el mejoramiento de plantas.
- c. La irradiación aguda en frijol (Phaseolus vulgaris L.), provocó dos tipos de efectos: en M_1 produce efectos fisiológicos que sólo se manifiestan en esta generación, como reducción en altura, estimulación del coleoptilo a dosis bajas, disminución en el número de semillas, sobrevivencia, esterilidad y plantas clorofílicas. Luego en M_2 , se observan los efectos mutagénicos, en forma de macro y micro mutantes, como mutantes para tamaño de hoja, color de grano, precocidad y variación proteica.
- d. Los efectos fisiológicos de M_1 , son de buena utilidad para determinar la dosis a usar en base a los criterios LD_{50} y GR_{30-50} . En nuestro caso las dosis que alcanzaron un 20% de letalidad en M_1 son 20 y 30 kR, especialmente en la var. San Martín, y menos susceptible la var. Jutiapán.
- e. El tratamiento de 30 kR en la var. San Martín, llegó a provocar un 34% en disminución de altura en plantas, con menor emergencia en el campo. Esto indica una mayor sensibilidad de la var. San Martín que en la var. Jutiapán se pueden aumentar las dosis.
- f. En la var. Jutiapán se observó una merma en la floración, especialmente a dosis de 20 y 30 kR.
- g. En los resultados de tratamientos y cantidad de mutaciones clorofílicas/100 plantas, se observó que al incrementarse la dosis de radiación, se aumentaba también la frecuencia de mutantes clorofílicos, pero sólo hasta 20 kR, en 30 kR se observó una disminución. También se considera que aunque es un criterio muy útil para determinar eficiencia mutagénica y determinar dosis, no es absoluto. En nuestro caso coincide en la dosis a 20 kR, comparando el criterio de GR_{30-50} en M_1 ésta no es una conclusión definitiva.

- h. En ninguna de las dos variedades se encontró diferencia significativa, para el peso de 100 semillas, debido a la alta dispersión de datos, pero en general sí hubo una reducción del 58% para la var. San Martín. Probablemente fue el No. de vainas el que disminuyó. Esto se relaciona con la poca esterilidad y el menor número de plantas sobrevivientes a mayores dosis. Se agrega que en toda la población no se alteró el número de semillas por vaina.
- i. La germinación en laboratorio, donde se probaron dosis de 0 kR a 40 kR, no se observó ninguna diferencia significativa entre tratamientos.
- j. Si se desea causar efectos leves se recomienda utilizar dosis bajas, por su menor pérdida de mutaciones y su menor muerte de células, pero si se desean efectos drásticos asociados a aberraciones cromosómicas y esterilidades, se recomienda usar dosis altas. Los dos criterios son usados por los investigadores, según los objetivos de sus estudios (34).
- k. La selección del material a sembrar en M_2 , no es la más adecuada para trabajar con inducción de mutaciones (Bulk/trat.). No es necesario utilizar bloques al azar, durante las generaciones M_1 y M_2 . Sí es recomendable iniciar ensayos replicados de la generación M_4 en adelante. La var. menos sensible (Jutiapán), en M_1 , mostró en M_2 mayores cambios morfológicos, no mutaciones. Esto pudo deberse a que hubo mezcla de semillas en las variedades originales al no haber hecho selección en la M_1 , a la ocurrencia de cruces naturales o a otros factores ambientales.
- l. La mayoría de las mutaciones observadas en la M_2 pudieron deberse a efectos de la irradiación. Se esperaban tasas bajas de mutaciones (génicas, cromosómicas o extranucleares). Se encontró un mutante de hoja ancha estimada como mutación cromosómica.
- m. Se obtuvieron cambios positivos en contenido de proteína, aunque ésta característica está influenciada por el ambiente. En los análisis de M_3 se notó una variación en general del 16% al 26%. Tanto los individuos con variantes en la morfología como los aparentemente normales seleccionados al azar, mostraron variación en su porcentaje de proteína.

8. RECOMENDACIONES

- a. En futuros experimentos, se espera en M_1 , se tengan plantas de mayor competencia. Se tiene que el número de ramas secundarias es mayor, por eso se recomienda sembrar a menor distancia. Si es posible hacer un estudio químérico sobre la concentración de mutaciones en los nudos de la planta.
- b. Es aconsejable en trabajos de mutaciones inducidas por radiación gamma (Co-60), partir de materiales mejorados, a los cuales se desee incorporar características deseables. También es recomendable trabajar en especies de cultivos con poca variabilidad en el área, arroz, uva, etc. Siempre es conveniente, al irradiar semillas, saber el contenido de humedad, por su repercusión en los efectos fisiológicos en M_1 .
- c. Es necesario realizar un análisis a nivel de plantula en el invernadero de material irradiado para determinar la mejor dosis de irradiación de acuerdo a los objetivos buscados en el estudio. Generalmente se recomienda usar aquellas dosis que cause en la plantula una reducción del crecimiento de la primera hoja del 50% - 60% o una letalidad del 50% al 70%.
- d. De acuerdo a la selección para proteína, se recomienda que las plantas precoces y con cambio en el hábito de crecimiento, sean evaluadas en M_4 , para confirmación de dichas características. Además evaluar componentes de rendimiento o bien seleccionar por precocidad, almacenarlos y ponerlos a disposición de mejoradores.
- e. Se recomienda hacer un aislamiento de las variedades en el campo al inducir mutaciones, haciendo una cosecha individual en M_1 . También es conveniente propagar este material en M_2 , usando la metodología por progenies o bien el sistema de vainas por planta. Se recomienda además hacer un trabajo sobre selección en pureza varietal y seguidamente un estudio preliminar de dosis en base a los criterios de GR_{30-50} y LD_{50} , para todo cultivo de granos.
- f. Basados en los resultados y para fines del proyecto de mejoramiento nutri-

cional del frijol, se recomienda hacer una selección, considerando un equilibrio proteína-rendimiento, es decir escoger individuos de un 23 a 26%, de bajo contenido proteico e intermedios. Para proteína evaluar en ensayos replicados, notando su variación de generación a generación, digestibilidad o eficiencia proteica (NPR), tiempo de cocción y comparación al valor nutritivo de la leche. No es necesario hacer análisis de fenoles y taninos.

- g. En nuevos estudios para mejoramiento proteico, por inducción de mutaciones es conveniente irradiar y cultivar grandes poblaciones de plantas. Esto también es aplicable a la búsqueda de resistencia a enfermedades y en otros casos se pueden usar cruzamientos o técnicas tradicionales del mejoramiento.
- h. En cuanto a análisis bioquímicos y trabajos de irradiación es indispensable, cumplir con todas las precauciones y cuidados de laboratorio. En este sentido, se recomienda a la DGEN colocar el aparato irradiador (fuente de Co-60) en un sitio adecuado y protegido. En relación a los análisis de proteína o bromatológicos, se estima necesario y conveniente, contar con un laboratorio debidamente equipado y con personal capacitado.
- i. Es recomendable que el material de campo sea almacenado convenientemente en bodegas que contengan al menos un deshumidificador, estanterías, bolsas y cajas donde guardar e identificar el material obtenido. Además es necesario fumigar con cierta frecuencia para evitar la pérdida de dicho material.
- j. Es muy conveniente para trabajos de mejoramiento contar con un invernadero sencillo con sus accesorios, incluyendo un humidificador, un equipo de aereación (ventilador), macetas, mezcladores de material orgánico, etc.
- k. Se recomienda ampliar los estudios para plantas con propagación asexual, especialmente para frutales como durazno, melocotón, manzana y uva. Sería conveniente hacer estudios replicados en distintas localidades en cultivos de grano.

9. APENDICES

9.1 APENDICE No. 1

GUIA DE CUIDADOS TECNICOS Y CULTURALES CALENDARIZADOS DURANTE LAS GENERACIONES M₁, M₂, M₃.

Preparación del Terreno:

- Pasada de chapeadora.
- Aradura.
- Pasada de rastra- surqueo (2 veces).

Labores Agronómicas:

- Tratamiento del suelo
 - Insecticida (plagas del suelo)
 - Herbicida (Preemergente)
 - Afalon
- Siembra:
 - Var. Jutiapán.
 - Var. San Martín.
- Fertilizaciones:
 - 1ª Fertilización var. Jutiapán, var. San Martín
 - 2ª Fertilización var. Jutiapán, var. San Martín
- Tratamiento de plagas y enfermedades.

No. aplicaciones de insecticida + fungicida de acuerdo al apareamiento de infestación e infección o morbosidad del cultivo.
- Limpias manuales:
- Aporques
- Riegos:

Al existir $\pm$ un 40 de H° del suelo p.m.p.=
20% H° en suelo, textura franco arcillosa.
- Aplicaciones de Pesticidas en forma preventiva.

9.2 APENDICE No. 2

METODO MICRO-KJELDAHL

Reactivos y soluciones:

- a) Ac. Sulfúrico, 1.84 gravedad esp. N- libre.
- b) Oxido mercúrico rojo N-libre.
- c) Sulfato de potasio N-libre.
- d) Sol. Hidróxido de Sodio-Tiosulfato de sodio:
Disuelva 60 grs. NaOH y 5 gr. de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en agua y diluya a 100 ml. con agua desmineralizada. También puede hacerse añadiendo 25 ml. de tiosul. al 25% en 100 ml. de solución de NaOH al 50%.
- e) Sol. de Ac. Bórico; al 4% ó 6%.
- f) Sol. indicadora:
 - (1)- Solución de rojo de metilo-verde bromocresol; mezclar una parte 0.2% alcalina de solución rojo de metilo con 5 partes de solución verde bromocresol 0.2% alcalina.
 - (2)- Rojo de metilo-azul de metileno; mezclar 2 partes 0.2% alcalina de solución 0.2% de azul de metileno.
- g) Acido clorhídrico: 0.02 N- 0.04 N preparar tratando que todos los decimales de la normalidad sean anotados.

Aparatos:

- a) Digestor: de gas o electricidad, para calentar un balón de 30 ml., causando que 15 ml. de H_2O a 25 gra. centi., lleguen a su punto de ebullición entre 2 y 3 minutos.
- b) Aparato de Destilación: De una pieza, parnas Wagner, recomendado por el comité de aparatos microquímicos.
- c) Balones de digestión: Use balones de tipo soltys o balones Kjeldahl regulares, de 30-60 ml., para micro muestras.

Digestión:

- a) La muestra a analizar se debe moler a un calibre de 20 m mesh.
- b) Pesar la muestra molida 0.1 gr.

- c) Agregar 1.1 gr. de muestra digestora K_2SO_4 (1gr.) + HgO (0.1gr.) bien triturada, o bien, mezcla de sulfatos de Fe, Cu, K en relación 1:1:0.05.
- d) Agregar 2.5-3 ml. de Ac. sulfúrico (concentrado).
- e) agregar 4-7 perlas de vidrio para homogenizar la ebullición.
- f) Colocar en el digestor, previamente calentado, a los (#3 de manija) 15 minutos subir a # 5 y dejarlo por 2 horas hasta que la muestra esté cristalina. Para más rapidez, se puede utilizar agua oxigenada, grado reactivo, sólo cuando se usa HgO rojo.

Destilación:

- a) El agua destilada del balón del Micro-Kjeldahl debe estar caliente para que inicie con facilidad la ebullición de la muestra.
- b) Lavar bien cada balón con agua destilada y colocarla en la copa del aparato, esperar que caiga toda la muestra y se le añade 10 ml. de sol. alcalina ($NaOH + Na_2S_2O_3$). Esto se debe hacer con sumo cuidado, ya que la reacción que se produce es muy violenta y puede ocasionar la pérdida de la muestra.
- c) Se recibe el destilado en 15 ml. de ácido bórico al 4% con 5 gotas de indicador.
- d) Se reúnen 40 ml. del destilado (solución con amoníaco). Debe variar el ácido de morado a celeste.

Titulación:

Recogido el destilado se titula con ácido clorhídrico 0.01 a 0.04 N, aquí vira la solución de celeste a salmón. Se anotan los ml. gastados, porque se está cuantificando la cantidad de amoníaco.

- a) Cálculos:

$$\%N = \frac{V-B \times N \times 14.007 \times 100}{\text{Peso muestra (mg.)}}$$

$\%N$ = Porcentaje de Nitrógeno total.

V = ml. gasto de HCl B = ml. gasto testigo en blanco.

El resultado se multiplica por 6.25 (constante) para obtener el % de proteína en la muestra.

CUADRO No. 18

ANALISIS DE PROTEINA USANDO EL METODO MICRO/
KJELDAHL PARA 208 MUESTRAS SELECCIONADAS

Muestra	Peso muestra	ml. Gasto HCl.0351N	% N	$\bar{X}$ % Proteina	Observ.
1	0.1024 0.1041	5.3(-2) 10.6	2.54 4.0616	20.53	Cifras significativas tres. Ejemplo de la toma original de datos.
2	0.1032 0.1011	10.1 9.9	3.8588 3.8414	24.0	
3	0.1048 0.1058	9.4 9.3	3.4715 3.3923	21.14	
4	0.1059 0.1041	9.2 9.4	3.3426 3.4933	20.89	
5	0.1049 0.1041	9.1 9.4	3.3262 3.4933	21.3	
6	0.1037 0.1050	9.3 9.0	3.4166 3.3173	21.04	
7	0.1052 0.1053	8.7 8.6	3.1299 3.0802	19.4	
8	0.1037 0.1048	10.9 11.1	4.2177 4.2672	26.5	
9	0.1032 0.1048	9.5 9.3	4.6000 3.4232	23.3	
10	0.1048 0.1031	9.3 8.8	3.4232 3.2413	20.83	
Testigo	blanco	$\bar{X}$ = 2ml.	con 0.0333N HCl.		
Testigo	San Martin	=	% de Proteina	$\bar{X}$ = 22.8 %	
Testigo	Jutiapan	=	% de Proteina	$\bar{X}$ = 21.5 %	

Continuación de Analisis de Proteína. Precoces -Tipo III-Jutiapan.

Identif.	% de Proteína, $\bar{X}$.	Identif.	% de Proteína $\bar{X}$	identif.	% de Proteína $\bar{X}$
J/8/11	20.9	J/15/46	20.6	J/20/80	21.8
j/8/12	19.7	" /47	22.7	" /81	----
J/8/13	19.1	" /48	20.8	" /82	19.8
" /14	25.6	" /49	20.5	" /83	21.4
" /15	17.2	" /50	20.5	" /84	22.2
" /16	20.6	" /51	21.7	" /85	20.4
" /17	17.6	" /52	24.0	" /86	21.7
" /18	18.0	" /53	19.4	" /87	21.4
" /19	21.1	" /54	21.6	" /88	21.6
" /20	20.5	" /55	21.1	" /89	19.7
" /21	23.5	" /56	23.1	" /90	20.7
" /22	20.8	" /57	23.6	" /91	19.5
" /23	23.5	" /58	20.8	" /92	19.1
" /24	23.6	" /59	22.0	" /93	23.2
" /25	21.2	" /60	20.9	" /94	21.4
" /26	20.7	" /61	19.0	" /95	19.4
" /27	----	" /62	21.7	" /96	20.4
"15/29	24.0	" /63	18.8	" /97	19.9
" /30	16.4	" /64	16.3	" /98	21.6
" /31	23.3	" /65	19.7	" /99	19.3
" /32	22.9	" /66	20.3	" /100	18.9
" /33	22.0	" /67	21.7	" /101	20.3
" /34	22.1	" 20/68	19.8	" /102	20.8
" /35	24.3	" /69	23.1	" /103	20.2
" /36	17.7	" /70	17.7	" /104	19.8
" /37	22.3	" /71	21.4	" /105	20.9
" /38	22.1	" /72	21.1	" /106	19.8
" /39	21.9	" /73	20.4	" /107	17.7
" /40	18.4	" /74	19.9	" /108	18.6
" /41	20.7	" /75	----	" /109	18.8
" /42	19.6	" /76	22.8	" /110	18.7
" /43	21.8	" /77	22.2	" /111	21.1
" /44	21.8	" /78	16.7	" /112	20.8
" /45	21.3	" /79	18.3	" /113	17.6
				" /114	

Continuación Analisis de Proteína.

Identif.	% de Proteína $\bar{X}$.	Identif.	% de Proteína $\bar{X}$.	Identif.	% de Proteína $\bar{X}$.
J/20/115	18.1	Hoja Ancha-Gruesa		6 Selección	No Morfolog.
J/20/116	18.0	J/20/146	23.5	J/8/160	24.8
" /117	16.0	" /147	18.0	" /170	20.7
" /118	19.3	" /148	23.4	" /171	17.8
" /119	19.8	" /149	23.0	" /172	21.0
" /120	16.0	Fc= 2.26 N.S.		" /173	22.4
" /121	20.7			J/15/174	19.9
" /122	21.5	Color de Vaina.		" /175	22.8
" /123	21.2	J/20/150	22.8	" /176	23.6
" /124	21.3	" /151	26.6	" /177	23.3
" /125	26.1	" /152	25.22	" /178	18.1
" /126	20.4	" /153	24.0	" /179	17.5
" /127	21.3	" /154	17.0	" /181	22.0
" /128	24.2	" /155	25.7	" /182	25.2
" /129	26.0	" /156	22.1	" /183	22.7
" /130	17.6	" /157	25.0	" /184	25.6
" /131	22.8	" /158	27.5	" /185	21.4
" /132	20.4	" /159	24.0	" /186	24.2
Fc= 6 (altamente signific.)		" /160	26.4	" /188	21.6
		Tc=2.86 altamente significativa.		" /189	19.8
Clorofilicos Anormales./Jutiapan		Precoces Sn. Martin		Fc= 1.97 N.S.	
J/8 /133	22.8			SnM/8/190	21.5
" /134	23.3	J/8/161	23.4	" /191	21.8
" /135	23.6	" /162	23.4	" /192	20.9
" /136	24.8	" /163	20.8	" /193	21.4
" /137	22.0	" /164	21.5	" 15/194	20.2
" /138	23.9	" /165	25.0	" /195	25.3
" /139	23.9	" /167	26.7	" /196	22.2
" /140	21.9	" /168	23.0	" /197	19.9
" /141	22.9	Fc= 1.16 N.S.		" /198	22.2
" /142	25.6			" /199	21.3
Fc= 2.24; N.S.				" 20 /200	22.2
				" /201	24.8
				2 /202	21.2
				" /203	21.5
				" /205	22.7
				" /206	23.8
				" /207	21.3
				Fc=.67 N.S.	
				" /204	21.5

9.3 APENDICE No. 3

CUADRO No. 19

GERMINACION DE LA VARIEDAD JUTIAPAN EN EL CAMPO

BLOQUE I	No. de Plantas Germinadas	% de Germinación
Tratamiento A	28	100
Tratamiento B	28	100
Tratamiento C	28	100
Tratamiento D	28	100
Tratamiento E	28	100
BLOQUE II		
Tratamiento A	27	96
Tratamiento B	28	100
Tratamiento C	28	100
Tratamiento D	28	100
Tratamiento E	19	67.8
BLOQUE III		
Tratamiento A	28	100
Tratamiento B	24	85.7
Tratamiento C	28	100
Tratamiento D	20	71.4
Tratamiento E	26	92.8
BLOQUE IV		
Tratamiento A	28	100
Tratamiento B	24	85.7
Tratamiento C	21	75
Tratamiento D	13	46.4
Tratamiento E	17	60.7
BLOQUE V		
Tratamiento A	25	89.3
Tratamiento B	28	100
Tratamiento C	25	89.3
Tratamiento D	20	71.4
Tratamiento E	17	60.7

Lectura: Junio 3, 1982, 7 días después de la siembra.

CUADRO No. 20

ALTURA DE PLANTAS DE LA VARIEDAD JUTIAPAN*

		Plantas Izquierda							Plantas Derecha						
BLOQUE I		1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
Tratamiento	A	23	16	14	13	9	15		30	22	7	30	30	30	30
Tratamiento	B	16	30	20	30	29	30	30	27	30	33	23	30	22	
Tratamiento	C	25	28	32	13	15	25	26	33	31	38	23	40	37	
Tratamiento	D	30	20	20	15	27	25		29	30	28	27	32	24	23
Tratamiento	E	24	30	10	20	20	23	26	17	19	28	8	20	20	30
BLOQUE II															
Tratamiento	A	25	25	25	26	25	26	26	26	31	33	26	26	29	29
Tratamiento	B	15	24	22	22	20	22	25/20	24	29	20	25	25	24	29
Tratamiento	C	22	25	22	15				25	28	31	10	15	27	20
Tratamiento	D	13	15	10	15	22	22	25	12	14	10	30	23	23	20
Tratamiento	E	12							23	15	13				
BLOQUE III															
Tratamiento	A	15	15	14	10	14			22	9	14	14	13	19	27
Tratamiento	B	23	30	23	17	25	17	20	24	17	17	23	25		
Tratamiento	C	24	25	23	25	24	23	25	15	17	17	23	13	27	28
Tratamiento	D	15	25	20	25	25	20		9	15	10	17	19	17	
Tratamiento	E	15	8	15	16	16	23		10	20	10	18	12		
BLOQUE IV															
Tratamiento	A	30	27	27	26	27	26	28	14	10	12	24	29	20	10
Tratamiento	B	15	10	12	16	25	23	24/24	25	9	20	20			
Tratamiento	C	14	20	20	14	14	15		20	30	19	21	14	11	12
Tratamiento	D	7	9	10					23	24	22	19	18		
Tratamiento	E	30	27	27	26	27	26	28	17	10	5	5	8	9	
BLOQUE V															
Tratamiento	A	23	23	24	23	25	23	22	20	28	16				
Tratamiento	B	24	24	24	28	25	24	20	25	20	10	25	26	11	11
Tratamiento	C	10	10	22	23				10	20	15	23	21		
Tratamiento	D	12	16	12	12	12	12	12	12	10	7				
Tratamiento	E	20	18	20	18	22	22	20	20	20	10	10			

*Alturas tomadas a los 45 días después de la siembra del nivel del suelo al punto de crecimiento (cogollo) de la planta.
 Altura en cms.

CUADRO No. 21

FLORACION DE LA VARIEDAD JUTIAPAN*

BLOQUE I	Nro. de Plantas con Flor	% de Floración
Tratamiento A	8	57.1
Tratamiento B	13	92.8
Tratamiento C	15	100
Tratamiento D	12	85.7
Tratamiento E	8	57.1
BLOQUE II		
Tratamiento A	15	100
Tratamiento B	15	100
Tratamiento C	9	64.3
Tratamiento D	9	64.3
Tratamiento E	1	7.1
BLOQUE III		
Tratamiento A	7	50
Tratamiento B	12	85.7
Tratamiento C	10	71.4
Tratamiento D	8	57.1
Tratamiento E	4	28.6
BLOQUE IV		
Tratamiento A	12	85.7
Tratamiento B	8	57.1
Tratamiento C	8	57.1
Tratamiento D	5	35.7
Tratamiento E	2	14.3
BLOQUE V		
Tratamiento A	9	64.3
Tratamiento B	13	92.8
Tratamiento C	6	42.9
Tratamiento D	2	14.3
Tratamiento E	8	57.1

* Lectura tomada el 13 de julio de 1982.

CUADRO No. 22

GERMINACION DE LA VARIEDAD SAN MARTIN EN EL CAMPO

BLOQUE I	No. de Plantas Germinadas	% de Germinación
Tratamiento A	27	96.4
Tratamiento B	28	100
Tratamiento C	22	78.6
Tratamiento D	20	71.4
Tratamiento E	9	32.1
BLOQUE II		
Tratamiento A	25	89.3
Tratamiento B	30	100
Tratamiento C	23	82.14
Tratamiento D	16	57.1
Tratamiento E	8	28.6
BLOQUE III		
Tratamiento A	27	96.4
Tratamiento B	28	100
Tratamiento C	26	92.8
Tratamiento D	21	75
Tratamiento E	20	71.4
BLOQUE IV		
Tratamiento A	27	96.4
Tratamiento B	27	96.4
Tratamiento C	27	96.4
Tratamiento D	23	82.14
Tratamiento E	17	60.7
BLOQUE V		
Tratamiento A	24	85.7
Tratamiento B	28	100
Tratamiento C	23	82.14
Tratamiento D	21	75
Tratamiento E	11	39.3

Lectura: Junio 3, 1982; 7 días después de la siembra.

CUADRO No. 23

ALTURA DE PLANTAS DE LA VARIEDAD SAN MARTIN*

		Plantas Izquierda							Plantas Derecha						
BLOQUE I		1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
Tratamiento	A	20	28	25	25	10	10	10	15	20	10	9	9	25	30
Tratamiento	B	25	28	28	35	34	26	24	20	31	32	30	30	35	30
Tratamiento	C	16	23	20	20	32	30	30	20	12	14	9	4	29	30
Tratamiento	D	20	16	20	20	20	18	20	25	6	20	28	20	30	
Tratamiento	E	9	23						8	8	30	10	22		
BLOQUE II															
Tratamiento	A	32	34	34	32	32	32	34	19	19	16	22	32	34	12
Tratamiento	B	25	32	30	30	26	32	30	29	20	24	35	24	25	30
Tratamiento	C	20	24	24	23	25	25		20	20	30	30	22	30	
Tratamiento	D	20	20	20	22	22	20		6	21	20	22			
Tratamiento	E	7	20	15	9				23	7	7	6	11		
BLOQUE III															
Tratamiento	A	30	10	20	28	28	28	30	35	20	25	31	33	30	33
Tratamiento	B	25	24	28	20	28	25	28	24	28	32	28	30	12	30
Tratamiento	C	22	24	22	18	18	20	20	30	33	40	20	20	21	15
Tratamiento	D	22	20	28	20	24	20	24	13	30	18	10	12	10	
Tratamiento	E	18	24	16	18				19	10	10				
BLOQUE VI															
Tratamiento	A	24	24	24	30	22	22	22	30	23	30	13	25	20	10
Tratamiento	B	24	24	24	30	24	24		38	15	30	29	29	29	30
Tratamiento	C	24	24	26	26	25	24	22	31	26	38	22	22		
Tratamiento	D	20	25	23	20	25	25	23	10	10	15	14	30	30	30
Tratamiento	E	20	25	14	18				25	14					
BLOQUE V															
Tratamiento	A	30	30	30	30	28	20		30	20	30	12	20	20	21
Tratamiento	B	32	30	30	30	30	30	30	31	30	29	30	22	40	32
Tratamiento	C	24	26	28	30				21	10	20	24	28	39	14
Tratamiento	D	20	15	16	17				21	20	20	12	19	17	17
Tratamiento	E	15	20	28					8	12	18	19	10		

* Alturas tomadas a los 45 días después de la siembra; del nivel del suelo al punto de crecimiento (cogollo) de la planta.
Altura en cms.

9.4 APENDICE No. 4

CUADRO No. 24

CUADROS GENERALES DE ANDEVAS, M_1 , M_2 , M_3 .

Andeva No. 1: "Sobrevivencia"; plantas con fruto lleno, estado de ejote y a la madurez, M_2 . Fecha: 26/Nov./82. San Martin. Fc.= 0.63 ; CV= 7% No significativo.
Andeva No. 2: "Sobrevivencia"; plantas con fruto lleno, estado de ejote y a la madurez o cosecha. 22/Nov./82. M_2 . Jutiapán; Fc+= 1.46 ; CV= 4% ; Ft= 3.001 ; N.S.
Andeva No. 3: "% de emergencia en campo"; Var. Jutiapán, M_1. 3/Jun./82; 7 días despues de siembra. Fc= 3.5 ; CV= 7% ; Significativo, ver Prueba Tukey.
Andeva No. 4: "% de Emergencia para la var. San Martin. 3/jun/82. Fc= 25.27 CV= 6% ; Significativo (ver Tukey)
Andeva No. 5: "Efecto en altura", M_1, var. Jutiapán. 10/jun/82. datos similares a los 47, 47 días d.s. (cms.) Fc= 2.4 CV= 15% ; No Significativo.
Andeva No. 6: Efecto en altura", M_1, var. san Martin. 10/jun/82 datos similares a 45,47 días desp. de siembra,(cm.) Fc= 15.17 CV= 12% ; Significativo al 5 %
Andeva No. 7: Producción cambios morfológicos", M_2, var. Jutiapán. Fc= 3.5 CV= 32% Significativo (ver Tukey).
Andeva No. 8: Cambios en color de vaina", M_2, var. Jutiapán. Fc= 1.79 CV= 31% ; No significativo.
Andeva No. 9: considerado no necesario , Color de Flor.
Andeva No. 10: Mutaciones en Hoja Ancha. var. Jutiapán. Fc= 7.5 CV= 32% ; Significativo.

Continuación Andevas.

Andeva No. 11: Mutaciones Clorofílicas-Anormales, M ₂ , var. Jutia. Fc= 1.5 CV= 32 ; N. S.
Andeva No. 12: Cambios en el tipo de habito, M ₂ , var. Jutiapán. Fc= 1.88 CV= 50% ; N. S.
Andeva No. 13: Cambios/trat. en var. San Martin , M ₂ Fc= 1.5 CV= 29% ; N.S.
Andeva No. 14: Cambios en precocidad, var. San Martin M ₂ . Fc= 0.67 CV= 29% N.S.
Andeva No. 15: Mutaciones clorofílicas-anormales, San Martin, M ₂ . Fc= 1.4 CV= 26.53% ; N. S.
Andeva No. 16: "Numero de Semillas", M ₁ , Var. Jutiapan. Fc= 3.44 CV= 31 Significativo.
Andeva No. 24: "Esterilidad" No. sem/planta, M ₁ , Jutiapan. Fc= 2.77 ; CV= 28.56 ; N. S.
Andeva No. 17: "Peso de 100 semillas", en gramos, M ₁ , Jutiapán. Fc= 0.969 CV= 10% ; N. S.
Andeva No. 18: "Número de semillas", M ₁ , var. San Martin. Fc= 4.44 CV= 18% Significativo-.
Andeva No. 25: "Esterilidad", No.sem/planta, M ₁ , San Martin. Fc= 1.19 CV= 7% ; N. S.
Andeva No. 19: "Peso de 100 semillas", M ₁ , en gramos, San Martin Fc= 1.74 CV= 15% ; No. S.
Andeva No. 20: Peso total de semillas, var. Jutiapan. Fc= 3.0 CV= 7% ; N. S.
Andeva No. 21: Peso de total de semillas, var. Jutiapan. Fc= 3.0 CV= 31% ; No significativo.

Continuación Andevas.

ANDEVA No. 22 : "Sobrevivencia", No. de Plantas con flor, 60%
 M_1 , a los 45 días, Jutiapan.
 $F_c = 0.81$; $CV = 12\%$; No significativo.

Andeva No. 23 : "Sobrevivencia", No. de plantas con flor, 60%
 M_1 , a los 45 días d.s. , San Martin.
 $F_c = 27.43$; $CV = 5\%$; Significativo .

Andeva No. 26 : "ESTilididad", % de Floración, M_1 , var. Jutiapan.
 $F_c = 4.25$ $CV = 21\%$; Significativo.

CUADRO No. 25

CUADROS GENERALES DE ANALISIS DE MEDIAS POR LA
PRUEBA DE TUKEY DE M_1 , M_2 .

Prueba de Tukey del Andeva No.3: "Sobrevivencia", Emergencia/Jut.

No existe diferencia entre medias

Prueba de Yukey del Andeva No 4: "% de Emergencia", San. Martin.

Media= 1=	9.68	a
med 2:	10.01	a
med 3:	9.340	a b
med 4:	8.54	b
med 5:	6.78	c

Prueba de Tukey, Andeva No. 6: Prueba de Tukey, Andeva No. 7

MED 1: 23.94	a	Med 1: 1.08	a
Med 2: 28.04	a	Med 2: 2.78	a
Med 3: 23.58	a b	Med 3: 3.10	a b
Med 4: 19.56	a b c	Med 4: 5.02	b
Med 5: 15.96	c	Med 5: 2.03	a b

Prueba de Tukey del Andeva No. 10: Mutaciones Hoja Ancha.
 La media 4, es diferente de todas , las demás.

Continuación Puebas Tukey.

Prueba de Tukey del Andeva No.16: Número de semillas/Jutiapan.					
No Existe diferencia entre medias.					
Prueba de Tukey, Andeva No.18			Prueba de Tukey, Andeva No. 21		
MED 1:	29.80	a	Med 1:	15.58	a b
Med 2:	31.45	a	Med 2:	16.74	b a
Med 3:	30.45	a	Med 3:	16.45	b c
Med 4:	26.96	a b	Med 4:	14.00	a c
Med 5:	19.88	b	Med 5:	10.85	a

CUADRO No. 26.

ANALISIS DE REGRESION-CORRELACION, M₂

Analisis para Mutaciones Clorofilicas vrs. Cambios Positivos			
Variedad : Jutiapan ; Modelo Gamma:			
Regresion	Error	Total	B1=13.25847477
GL 2	GL 2	GL 4	B2=66.5271805
SC 1708.965633	SC 278.2224035	SC 1987.1870	R2=0.85999923
CM 854.4828156	CM 139.1107018	Parametros	R= 0.927
FC 6.142466438		BO= 27.421131	
Analisis; Trat. vrs. Mut. Clorf. Sn. Martin.; Modelo Gamma			
Regresion	Error	Total	B1= 1.933845
GL 2	GL "2	GL 4	B2= 0.934836
SC 992.4922	SC 780.03689	SC 1772.592	R2= 0.559929
CM 496.2461	Cm 390.01844	Parametros	R = 0.748284
FC 1.2724		BO= 43.1657	
Analisis; Trat. vrs. Mut. Clorf. Jutiapan; Modelo Geometrico			
Regresion	Error	Total	B1= 0.06752
GL 1	GL 3	GL 4	B2= 0.0008
SC 2.384745	SC 0.657455	SC 3.42207	R2= 0.78389
CM 2.384745	Cm 0.219152	Parametros	R= 0.89537
FC 10.88171		BO= 0.171	
Analisis; Jut. vrs. Sn M.artin ; Modelo Lineal .			
BO= 0.17893 ; B1= 1.41 B2= 0.001 R2= 0.84094 R= 0.91703			

10. BIBLIOGRAFIA

- 1.- ANDO, A. Efeito biologico da combinacao de tratamentos com raios gamma, cisteina e algumas substancias alquilantes sobre sementes de arroz. Tese Dr. Piracicaba, Brasil, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1970. 150 p.
- 2.- BLIXT, S., EHRENGERG, L. y GELIN, O. Quantitative studies of induced mutation in peas. III mutagenic. Effect of ethylenamine. Agri. Hort. Genetic, (Suecia) 18:109-123. 1960.
- 3.- _____. Studies of induced mutations in peas. IX, induction of leaf spot in peas. Agri. Hort. Genetic (Suecia) 22:94-186. 1964.
- 4.- CHOMON, J.C. Inducción de mutaciones de color de semilla con E.M.S. en frijol. Turrialba, Costa Rica, IICA., 1972. 38 p.
- 5.- CONGER, B.V., NILAN, R.A. y KONSAK, C.G. Radiobiological damage: a new class identified in barley seeds by post-irradiation sotange. Science (Austria) 162:43-112. 1968.
6. CROCOMO, O.J. et. al. Breeding for improved protein content and quality in the bean (Phaseolus vulgaris L.): II. Further work in selections from spontaneous variation; new work on mutagenic treatments and the influence of added nitrogen levels. In Seed protein improvement by nuclear techniques. Vienna, Austria, I.A.E.A., 1978. pp. 207-222.
- 7.- _____. and TULMAN NETO, A. Breeding for protein in the bean (Phaseolus vulgaris L.). In Evaluation of seed protein alteration by mutation breeding. Vienna, Austria, I.A.E.A., 1976. pp. 179-185.
- 8.- _____. et. al. Shorts communications. In Breeding for seed protein improvements ussing nuclear techniques. Vienna, Austria, I.A.E.A., 1975. pp. 175-178.

- 9.- DRULL, C.F. and FREY, K. S. Genetic variability in dats following hibridization and radiation. Crop Science 1:141-146. 1961.
- 10.- GOLRSCHALK, W., MULLER, H.P. y VOLFF, G. Further investigations on the generic control of seed protein production in Pisum mutans. In Evaluation of seed protein alteration by mutation breeding. Vienna, Austria, I.A.E.A., 1976. pp. 157-178.
- 11.- GUATEMALA. BANCO DE GUATEMALA. Informe Económico 24(3):63. 1977.
- 12.- HANSEL, H. An estimate of the rate of chorophyll mutations in barley taking account of multiply mutated M_1 nuclei. In Mutations in plant breeding. Vienna, Austria, I.A.E.A., 1965. pp. 139-151.
- 13.- HUSSEIN, H.A.S. Genetic analysis of mutagen-induced flowering time variation in Arabidopsis thaliana L. Thesis Ph.D. The Netherlands, Meded Landbouwhogesch, Wageningen 1968. pp. 1-87.
- 14.- _____. and DISOUSKI, I.A.M. Mutation breeding experiments in Phaseolus vulgaris L. I EMS and gamma ray induced seed coat colour mutation. Zeischrift fur Pflanzanzuchtung 76:190-199. 1976.
- 15.- INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Anex I; Guidelines for co-operator in the programe, "Growth of a research coordination meeting". In Breeding for seed protein improvement using nuclear techniques. Vienna, Austria, 1975. pp. 193-210.
- 16.- _____. Anex III: Recomendations of an adhoc protein content and quality. In Breeding for seed protein improvement using nuclear techniques. Vienna, Austria, 1975. pp. 193-210.
- 17.- _____. Anex IV: Worshop report; genetic and physiological basis of seed protein synthesis as related to nuclear tecnology. In Breeding for seed protein improvement using nuclear techniques. Vienna, Austria, 1975. pp. 211-221.
- 18.- KAWAI, T. Relative effectiveness of physical and chemical mutagens. In Induced mutations in plants. Vienna, Austria, I.A.E.A., 1969. pp. 137-152.

- 19.- KONSAK, C.R. Development of generics methods for wheat improvement. In Mutations in plant breeding. Vienna, Austria, I.A.E.A., 1966. pp. 173-152.
- 20.- _____. and MIKAELSEN, K. Selecting parents and handling the M_1 - M_3 generations for the selection of mutants. In Manual on mutations breeding. Vienna, Austria, I.A.E.A., 1977. pp. 125-138.
- 21.- LEON, J. Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales papilionáceas. San José, Costa Rica, IICA, 1968. v.1, pp. 296-328.
- 22.- MARACAIBO. UNIVERSIDAD DEL ZULIA. Regional training course on the use of induced mutations in plant breeding. Maracaibo, Venezuela, 1980. 20 p.
- 23.- MASAYA SANCHEZ, P.N. Cultivo del frijol en el suroriente de Guatemala. Cámara del Agro (Guatemala) 3(8):10-15. 1981.
- 24.- MOH, C.C. and ALAN, J.J. A comparative study of the mutations frequency and genetic behavior of mutants induced by acute and chronic gamma irradiation in common beans (Phaseolus vulgaris L.) In Comision Interamericana de Energía Nuclear. Chile, Unión Panamericana, 1969. pp. 85-93.
- 25.- _____. Bean mutant induced by ionizing radiation VII. Wrinkled leaf. Turrialba (Costa Rica) 18(2):181-182. 1968.
- 26.- _____. Bean mutant induced by ionizing radiation VII. Compact mutant. Turrialba (Costa Rica) 21(4):478-480. 1971.
- 27.- _____. Estudios comparativos de la respuesta biológica de los frijoles a las radiaciones gamma agudas y crónicas. (Informe técnico No. 5) San José, Costa Rica, IICA, 1964. p. 77.
- 28.- MOLINA LETONA, C.A. Frijol; clasificación botánica. Guatemala, DIGESA, 1973. 60 p.
- 29.- MORALES, C. y GREENE, G.L. Inhibidores del crecimiento en una mutante enana del frijol inducido por irradiación. Turrialba (Costa Rica)

22(2):168-172. 1972.

- 30.- OCHOSE, J.J. et. al. Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. Trad. por Alonzo Blacdaller Valdez y Nicolás Sánchez Durán. México, D.F. Limusa, 1980. 460 p.
- 31.- OLIVARES, S.G., TRUJILLO, F.R. y MARTINEZ, G.A. Estudios de selección para caracteres cuantitativos en población de Triticum eastivum irradiadas con diferentes dosis de rayos gamma Co-60. Agrociencia (México) No. 21:101-113. 1975.
- 32.- ORGANISMO INTERNACIONAL DE ENERGIA ATOMICA. Hasta qué punto deben preocuparnos las radiaciones de baja intensidad. Vienna, Austria, 1980. 60 p.
- 33.- _____. Isótopos en la agricultura. Vienna, Austria, 1980. 600 p.
- 34.- _____. Manual on mutations breeding. Vienna, Austria, 1977. 288 p.
- 35.- _____. Una realidad las radiaciones. Vienna, Austria, 1979. 15 p.
- 36.- PARODI, P.E. and NEBREDA, I.A. Protein and yield response of six wheat (Triticum sp.) genotypes to gamma radiation. In Seed protein improvement in cereal and grain legumes II. Vienna, Austria, IAEA/STI/PUD, 1979. pp. 201-209.
- 37.- PONCIANO PEREZ G. et. al. Componentes de rendimiento y comparación de métodos de selección en frijol (Phaseolus vulgaris L.) después del tratamiento mutagénico con radiación gamma. Agrociencia (México) No. 7:45-63. 1975.
- 38.- QUATLER, H. and BAER, M. Inhibition of plant growth by irradiation. Biol. Abstracts (Austria) 23(1):200-220. 1949.
- 39.- RUBAIHAYO, P.R. Gamma-ray induced mutation in Phaseolus vulgaris L. East African Agricultural and Forestry Journal (Egipto) 41(2): 134-138. 1975.
- 40.- _____. Interrelationship among some yield characters and productivity of mutants of three grain legumes. In Evaluation of seed protein

alteration by mutation breeding. Vienna, Austria, I.A.E.A., 1976. pp. 179-185.

- 41.- _____. The performance of gamma-ray induced mutants of three pulse crops. In Seed protein improvement by nuclear techniques. Vienna, Austria, I.A.E.A., 1978. pp. 235-241.
- 42.- _____. The use of gamma-ray induced mutations in Phaseolus vulgaris L. In Seed protein improvement by nuclear techniques. Vienna, Austria, I.A.E.A., 1974. pp. 257-261.
- 43.- SARAFI, A. El uso de las radiaciones ionizantes en mejoramiento de frijol. anales de l' amelioration des plantes (Francia) 23(1): 77-81. 1973.
- 44.- _____. Les facteurs de la produccion chez le haricot. Anales de l' ameioration des plantes (Francia) 18(2):8-23. 1970.
- 45.- TEDORADZE, S.G. The utilization of bean and soja radio mutants in breeding works. Genetika (Russian) 1:185-191. 1965.
- 46.- TULMAN NETO, A. y ANDO, A. Experimento preliminar para determinar la radiosensibilidad del frijol (Phaseolus vulgaris L.). In Relatorio Científico de Departamento e Instituto de Genética de Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", Piracicaba, Brasil, 1971. pp. 184-187.
- 47.- _____. ANDO, A. y MENTEN, J.O. M. Obtención de líneas mejoradas de frijol como primera etapa en estudios sobre inducción de mutaciones. Energía Nuclear e Agricultura (Brasil) 1(2):102-107. 1979.
- 48.- _____. Contribuicao ao melhoramiento do feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.) visando aumentar a quantidade e melhorar a qualidade da proteina. Tese Dr. Pricicaba, Brasil, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1975. 150 p.
- 49.- _____. et. al. Efeitos da radiacao-gamma em plantas de feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.) em florescimento Energia Nuclear e

- 50.- _____. Obtecao de resistencia ou tolerancia ao virus do mosaico dourado do feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.) atraves de inducao de mutacao. Tese Livre-Docente. Piracicaba, Brasil, Escola Superior de Agricultura - "Luiz de Queiroz", 1979. 110 p.
- 51.- _____. Testes de mutacoes de clorofila em seedling e sua utilizacao na determinacao de doses otimas em experimentos com inducao de mutacao. Piracicaba, Brasil, CENA, 1978. 27 p.
- 52.- WALTER, H. et. al. Variation and selection of protein and lysine mutants in spring barley. In Breeding for seed protein improvement using nuclear techniques. Vienna, Austria, I.A.E.A., 1975. pp. 79-90.
- 53.- YANKULOV, M.T., ISASI, E.M. y ABREU, S. Algunos aspectos sobre la sensibilidad y mutabilidad de dos variedades de frijol por influencia de rayos gamma Co-60 y E.M.S. Ciencias de la Agricultura (Austria) 7:59-64. 1980.
- 54.- ZACHARIAS, M., and EHRENBERG, L. Induction of leaf spots in leguminous plants by nucleotoxic agents. Mutagenic Hereditas (Belgica) 48:284-306. 1962.



Jo Bo
Patruelle

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE AGRONOMIA

Ciudad Universitaria, Zona 12.

Apartado Postal No. 1848

GUATEMALA, CENTRO AMERICA

Referencia
Asunto
.....

"IMPRIMASE"

ING. AGR. CESAR A. CASTANEDA S.
D E C A N O

