

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

SILVA, R.M.<sup>1</sup>; LÓPEZ, S.S.<sup>2</sup>; ROLDÁN, R.M.<sup>2</sup> *Tepeyac*

### RESUMEN

Se evaluaron las dosis de 0, 8, 15, 20 y 30 kR de radiación Gamma (Co-60), en dos variedades de *Phaseolus vulgaris* (Jutiapán y San Martín), para identificar mutaciones y letalidades del 20%. Se realizó selección de plantas con mutaciones morfológicas en M<sub>2</sub>, como tipo de hoja, precocidad y otras. Se anotaron diferencias en sensibilidad a la radiación de las variedades, usando los efectos fisiológicos dados en M<sub>1</sub>. Se efectuó selección y análisis proteico en M<sub>3</sub>.

En M<sub>2</sub>, hubo dos tipos de selección una para recuperación de cambios estructurales morfológicos y otro al azar. En M<sub>3</sub>, se observó la heredabilidad de los cambios de M<sub>2</sub> y los representativos se analizaron para proteína.

Se concluye partir de material genético mejorado y hacer selección de pureza varietal antes de irradiar.

Dosis que alcanzaron un 20% de letalidad en M<sub>1</sub>, son 20 y 30 kR especialmente en la variedad San Martín.

No se observó incidencia de letalidad o crecimiento en el campo lo cual indica que se puede aumentar la dosis para un LD<sub>50</sub> o Gr<sub>30-50</sub>.

En 20 y 30 kR se observó menor floración en la variedad Jutiapán.

En M<sub>2</sub>, Jutiapán mostró mayor sensibilidad mutagénica en relación al número de cambios clorofílicos/100 plantas.

El material irradiado tuvo mayor rango de proteína (siendo del 16 al 26%) que el testigo (de 20-23%) en ambas variedades.

### INTRODUCCION

Siendo Guatemala un país eminentemente agrícola, y existiendo condiciones favorables para

el desarrollo de los cultivos es necesario introducir técnicas nucleares con el fin de incrementar la producción agrícola, tomando en cuenta que la población del país crece a un ritmo acelerado.

La Dirección General de Energía Nuclear, a través de la Sección Agropecuaria realiza acciones orientadas a establecer una infraestructura que le permita introducir el empleo de las técnicas nucleares y trabajar en forma conjunta con otras Instituciones del Sector Agrícola, a fin de incrementar la producción, mejorar la calidad de alimentos y prolongar el período de conservación de los mismos.

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) es un cultivo de importancia en la economía y en la dieta de nuestro país, considerándolo una de las principales fuentes de proteína digestible que tiene a su alcance el habitante guatemalteco.

Siendo el frijol un grano básico en la alimentación humana en Guatemala, se considera que la técnica de inducción de mutaciones por medio de irradiación, puede convertirse en el futuro en una herramienta útil y práctica del mejoramiento no solo del frijol, sino también en otros cultivos, con relación a la cantidad y calidad de la proteína, enfermedades. (1).

De lo anteriormente expuesto se justifica la realización del presente trabajo "Inducción de Mutaciones por Radiación Gamma (Co-60) en dos variedades de *Phaseolus vulgaris* L."

El material irradiado se evaluó en el campo en un mismo ambiente, durante tres generaciones (M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>), 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 aquellos que muestren mejores resultados en el porcentaje de proteína.

El presente estudio se realiza dentro del Programa de Investigación para América Latina auspiciado por el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA). Participaron en su ejecución: La Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala y la Dirección General de Energía Nuclear, lo cual constituye un claro ejemplo de coordinación de esfuerzos.

<sup>1</sup>Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

<sup>2</sup>Dirección General de Energía Nuclear de Guatemala, Apartado Postal 1421, Guatemala.

## METODOLOGIA

1. Localización: Las dos variedades estudiadas (ICTA Jutiapán y San Martín) fueron sembradas en terreno de la Dirección General de Energía Nuclear con una área de 118.00 m<sup>2</sup> para la generación M<sub>1</sub> y 1,350m<sup>2</sup> para las generaciones M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub>.
2. Labores Culturales: Se efectuó un muestreo de suelos, con el fin de conocer el nivel natural de fertilidad en el terreno no cultivado anteriormente y en base a los resultados del Laboratorio de Análisis de Suelos: pH ligeramente ácido, P bajo, K bajo, Ca alto, Mg adecuado. Se aplicaron dos fertilizaciones, uno al momento de la siembra y el otro treinta días después de la siembra.
3. Tratamientos e Irradiación: La irradiación se efectuó en un Irradiador con Co-60, DYNARAD 5L, con intensidad de 290 krad/hr. Irradiando a dos variedades de frijol, distribuidos en cinco dosis o tratamientos (0, 8, 15, 20 e 30 kR).
4. Siembra: El terreno utilizado fue en una área, en la cual no se había establecido cultivos anuales, a fin de cumplir con las recomendaciones dadas por el Organismo (FAO/OIEA) para los colaboradores del Programa en Líneas Mutantes (2,3).
  - Cultivo Generación M<sub>1</sub>: Se utilizaron dos semillas por postura, eliminándose una planta para asegurar una población homogénea (2). La distancia de siembra fue de 0.50m entre surco y 0.30m entre planta.
  - Cultivo Generación M<sub>2</sub>: Se usó una semilla por postura, a fin de obtener una población homogénea y representativa de los posibles mutantes a recuperar durante la evolución del cultivo. La distancia de siembra fue de 0.60m entre surco y 0.20m entre planta, siendo las medidas recomendadas para este tipo de experimento (2,3).
  - Cultivo Generación M<sub>3</sub>: De cada planta seleccionada e identificada de M<sub>2</sub> se tomaron 2 a 3 vainas (4), del mismo nudo e inflorescencia, para sembrar la M<sub>3</sub>, con el fin de incrementar el material seleccionado y llevar a análisis de laboratorio.
5. Metodología de Selección: Durante el desarrollo de las generaciones M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> se anotaron las siguientes variables:
  - % de Germinación.
  - Días al inicio de la floración.
  - Duración de floración
  - Días a madurez fisiológica
  - Días a la cosecha
  - Altura de planta, a los 15 días, a la floración, y a la madurez.
  - Hábito de crecimiento.
  - Número de vainas por planta.
  - % de mutantes clorofílicos.
  - Color de la flor, de la vaina y semilla.En base a la bibliografía consultada (3,8,9) y fitomejoramiento se efectúa para la generación M<sub>2</sub>, dos tipos o formas de selección (7) las que se describen a continuación:
  - a) Selección de mutantes morfológicos: Comprén de las siguientes características:
    - mutantes enanas, mutantes precoces, mutantes en color de flor.
    - mutantes en hábito de crecimiento, mutante de vainas anormales: compactas, muy grandes, deformes.

- Mutantes de hoja anormal: fina y pequeña, corrugadas grande y/o gruesa.
  - mutantes tardías, mutantes clorofílicas y amorfas.
  - mutantes en color de vaina.
  - mutantes en color de grano.
- b) Selección al azar: Sobre el resto de plantas que no presentaron cambios morfológicos y que potencialmente pueden ser mutantes en su contenido nutricional o proteico en la semilla. Se tomo en cuenta su desarrollo, vigor, rendimiento en el campo. Selección individual en la generación M<sub>2</sub>: los individuos más representativos de la generación M<sub>2</sub> fueron reproducidos para someterlos a análisis de proteína, a fin de recuperar algún individuo con mayor porcentaje proteico y ver la heredabilidad de las características o cambios vistos en M<sub>2</sub>.
  6. Cosecha: Para la M<sub>1</sub> se realizó en forma masal por tratamiento y por bloque (4) en la M<sub>2</sub> se cosecharon los individuos con cambios morfológicos y los seleccionados al azar y en la M<sub>3</sub> los individuos más representativos de la selección en M<sub>2</sub> y reproducidos en la generación M<sub>3</sub>.
  7. Análisis de Laboratorio: Se hicieron análisis de proteína en base al método Micro-Kjeldahl en la generación M<sub>3</sub>. Realizado en la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala por los investigadores del Proyecto.
  8. Diseño Experimental: Las generaciones M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> fueron sembradas en un diseño de bloques al azar y la generación M<sub>3</sub> se sembró en forma de planta/surco.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Luego de haber realizado el trabajo de campo se obtuvo una serie grande de resultados, discutiendo los más representativos y siguiendo un orden por generaciones de M<sub>1</sub> a M<sub>3</sub>.

Se utilizó el diseño experimental en bloques al azar para reducir los efectos de heterogeneidad ambiental. Sin embargo se reconoce no necesario al menos durante las tres generaciones.

### 1. Efectos Fisiológicos para la Generación M<sub>1</sub>:

Bajo porcentaje de germinación en el campo, letalidad, reducción en crecimiento y desarrollo de las plantas, son efectos que según Yankulov, Isasi y Abreu (10) se manifiestan solamente en la generación M<sub>1</sub>. Se hicieron mediciones alrededor de los 15 días, cuando la primera hoja termina su crecimiento y luego altura de planta en la época de floración, siendo los mismos resultados para la altura a la madurez fisiológica del cultivo.

La altura de plantulas y altura de la madurez fisiológicas es un método sencillo para determinar el efecto de un tratamiento mutagenético en la semilla (6), para esto se puede seguir el criterio.

GR<sub>50</sub>, o disminución en un 50% de la altura de la planta, o bien el criterio LD<sub>50</sub>, o letalidad para un 50% de los individuos tratados. Se enfocó este criterio debido a que no observamos tal incidencia de letalidad o crecimiento en el campo, por lo que podemos decir que las dosis aplicadas no han alcanzado ninguno de tales criterios.

El efecto fisiológico causado por los tratamientos en M<sub>1</sub> sobre la germinación de las plantas en el campo mostraron significancia para las dosis de 20 y 30 kR, siendo la mayor significancia la de 30 kR en la variedad San Martín.

En la sobrevivencia y la emergencia de plantas en el campo se observó que las mayores dosis afectaban en mayor grado; es decir que existe una correlación directa entre la dosis y los daños que causan. Cuadro nº 1.

En esta generación se presentó muy poca manifestación de manchas cloróticas o clorofílicas, la mayoría de estas plantas no sobreviven y son estériles muriendo a los pocos días de haber emergido, esto concuerda con Zacharias y Ehrenberg (11) comparando dos repeticiones del tratamiento de 15 kR, una de 26gr y otra de 16 gr/100 semillas, se observó una variación alta y se supone que esto es debido al efecto fisiológico de la radiación en la M<sub>1</sub> (Cuadro nº 2)

Al analizar la floración en la variedad Jutiapán se observó una menor floración en los tratamientos de 20 y 30 kR. Esto puede ser debido a una caída de la flor, por lo tanto, el

número bajo de semillas en los tratamientos de 20 y 30 kR, se debe al hecho de que hubo menor número de plantas sobrevivientes y una alta absorción de flores, especialmente para la variedad Jutiapán.

## 2. Cambios Genéticos en la M<sub>2</sub>:

En esta generación es donde aparecen las mutaciones de diferentes tipos, que son identificadas por su distinto fenotipo en algunas o más características en relación al testigo. Al analizar en ambas variedades la cantidad de mutaciones clorofílicas/tratamiento y la frecuencia de mutaciones clorofílicas/100 plantas, se observó que al incrementarse la radiación también se incrementaba el número de mutantes clorofílicos. Esto se notó hasta las dosis de 20 kR, luego se dio decrecimiento en la frecuencia mutacional de 30 kR (Cuadro nº 3)

Esto concuerda con los datos obtenidos por Moh y Alan (5). El color de la vaina era otro cambio estimado mutación morfológica en la M<sub>2</sub>, las plantas diferían de color verde normal a un color marrón, pero se estableció que provenían de

CUADRO Nº 1. Numero de plantas sobrevivientes a la floración M<sub>1</sub>

TRAT.	BLOQUE I	BLOQUE II	BLOQUE III	BLOQUE IV	BLOQUE V
VARIEDAD JUTIAPAN					
0kR	13	14	12	14	10
8kR	13	15	12	12	14
15kR	13	14	14	13	9
20kR	13	14	12	8	10
30kR	14	4	11	13	11
VARIEDAD SAN MARTIN					
0kR	14	14	14	14	13
8kR	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 efectuado la sobrevivencia.

CUADRO Nº 2. Rendimiento que se obtuvo en la 1ª generación de la variedad Jutiapán.

	Numero de Semillas					TOTAL DE SEMILLAS
	BLOQUE I	BLOQUE II	BLOQUE III	BLOQUE IV	BLOQUE V	
Testigo	587	1555	407	1242	1500	5291
8kR	1170	1316	1145	758	1425	5814
15kR	496	819	904	839	313	3470
20kR	775	337	715	350	85	2262
30kR	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	
8kR	20	18.5	18	18	21	
15kR	26	19.5	19.5	16.5	21.5	
20kR	23.1	19.5	21.5	20.5	23	
30kR	20.5	19.0	21.5	21.5	20.5	

CUADRO Nº 3. Mutaciones clorofilicas en  $M_2$  var. Jutiapán y San Martín.

TRATAMIENTO EN kR	JUTIAPAN MUT/100 PLANTAS	SAN MARTIN MUT/100 PLANTAS	JUTIAPAN NO DE MUTANTES	SAN MARTIN NO DE MUTANTES
0	0	0	0	0
8	0.47	0	2	0
15	0.70	0.76	3	3
20	2.30	1.40	9	6
30	1.50	0.73	6	3

$T_c = 2.94$  es significativo 5%. Existe poca diferencia entre variedades.

$T_c = 2.4$  N.S. para análisis de diferencia con número de mutantes.

plantas con las mismas características en  $M_1$ , lo que indica presencia de impurezas, en el material original sometido a irradiación.

### 3. 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 por ciento. Muchos resultados mostraron significancia con respecto al rango de proteína del testigo (20 a 30%). Se presentó en los individuos analizados un rango de 16 a 26% de proteína. De acuerdo a este rango se tomaron aquellos que tengan de un 23 a 26%, para una nueva evaluación replica en  $M_4$ , luego los mejores individuos se llevarán a otro ensayo en  $M_5$ . Dichos individuos provienen en su mayor parte de la variedad Jutiapán.

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos nos permite concluir que la irradiación ayuda en frijol (*Phaseolus vulgaris*) provocó dos tipos de efectos: en  $M_1$  produce efectos fisiológicos que solo se manifiestan en esta generación. Luego en  $M_2$ , se observan los efectos mutagénicos en forma de macro y micro mutantes.

Se obtuvieron cambios positivos en contenido de proteína, aunque esta característica está influenciada por el ambiente. En los análisis de  $M_3$  se notó variación en general del 16 al 26% tanto en los individuos con variantes morfológicas como los aparentemente normales seleccionados al azar mostraron una variación en su porcentaje de proteína.

En virtud de los resultados se estima conveniente que en trabajos de mutaciones inducidas por irradiación gamma (Co-60) se parta de materiales mejorados, a los cuales se desea incorporar características deseables.

Considerando los beneficios de dichas técnicas que para la realización de estas actividades es indispensable contar con personal capacitado, es conveniente la realización periódica de eventos como este que permitan a los países menos desarrollados, obtener experiencia.

### OBSERVACIONES

Es importante mencionar y tomar en cuenta que existieron errores en el desarrollo del experimento, como lo fue el empleo de variedades con bajo porcentaje de pureza genética, la falta de análisis a nivel de plántula en invernadero.

Dichos errores se debieron a la inexperiencia en el campo de las mutaciones inducidas.

Estamos seguros con la participación en Cursos, Simposios, asistencia de expertos, y Seminarios como el presente dichos errores no se presentarán en el futuro.

El presente trabajo se continuará analizando por generaciones hasta la  $M_6$ , tomando en cuenta el impacto que ha generado a la fecha y el interés puesto de manifiesto por otras instituciones.

### EVALUATION OF GAMMA RADIATION (60-Co) INDUCED MUTATION IN TWO *Phaseolus vulgaris* VARIETIES

#### SUMMARY

To identify mutants and 20% lethality, two varieties of *Phaseolus vulgaris* (Jutiapán and San Martín) were irradiated at 0, 8, 15, 20 and 30 kR doses in a 60-cobalt gamma source.  $M_2$  plants showing morphological mutations, such as type of leaves, earliness, and others, were selected.

Differences in sensitivity to irradiation of the two varieties were noted, using data on physiological effects of  $M_1$ . Selection and analysis for protein content were made in  $M_3$ .

Two kinds of selection were used in  $M_2$  - one to recover the morphological structural changes and the other at random. Inheritability of  $M_2$  changes and protein analysis of representatives were evaluated in  $M_3$ .

It was concluded that the material to be used should be genetically improved and selected for varietal purity.

20% lethality in  $M_1$  were obtained with 20 and 30 kR, especially in the San Martín variety. No lethality or growth inhibition was noted in the field, which means that the doses can be increased to LD<sub>50</sub> or Gr 30-50.

At 20 and 30 kR a decrease in flowering was noted in variety Jutiapán.

In  $M_2$  Jutiapán showed greater mutagenic sensitivity in relation to the number of chlorophilic changes/100 plants.

For both varieties the irradiated material showed greater protein range (16-26%) than the control (20-23%).

### BIBLIOGRAFIA

1. CROCOMO, O.J.; SODEK, L.; AMDO, A.; CRUZ, V. F. da. Influence of low gamma-radiation doses in bean protein. In: I.A.E.A. Breeding for Seed Protein Improvement Using Nuclear Techniques. Vienna, 1975 p. 175.
2. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Guidelines for co-operators in the programme: growth of mutant lines in the field. In: \_\_\_\_\_, Breeding for Seed Protein Improvement Using Nuclear Techniques. Vienna, 1975. p. 189-190.
3. \_\_\_\_\_. Manual on mutation breeding. 2.ed. Vienna, 1977. 288p.

4. \_\_\_\_\_ . Recommendations of an ad hoc panel on analytical screening methods for seed protein content and quality. In: \_\_\_\_\_ . Breeding for Seed Protein Improvement Using Nuclear Techniques. Vienna, 1975. p. 193-209.
5. MOH, C.C. & ALAN, J.J. A comparative study of the mutations frequency and genetic behaviour of mutants induced by acute and chronic gamma irradiation in common beans (*Phaseolus vulgaris*). Washington, Inter-American Nuclear Energy Commission, 1969. p. 85-93.
6. QUATLER, H. & BAER, M. Inhibition of plant growth by irradiation. Biol. Abstracts, 1949.
7. SAFARI, A. Les facteurs de la production chez le haricot. Annales de l'amélioration des plantes, 18(2):9-23, 1970.
8. UNIVERSIDAD DEL ZULIA. Regional training course on the use of induced mutations in plant breeding. Maracaibo, 1980. 20p.
9. WALTHER, H.; GAUL, H.; ULONSKA, E.; SEIBOLD, K.H. Variation and selection of protein and lysine mutations in spring barley. In: I.A.E.A. Breeding for Seed Protein Improvement Using Nuclear Techniques. Vienna, 1975. p.79-89.
10. YANKULOV, M.T.; ISASI, E.M.; 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, 7:59-64, 1980.
11. ZACHARIAS, M. & EHRENBERG, L. Induction of leaf spots in leguminous plants by nucleotonic agents. Mutagenic Hereditas, 48: 284-306, 1962.