

08381



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

38 2y.

EFFECTOS FISIOLÓGICOS Y GENÉTICOS DE LOS AGENTES ALQUILANTES
EN PLANTAS SUPERIORES.

LA ACCIÓN DEL METIL METANO SULFONATO
SOBRE ALGUNAS GRAMINEAS.

ABRAHAM RUBLUO ISLAS

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
(BIOLOGIA)

MEXICO, 1981

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La presente tesis se realizó en el Instituto de Biología de la U.N.A.M.

Los trabajos de Invernadero y campo se efectuaron bajo la supervisión del Dr. Rubén Sosa Chávez del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares y fueron desarrollados en la Escuela de Agricultura del Edo. de México, Sta. Elena, México y Centro de Investigaciones para el Desarrollo Agrícola y Ganadero del Edo. de México, Metepec, México.

AGRADECIMIENTOS:

El autor expresa su profundo agradecimiento a los señores Doctores:

MA. CRISTINA PEREZ AMADOR
TEOFILO HERRERA SUAREZ
YOLANDA CABALLERO AHROYO
ERNESTO MORENO MARTINEZ
GUILLERMO CARRILLO CASTAÑEDA
IGNACIO MENDEZ RAMIREZ
HECTOR GONZALEZ ROSAS

miembros del Jurado Dictaminador, por su interés y valiosas sugerencias en la revisión de este trabajo.

RECONOCIMIENTOS:

- Al Dr. Ignacio Méndez por su invaluable asesoría en los aspectos estadísticos de este trabajo.
- A la Dra. Ma. Cristina Pérez Amador por su activa participación e interés en el desarrollo de esta tesis.
- Al Dr. Guillermo Carrillo por su crítica continua y las discusiones del trabajo.
- Al Dr. Rubén Sosa Chávez por su desinteresado apoyo y supervisión en los trabajos de campo.
- Al Dr. Tarcisio Cervantes por su asesoría en los cálculos de las transformaciones probit.

CONTENIDO:

	Página
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	25
MATERIALES Y METODOS.....	27
1. Material biológico utilizado.....	27
2. Reactivos utilizados.....	27
3. Tratamientos con el MMS.....	28
4. Medición de los cambios de pH en soluciones acuosas de MMS.....	32
5. Análisis de la estabilidad de la cisteína.....	32
6. Experimentos de invernadero y de campo.....	33
RESULTADOS Y DISCUSION.....	35
1. Determinación de las dosis letales 50 (DL50) para las semillas de cebada var. Himalaya.....	35
2. Determinación del daño sobre coleóptilo y plántula en cebada.....	39
3. Determinación del daño sobre coleóptilos y plántulas inducido en semillas de cebada pretratadas con agua.....	46
4. Efectos del MMS disuelto en Amortiguadores de Fosfatos a diferentes pH y temperaturas sobre los coleóptilos y plántulas...	51
5. Efecto de la L-cisteína administrada como postratamiento sobre semillas de cebada pretratadas en agua y tratadas con MMS...	55
6. El efecto del MMS sobre semillas de <u>Triticale hexaploide</u> Lart var. Bacum.....	57

	Página
RESUMEN.....	62
LITERATURA.....	65
FIGURAS Y TABLAS.....	72

ABREVIATURAS:

AA	Agentes Alquilantes
AmMMS	Carbamoil metil metano sulfonato
AQ	Agentes Químicos
DL50	Dosis Letal 50
DMS	Dimetil Sulfato
EMS	Etil Metano Sulfonato
EI	Etilen Imina
iBMS	iso Butil Metano Sulfonato
iPMS	iso Propil Metano Sulfonato
MMS	Metil Metano Sulfonato
MNNG o NG	1-Metil- 3 -Nitro- 1 -Nitrosoguanfina
MOEMS	2-Metoxietil metano sulfonato
n	Constante de nucleofilicidad
neOMS	neopentil metano sulfonato
NMU	N- Metil- N -Nitrosouretano
OPMS	2-oxopropil metano sulfonato
s	Constante de Sustrato
SNK	Prueba de Student-Newman Keuls
S	Síntesis del ADN

INTRODUCCION

La variación de los seres vivos es una facultad que permite la plasticidad de las poblaciones y su adaptación a un futuro de condiciones impredecibles, manifestándose así como una condición esencial para la evolución de las especies. Esta propiedad se expresa en los organismos en la diferenciación que existe entre ellos no solo con respecto a grupos taxonómicos diferentes, sino aun con los individuos que les dieran origen, así pues la variación es una tendencia opuesta a la herencia, ya que si solo actuase el molde hereditario con sus características fijas e inmutables, el cambio no se presentaría y la variación no se detectaría deteniéndose con esto el desarrollo evolutivo.

En las plantas cultivadas, algunas prácticas agrícolas han provocado, en ocasiones, sacrificios en la variabilidad de los organismos con una secuela de problemas que urge analizar para resolver (Cervantes, 1978). Es posible recuperar esta pérdida de variabilidad por 3 vías: el uso de fuentes genéticas originales, por medio de hibridación o utilizando las mutaciones.

Estas últimas se presentan en todos los seres vivos al cambiar la química del material genético de los organismos, o alterar la estructura o número de los cromosomas; una mutación cambia la forma o función del organismo y sus descendientes.

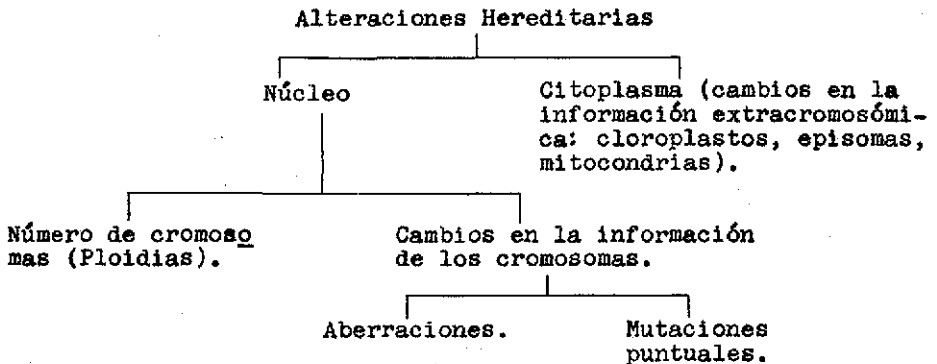
Al inducir mutaciones experimentalmente, la frecuencia de éstas se aumenta considerablemente (Sigurbjornsson, 1971), lo cual implica una mayor capacidad de juego de la especie para la

evolución.

Además se sabe que no hay diferencia substancial entre la resultante de la mutación espontánea y la de la mutación inducida, y que el hombre en este sentido, solamente está ayudando a la naturaleza para su propio bienestar provocando nuevos mutantes y aplicando presiones de selección antropocéntricas.

El modelo de Wattson-Crick propuesto para la estructura molecular del ADN ha dado a la teoría de las mutaciones un sustrato firme analizado a nivel molecular y que explica en forma intelectualmente satisfactoria los procesos involucrados en el fenómeno de la mutación, así como sus implicaciones biológicas.

Generalmente se considera como mutación los cambios que afectan directamente y en forma cualitativa a la estructura química del ADN, sin embargo, en un sentido amplio podemos considerar como alteración hereditaria y potencialmente mutación a todo cambio cualitativo o cuantitativo del material hereditario, de acuerdo al siguiente esquema:



Se ha establecido que las fuerzas que básicamente intervienen en la modificación genética de los individuos son: la mutación, la hibridación y la recombinación, las cuales, al interactuar con el medio ambiente, van a provocar la selección, fijación y finalmente la adaptación de nuevos caracteres que enriquezcan el contenido genético total de las poblaciones y en consecuencia, la variación entre los individuos. Ahora bien, la fuente primaria de variación genética es la mutación, la cual permite la evolución, y ésta puede definirse como descendencia con modificación, pues el proceso de los cambios genéticos ha provisto todas las variantes a partir de las cuales la evolución ha seleccionado las mas aptas para producir la diversidad de organismos vivos que hoy conocemos.

En 1927, H.J. Muller informa por vez primera el uso de rayos "X" para incrementar la frecuencia de mutaciones en la mosca de la fruta, Drosophila melanogaster; casi al mismo tiempo L.J. Stadler utilizando maíz y cebada demostró que sucedía lo mismo en plantas superiores. Estos hechos abrieron la posibilidad de revolucionar los métodos del mejoramiento genético en plantas superiores pues desde los orígenes de la sociedad agrícola, el hombre ha manipulado la hibridación y la selección de caracteres en las plantas, pero no así la fuente original de la variación que es la mutación.

Sin embargo, los primeros intentos para conducir esta manipulación llevaron a fracasos debido fundamentalmente al desconocimiento casi absoluto de la naturaleza de las mutaciones, de cómo ellas podían afectar a las plantas, a la falta de objeti-

vos específicos, así como al manejo inadecuado de los tratamientos y las sucesivas generaciones de mutantes potenciales (Sigurbjornsson, 1974).

El camino recorrido por la mutagénesis experimental (*) desde entonces, ha sido fructífero, ya que en la actualidad se conoce una gran cantidad de agentes mutagénicos físicos y químicos, se han logrado avances substanciales con los métodos de aplicación de los mutágenos (Konzak y col., 1965; Konzak y col., 1972) y se han establecido esquemas de selección de los mutantes inducidos (Konzak y Mikaelson, 1977).

En general, los tratamientos mutagénicos utilizan semillas, pero es frecuente también el uso de tubérculos, polen o incluso plantas enteras; mas aun, recientemente se ha abierto una vía sumamente atractiva hacia la manipulación y conocimiento del fenómeno de la mutación en plantas superiores, esta vía es el uso del cultivo de células haploides o diploides como material experimental en mutagénesis (Carlson y Smith, 1977; Maliga, 1978).

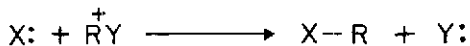
Aun cuando las radiaciones han sido mas ampliamente utilizadas en la inducción de mutaciones, que los agentes químicos (AQ), éstos parecen constituir un prometedor campo de acción sobre todo en la búsqueda de la especificidad mutagénica, ya que además de inducir eficientemente las mutaciones, se sabe que reaccionan de cierta forma con las bases del ADN (Auerbach, 1976).

(*) A menos que se especifique otra cosa, en este trabajo el término "mutagénesis experimental" o tratamientos mutagénicos implica aplicación en plantas superiores con fines de fitomejoramiento.

En general los AQ inducen mutaciones puntuales y/o rompimientos cromosómicos; su número es grande y continúa en aumento (Heslot, 1977). Se han efectuado clasificaciones de estos agentes considerando su interacción con el ADN, (Freese, 1971) y Ehrenberg (1971) ha propuesto una clasificación mas relacionada al uso de sustancias químicas como mutágenos en plantas superiores. Este autor señala que una cantidad considerable de ácidos de Lewis, son capaces de reaccionar con el material hereditario e inducir mutaciones. En su clasificación este autor coloca a los agentes alquilantes (AA) como los mas importantes dada su gran capacidad de producir mutaciones; dentro de sus observaciones señala una serie de compuestos insaturados como débilmente mutagénicos, encuentra que el O₂ es también inductor de mutaciones y que algunos metales como el Cu² y el Pb²⁺ provocan rompimientos de cromosomas.

Los agentes alquilantes (AA) han sido los mas utilizados en la inducción de mutaciones en plantas superiores (Ehrenberg, 1971) además de ser los mas eficientes para lograr este objetivo (Nilan, 1973). Estos productos químicos poseen grupos electrofílicos capaces de ser transferidos a otras moléculas, especialmente a los sitios de alta densidad electrónica y que presentan centros nucleofílicos, de tal manera que cuando un átomo de H es reemplazado por un radical alquilo, se produce una molécula inestable, la cual tiende a estabilizarse por hidrólisis liberando la molécula alquilada y ocasionando alteraciones genéticas o fisiológicas.

Una reacción típica de alquilación estaría representada por:



donde X: representa centros nucleofílicos ricos en electrones de los sistemas biológicos, los cuales son básicamente ADN y proteínas; R⁺ Y es el agente alquilante donde R⁺ es el grupo alquilo electrofílico positivo; X-R es el producto de la reacción, es decir, ADN o proteína alquilada y Y:⁻ es el producto de degradación del AA.

El grupo alquilo tiene un ion carbonio y para llevar a cabo su acción de alquilación utiliza al menos dos vías: los mecanismos S_N1 y S_N2.

En el S_N1, la separación del ion carbonio R⁺ de Y⁻ es un paso lento, pero después de logrado se produce una reacción rápida sobre el centro nucleofílico que se va a alquilar; en el S_N2 no hay prácticamente formación de ion carbonio y la molécula alquilante completa se pega al sitio de reacción dando lugar a un estado de transición donde el ion alquilante R⁺ está unido a su molécula original (Y-) y al centro nucleofílico X-, estableciéndose una competencia entre el enlace que se está formando y el que se está rompiendo, ya que ambos procesos ocurren simultáneamente (fig. 1).

El mecanismo de reacción de un determinado AA es en ciertos casos determinante para su mayor o menor efectividad como mutágeno (Wickhan y col., 1969).

La importancia de la estructura química de los AA para el

conocimiento de sus mecanismos de acción ha sido reconocida (Lawley, 1974); en este sentido, un aspecto determinante es el número de grupos funcionales que los AA tienen; en general, se han identificado tres grupos: mono, bi y trifuncionales, esta característica está definida por la capacidad que tienen los AA de combinarse, de acuerdo con su número de grupos funcionales, con los centros nucleofílicos, es decir que los AA monofuncionales se combinan solo con un centro nucleofílico, en tanto que los polifuncionales lo hacen con mas de uno (Wheeler, 1967). La toxicidad de los AA parece estar en relación directa a sus grupos funcionales, ya que los bifuncionales fácilmente inducen entrecruzamientos entre las 2 cadenas de la doble hélice del ADN, provocando un fuerte enlace covalente que no permite la separación de las 2 cadenas, siendo por esta razón probablemente letal (Heslot, 1977). Por su importancia práctica los AA monofuncionales han sido los mas utilizados en estudios de mutagénesis en comparación con los bifuncionales cuyo uso, debido a su alta toxicidad, se ve limitado y a los trifuncionales que prácticamente no son utilizados para fines de inducción de mutaciones.

La reacción de hidrólisis de los AA conduce a la obtención de productos de degradación no mutagénicos, pero sí altamente tóxicos, este es el caso de los ésteres de los ácidos sulfónicos, los cuales al hidrolizarse, forman el ácido sulfónico y el alcohol correspondiente. Estos productos, especialmente el ácido sulfónico, resultan fuertemente tóxicos para las células.(fig. 1).

La hidrólisis de los AA, da lugar a uno de los parámetros mas importantes a considerar cuando se trabaja con estas substan

cias, su vida media, la cual es el tiempo necesario para que la mitad de la concentración original del AA haya desaparecido (se transfiera por la hidrólisis).

La vida media está en función de la temperatura, así en general, las vidas medias se registran a 20°C, pero si la temperatura cambia, este valor se altera alargándose a bajas temperaturas y acortándose a altas temperaturas; otros factores pueden también influir en la degradación de los AA, por ejemplo, el pH (Wickham et al, 1969).

La principal fuente de toxicidad y muerte celular inducida por los AA se identifica con la alquilación de las proteínas, que conduce a la inactivación de enzimas y consecuentemente al bloqueo de vías metabólicas. Por otro lado, la inducción de mutaciones se ha relacionado con la alquilación de los grupos fosfato y al ADN (Osterman-Golkar, 1970). Siendo la molécula de ADN el centro nucleofílico de mayor importancia para la mutagenesis, se han realizado estudios para determinar sus sitios reactivos para los AA.

Strauss y col. (1975) han indicado que las 4 bases que conforman el ADN son susceptibles de alquilación, sin embargo, no lo son en la misma medida ya que existen zonas especialmente sensibles de reaccionar, así por ejemplo, para la alquilación con MNNG el N₇ de la guanina presenta un 67% de la alquilación total, mientras que el N₁ de la adenina muestra sólo el 1%, el N₃ de guanina tiene el 2% y el O₆ tiene el 7%, es decir, la alquilación no es cuantitativamente igual para todos los si-

7.

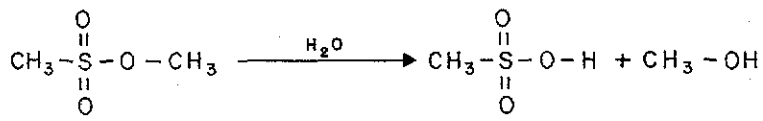
tios posibles (Strauss y col., 1975) esto se debe a que las purinas las pirimidinas ofrecen una variedad de grupos funcionales que reaccionan con los AA y ciertos factores operan para determinar el sitio de ataque de un reactivo particular, especialmente los impedimentos estéricos tanto de la molécula atacante como de la reaccionante, por ejemplo, se ha propuesto (Shapiro, 1969) que al reaccionar las bases libres (es decir no en la molécula de ADN), sus capacidades de reacción se alteran, así, la adenina puede existir como una mezcla de tautómeros, uno con un H en N₉ y otro con el H en el N₇, lo cual hace de ambos sitios (N₇ y N₉) iguales candidatos para la alquilación; en la molécula organizada del ADN esto no se presenta ya que el N₉ está ocupado por el enlace base-azúcar.

Además de las bases nitrogenadas los AA son capaces de alquilar los grupos fosfato de la molécula de ADN; Lett y col. (1962) postularon que los AA reaccionan primero con el fosfato de la molécula de ADN, efectuándose posteriormente un proceso de transalquilación del grupo fosfato alquilado a las bases nitrogenadas (Price y col., 1969).

Por otro lado, Bannon y Verly (1972) han propuesto que la alquilación de los fosfatos en el ADN se presenta de acuerdo al grupo alquilante, considerando la complejidad de la molécula y su mecanismo de reacción, así, los agentes S_N1 tienen tendencia a alquilar fácilmente los grupos fosfato, en tanto que los S_N2 alquilan directamente las bases; sustancias que, como el EMS, están en el límite entre S_N1-S_N2, alquilan fosfatos también en

forma intermedia (Bannon y Verly, 1972); los triésteres de fosfato alquilado son moléculas altamente inestables por lo que pueden hidrolizarse entre el fosfato y la desoxirribosa provocando el rompimiento de la cadena de ADN (Kamra y Brunner, 1977).

El MMS es el éster metílico del ácido metilsulfónico. Esta sustancia es un activo AA monofuncional cuya reacción de hidrólisis conduce a la obtención del ácido metil sulfónico y el alcohol metílico, según la siguiente ecuación:



Este AA ha sido reportado como mutágeno y probado en diferentes sistemas biológicos: bacterias (Todd y col., 1979), neurospora (Malling y De Serres, 1973), mamíferos (Cumming y Walton, 1970), así como en plantas superiores (Ehrenberg, 1971); además se sabe que es un débil carcinógeno y que su espectro de mutaciones depende de la dosis (Malling y De Serres, 1969).

El MMS ha sido relativamente poco utilizado en la inducción de mutaciones, de hecho Loveless y Howart (1959) lo reportaron como no mutagénico, sin embargo ahora se sabe que este AA induce mutaciones eficientemente (Drake, 1976). Mas aun, trabajando sobre bases equimoleculares y a bajas concentraciones, Minocha y Arnason (1962) y Arnason y Minocha (1965) encontraron que el MMS era mas efectivo para inducción de mutaciones en cebada que

el EMS, que es probablemente el mas utilizado de los AA. Estos datos fueron también confirmados por Rao y Natarajan (1967) para cebada y Fahmy y Fahmy (1961), estudiando especies de *Drosophila* tratadas con EMS y MMS a las mismas dosis, reportaron a este último como mejor inductor de mutaciones. Por otro lado, Rhaese y Freese (1969), trabajando también comparativamente con EMS y MMS, sobre ADN aislado, encontraron que este último agente era de 5 a 10 veces mas efectivo para la alquilación que el EMS y Rhaese y Boether (1973), en un sistema de ADN transformante confirmaron estos datos. Sin embargo, estos autores concluyen que a pesar de las diferencias cuantitativas, la acción de estos agentes desde el punto de vista cualitativo parece ser la misma.

El MMS ha mostrado una alta toxicidad (Osterman-Golkar y col., 1970; Rubluo y col., 1980), razón por la cual, al elevar la dosis de los mutágenos, el MMS pierde efectividad y eficiencia (Arnason y col., 1966) y comparado con el EMS, éste resulta mas efectivo mutagénicamente. Así, es posible elevar la dosis del EMS hasta 10 veces con respecto a la aplicada con MMS y obtener una cantidad considerablemente mayor de mutantes que con el MMS; ya se ha mencionado que la alta toxicidad del MMS es la principal limitante para su uso, esta toxicidad es ocasionada por 2 vías: la primera son los productos de degradación formados en su reacción de hidrólisis, lo cual ocasiona un cambio drástico en el pH de las soluciones mutagénicas que alteran el ambiente celular (Rubluo, datos no publicados), además el ácido sulfónico formado en la hidrólisis es altamente tóxico pa-

ra el material tratado (Wickham y col., 1969).

La otra vía de toxicidad del MMS es la alquilación de proteínas que para este AA resulta especialmente importante dado su elevado valor de s (0.86, tabla I) que lo hace sensible a los cambios en la fuerza nucleofílica de los centros de atracción celular; puesto que las proteínas tienen una constante de nucleofilicidad (n) relativamente elevada con respecto al ADN o grupos fosfato (proteínas 5.1; ADN y fosfatos 2.5-3), el MMS muestra una tendencia a alquilar preferentemente proteínas que pueden ser enzimas importantes en el metabolismo celular o enzimas de reparación para la alquilación (Lawley, 1974).

La relación de alquilación ADN/100 moléculas de proteínas para el MMS fue establecida en 0.4 (Osterman-Golkar y col., 1970), lo cual significa que 4 moléculas de ADN son alquiladas por cada 10 de proteínas y este hecho explica su alta toxicidad, especialmente cuando la dosis se eleva.

El MMS reacciona en los centros nucleofílicos celulares por un mecanismo S_N2 (Lawley, 1974), lo cual implica que no hay formación del ion carbonio y que la molécula como tal, reacciona formando un complejo transitorio; esto da ventajas al MMS con respecto a otros alquilantes, ya que desde el punto de vista de la estereoquímica de la molécula el MMS es la mas pequeña de la serie y penetra rápidamente "como flechita" hasta las bases del ADN, alquilándolas y provocando la mutación puntual. Lawley y Shah (1972) demostraron que el MMS alquila las bases nitrogenadas del ADN con excepción de la timina, aun cuando en forma cuan

titativa el N₇ de la guanina es el sitio preferencial de alquilación; además, puede alquilar los grupos fosfato de la cadena del ADN (Rhaese y Boekter, 1973), pudiendose presentar adicionalmente transalquilaciones de los grupos fosfato a las bases nitrogenadas, incrementándose las posibilidades de inducción de mutaciones; sin embargo, se ha postulado (Ramana y Natarajan, 1966 y Mikaelson y col., 1968) que la alquilación de los grupos fosfato induce mas bien rompimientos cromosómicos.

Los grupos fosfato alquilados por el MMS son comparativamente de escasa importancia. Bannon y Verly (1972), utilizando ADN de esperma de salmón, encontraron que solamente el 1% de la alquilación total del ADN por MMS correspondía a los grupos fosfato, en tanto que para el EMS, este valor fue del 15%. Además, Singer (1975), trabajando con varios agentes metilantes y varios etilantes, concluyó que estos últimos tenían una mayor afinidad que los metilantes para la alquilación de fosfatos. La diferencia en este caso entre los agentes EMS y MMS puede ser explicada por sus mecanismos de reacción y las desigualdades estéricas de las moléculas, ya que el MMS actúa por un mecanismo S_N2 y no tiene (por su tamaño) ninguna dificultad para penetrar hasta las bases nitrogenadas, en tanto que el EMS, con una mezcla de reacciones S_N1/S_N2 y una estructura mas compleja, le es mas fácil alquilar los fosfatos que están mas expuestos que las bases nitrogenadas; de hecho, se ha demostrado que la metilación de los nucleótidos es de 5 a 10 veces mas rápida que la etilación y que la alquilación de bases, en si misma, es responsable de la

inducción de mutaciones, mas que las reacciones secundarias de transalquilación (Rahese y Boether, 1973). Wallis y Ehrenberg (1969) probaron la tendencia a la fosfoalquilación en el MMS, EMS e iPms, encontrando que estos dos últimos agentes y especialmente el iPms, debido a su fuerte impedimento estérico, reaccionan primero con los grupos fosfato de la cadena del ADN.

En mutagénesis experimental el término M_1 implica la generación tratada, es decir, las plantas provenientes de las semillas que interaccionan directamente con los mutágenos.

Los efectos de un tratamiento mutagénico pueden ser detectados a dos niveles: fisiológico y genético; en este último, la acción de los mutágenos se hace evidente en la mutación puntual, en las alteraciones cromosómicas, o en cambios fenotípicos solo detectable en la generación siguiente (M_2) a la tratada.

El daño a nivel fisiológico puede tener muchas expresiones y puede medirse en las células, órganos o en los individuos, donde provoca retardo en la expresión de ciertos caracteres y la muerte en casos severos. Aun cuando el daño fisiológico puede tener también origen cromosómico, en general se considera provocado por alteraciones extracromosómicas (Gaul, 1977) y una discriminación en el daño fisiológico por efectos de alteraciones cromosómicas o extracromosómicas es difícil de lograr, sin embargo, se considera que cuando un tratamiento mutagénico induce una baja mortalidad y una elevada frecuencia de mutaciones, puede pensarse que hubo poco daño extracromosómico.

La evaluación de los daños fisiológicos se restringe a la generación M_1 , ya que estos no alteran al genoma y, por lo tan-

to, no se expresan en las generaciones subsecuentes.

Ya se ha señalado que la principal limitante en el uso amplio de los mutágenos es la toxicidad, la que se incrementa con la dosis y esta toxicidad puede ser analizada por el daño fisiológico; en consecuencia, un tratamiento mutagénico adecuado es aquel que ocasiona daño fisiológico moderado frente a un vigoroso efecto genético.

Los parámetros de evaluación en M_1 son numerosos (Gaul, 1977), siendo algunos de ellos la germinación y curvas dosis-respuesta; la longitud de coleóptilo y plántula; la longitud de la planta al término así como algunas valoraciones agronómicas tales como el número de hijuelos en los cereales y el peso de las semillas por planta.

La germinación es un parámetro sumamente utilizado al evaluar la acción de agentes mutagénicos sobre plantas superiores (Rahman y Soriano, 1972; Veleminsky y col., 1973; Prasad y Godward, 1975). Sin embargo, los criterios de germinación no son uniformes para todos los casos (Bilan y Foster, 1970; Crafts y col., 1971; Fousova y col., 1974). Los efectos letales de los mutágenos aplicados en semillas conducen a la no-germinación de éstas, es decir, a la muerte y son usualmente analizados por la determinación de la curva dosis-respuesta. Esta curva generalmente sigue un comportamiento sigmoidal que puede ser ajustado utilizando transformaciones estadísticas y puede en esta forma calcularse la dosis letal 50 (DL50) que es aquella dosis capaz de matar al 50% de la población original (Cassarett, 1968).

En todo proceso experimental el tiempo empleado en obtener resultados es un factor importante, por esta razón es deseable contar con monitores adecuados para evaluar los efectos del experimento en el lapso mas corto posible.

El análisis de la longitud del coleóptilo y especialmente de la plántula se ha convertido en una variable sumamente útil en estudios de mutagénesis, dada la información que puede dar como respuesta fisiológica a los tratamientos (Konzak y Favret, 1972) y en vista de la rapidez con que se pueden obtener los resultados. Asi, se ha utilizado este sistema biológico para probar el comportamiento de una planta frente a un determinado agente mutagénico puesto en ciertas condiciones, por ejemplo, se ha probado con diversos mutágenos físicos y químicos para cebada (Konzak y Favret, 1972); arróz (Rahman y Soriano, 1972) para determinar el efecto del contenido de humedad de semillas tratadas con mutágenos (Gichner y Gaul, 1971); para postratamientos con agua (Gichner y col., 1972) para evaluar la interacción de un mutágeno con otras sustancias (Konzak y col., 1975); asi como para probar las diferencias en las respuestas de plantas diploides y tetradiploides (Prasad y Godward, 1975).

Una de las vías mas prometedoras en los estudios de mutagénesis experimental la constituye la manipulación adecuada de los tratamientos mutagénicos durante el ciclo de generación celular. Es bien sabido que los procesos vitales de una célula se realizan en diversas etapas que han sido denominadas como G_1 o pre-sintética, S o de síntesis, y G_2 o postsintética, para desembo-

car en la división celular o mitosis. En cada una de estas etapas se efectúan determinados procesos de metabolismo celular (Roberts, 1972) y durante la etapa de S del ADN se duplica para formar las nuevas cadenas que pasarán a la siguiente generación de acuerdo al modelo semiconservativo que para esta molécula propusieron Messelshon y Stahl.

Las células de las semillas en estado de latencia están en una etapa llamada G₀ (Fousova y col., 1974) y se ha intentado determinar la duración de cada una de las etapas del ciclo celular estableciéndose los diversos tiempos en una gran cantidad de plantas superiores (Van't Hoff, 1974). En la cebada se han establecido los tiempos de duración del ciclo celular, aun cuando varía de acuerdo a la temperatura, a la especie y al nivel de ploidía, se han encontrado valores muy cercanos entre si. Skult (1969) reporta para cebada a 25°C un tiempo total para el ciclo celular de 10.4 horas y Bennet y Smith (1971) reportan el mismo valor, pero trabajando cebada tetraploide para las mismas condiciones se obtienen valores de 11.9 (Skult, 1969) y al bajar la temperatura el ciclo se alarga un poco, dando valores de 12.4 a 20°C (Bennet y Smith, 1971).

Se ha propuesto que las etapas del ciclo celular presentan una sensibilidad diferencial a los agentes mutagénicos. Mikaelisen (1969) encontró, basándose en el análisis de las frecuencias de aberraciones cromosómicas estudiadas en mitosis, que la etapa de G₁ era la mas sensible para los agentes químicos del tipo del EMS y DES en tanto que durante G₂ se encontró mayor sensibili-

dad para los mutágenos físicos como los rayos gamma. Sin embargo, se considera que la etapa de síntesis de ADN es la mas importante y por ello se han efectuado estudios para tratar de precisar el momento en que ésta se presenta, pero los resultados son confusos aun en la misma especie, asi, diversos autores han intentado determinar el momento de la S en cebada: Arnason y col., (1966) indicaron que después de 6 horas del comienzo de la germinación se presentaba la síntesis de ADN, Savin y col., (1968) lo establecieron hasta las 22 horas posteriores al comienzo de la germinación y Mikalesen y col., (1968) encontraron a las 5 horas después de romper el estado de latencia que se presentaba un incremento en la síntesis de ADN, es decir, las células estaban en la etapa G₁ y solo después de 17 horas localizaron el pico que indicaba el inicio del período de S.

Por otro lado, se ha establecido que dando los tratamientos mutagénicos al comienzo de S en semillas de cebada, se incrementa la frecuencia de mutaciones y hay una reducción del daño fisiológico (Mikaelsen y col., 1968; Savin y col., 1968; Nilan, 1973). Estos hechos abren amplias posibilidades para que el manejo adecuado de los tratamientos redunde en significativos incrementos de la frecuencia de mutaciones.

La potencialidad de los AA no ha sido suficientemente explorada, esto es debido básicamente al gran número de factores físicos, químicos y biológicos que interactúan en los tratamientos mutagénicos para incrementar los eventos mutacionales o reducirlos (fig. 2); los experimentos para tratar de controlar y mani-

pular estos factores son numerosos (Ehremberg, 1971; Konzak y col., 1972; Nilan, 1973) los factores mas usualmente manejados son la temperatura, pH, estado fisiológico del sistema biológico, asi como las propiedades físicas y químicas de los mutágenos (solubilidad, mecanismo de reacción, vida media, etc.)

Una de las mayores limitantes en la inducción de mutaciones por AA, la constituye la toxicidad que se presenta concomitante a los tratamientos dados por estos agentes.

El control de la toxicidad de los AA por los productos de degradación puede efectuarse por la manipulación de los tratamientos mediante el uso de amortiguadores (Wickham y col., 1969) que controlan el fuerte abatimiento del pH en la solución mutagénica provocado por los productos de degradación. El control de la temperatura durante el tiempo de exposición de las semillas al AA, es también un factor importante para controlar la toxicidad (Nilan, 1973).

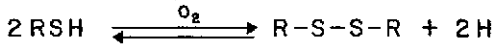
Al disolver los AA en agua a 20°C se obtienen determinadas vidas medias (Heslot, 1977), pero éstas pueden retardarse o acelerarse si la temperatura se altera (Blixt, 1972) además, la temperatura del tratamiento tiene muy poco efecto sobre la tasa de difusión del mutágeno a través de las semillas tratadas (Kamra y Brunner, 1977).

La alquilación de las proteínas, particularmente por AA con valores elevados de s (tabla I), han hecho pensar en el uso de sustancias químicas que reaccionen selectivamente con los remanentes del mutágeno. Se han utilizado con este fin dife

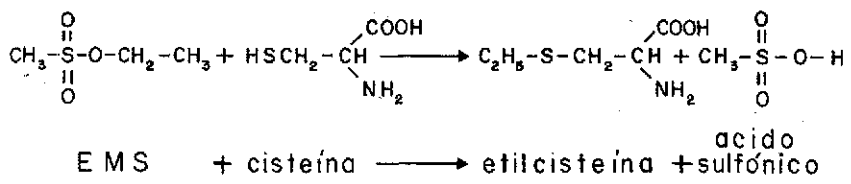
Kaul y Choudhary, 1972; Bhojwani y Kaul, 1976) han encontrado una fuerte protección contra los daños inducidos por AA, en tanto que otros (Narayanan y Konzak, 1969) han reportado solo una ligera protección. La explicación probable de las diferencias señaladas tal vez se debe a los mecanismos de reacción propios de cada mutágeno o a las condiciones específicas de cada experimento.

La molécula de la cisteína presenta como sitios nucleofílicos el grupo sulfhidrilo y el grupo carboxilo ionizado; la L-cisteína al oxidarse pasa a cistina con un puente disulfuro, esta reacción es reversible, aunque se sabe (Romantser, 1968) que su reversibilidad es baja y por esta razón es conveniente tomar en cuenta la oxidación de la cisteína durante los tratamientos con mutágenos, ya que al pasar a cistina se bloquean los centros nucleofílicos y en consecuencia la probable acción protectora.

La reacción general de oxidación está dada por:



Narayanan y Konzak (1969) recomiendan el uso de estabilizadores de la oxidación tales como el ditiotreitól, pero otros investigadores reportan aun mas protección con la cisteína sin utilizar el estabilizador (Kaul, 1969; Kaul y Choudhary, 1972; Bhojwani y Kaul, 1976). La reacción entre la cisteína y un AA como el EMS se muestra a continuación:



como se ve, en esta reacción también está presente el ácido sulfónico, por lo que esta vía de toxicidad parece difícil de controlar.

La alta especificidad de la reacción entre mutágeno y protector hacen difícil extrapolar resultados, pues además es necesario considerar la respuesta específica del sistema biológico analizado, así Rosenkranz y col., (1970) utilizaron L-cisteína para disminuir los efectos letales del MMS en bacterias, pero en lugar de protección reportaron un efecto sinérgico entre ambas sustancias que elevó la letalidad en la cepa tratada.

La justificación última de toda la experimentación con agentes mutagénicos de cualquier tipo es la evaluación de los efectos genéticos que estos ocasionan sobre los organismos tratados. En un sentido amplio se ha considerado (Auerbach, 1976) que la investigación en mutagénesis trata de satisfacer dos metas opuestas: 1) incrementar el número de mutaciones útiles, 2) minimizar el número de mutaciones dañinas.

La inducción de mutaciones experimentalmente es un método de generar variación genética y como una fuente de variabilidad, las mutaciones inducidas suplementan a la variación natural. Con respecto a este problema es pertinente aclarar algunos hechos bien establecidos al presente: las mutaciones inducidas o espontáneas son en su mayor parte recesivas y deletéreas (Gustaffson, 1975), sin embargo se ha postulado (Konzak y col., 1977) que la aparición de mutaciones dominantes también se presenta con cierta frecuencia en ambos casos (espontáneas e indu-

cidas). Así, la producción de un amplio espectro de mutantes en una población vegetal es un hecho deseable ya que el mejoramiento genético de una especie utilizando agentes mutagénicos (eficiencia mutagénica) está en relación directa a la cantidad de mutantes obtenidos (efectividad mutagénica) y de esta manera es posible seleccionar aquéllos que presentan alguna ventaja desde el punto de vista práctico. Las mutaciones "útiles", consideradas antropocéntricamente, son mas bien raras, pero debido a que en la mutación inducida pueden obtenerse en frecuencias relativamente elevadas, la implementación de esta metodología con fines de fitomejoramiento constituye una herramienta de gran utilidad para los fines del hombre.

El uso de la cebada como monitor en mutagénesis experimental, es además del mas antiguo (Stadler, 1928) el de mayor frecuencia en este tipo de investigaciones, y un gran porcentaje de la literatura internacional en esta área está referida a los resultados obtenidos en este cereal. Las razones de esta popularidad han sido señaladas por diversos autores (Ehrenberg, 1971; Konzak y Favret, 1972; Nilan y Vig, 1976) y se debe básicamente a la fácil manipulación en laboratorio de algunas variables fisiológicas (germinación, altura del coleóptilo y plántula) o citogenéticas (aberraciones cromosómicas en mitosis), facilitada por su reducido número de cromosomas ($2n=14$) los cuales son relativamente grandes, además de la aparición de mutaciones clorofílicas en un estado temprano (plántula) de semillas M_2 provenientes de la generación tratada (M_1), finalmente su sistema de

reproducción autógamo permite la posterior evaluación de posibles mutantes en generaciones avanzadas.

El triticale es un nuevo género vegetal producido artificialmente por el hombre y resulta de cruzar trigos hexaploides o tetraploides con especies diploides de centeno duplicando posteriormente sus cromosomas en el híbrido estéril F_1 ; una excelente revisión de este interesante género lo constituye el trabajo de Zillinsky (1974).

Debido a su corta existencia como género independiente, el triticale carece prácticamente de historia evolutiva, lo cual le permite ser un excelente material de experimentación, particularmente en mutagénesis, ya que la variabilidad genética en este género está restringida y puede por medio de la inducción de mutaciones, ampliarse su base genética y darle mayor capacidad de juego a sus genes desde el punto de vista antropocéntrico; de hecho se sabe que junto con ciertas ventajas agronómicas tales como un mayor contenido en proteínas (con relación al trigo) y mejores propiedades de panificación (Quiñones, 1973) este cultivo presenta severas restricciones, por ejemplo, bajo rendimiento, enfermedades y problemas de "acame" por una inadecuada altura de la planta (Zillinzky y López, 1973), que han ocasionado que hasta el momento el triticale no pueda competir con otros cereales en cuanto a utilidad para el hombre.

OBJETIVOS:

La optimización de un sistema mutagénico es el primer paso para lograr el incremento en la efectividad mutagénica. Para alcanzar este objetivo es necesario conocer la respuesta de un sistema biológico modelo frente a un agente mutagénico determinado. Por lo anterior, en este trabajo se exploró el comportamiento del AA MMS en diferentes sistemas mutagénicos, utilizando cebada de las variedades Himalaya C.I.-620 y la común o criolla, además de triticale de la variedad Bacum como material biológico, por las siguientes razones:

La cebada var. Himalaya es el patrón mas generalmente utilizado en el ámbito internacional y por esta razón sirve como excelente monitor estandard para los experimentos en mutagénesis. Es de interés señalar que esta misma variedad (Himalaya C.I.-620) fue la utilizada por Stadler (1928) en sus experimentos originales de mutagénesis.

La variedad común o criolla, es una de las de mayor cobertura de siembra en nuestro país (Riojas, 1976) y por lo mismo presenta interés como material experimental.

El triticale de la variedad Bacum presenta algunos caracteres de relevancia agronómica (alto rendimiento) pero también muestra caracteres negativos tales como el arrugamiento del grano y porte alto de la planta, llegando a presentar problemas de acame hasta en un 88% (CIMMYT, 1977) por lo que en esta investigación se intentó la inducción y selección de mutaciones para

enanismo.

Por otra parte el MMS, es un agente alquilante monofuncional que ha sido relativamente poco utilizado en la inducción de mutaciones en plantas superiores. Sin embargo, presenta algunas características que lo hacen ser una sustancia de gran potencialidad para inducir mutaciones; su molécula es la mas pequeña de la serie de los alcanos sulfonatos, por lo cual puede penetrar con facilidad hasta las bases nitrogenadas, alterarlas y provocar la mutación; reacciona via S_N2 , lo cual le permite actuar (en ciertas condiciones experimentales) sin necesidad de la hidrólisis disminuyendo asi su toxicidad y se puede intentar eliminar el remanente de mutágeno haciendolo reaccionar con sustancias químicas protectoras que contengan centros nucleofílicos de alta atracción. En esta investigación se exploraron estas potencialidades del MMS, bajo diferentes condiciones de experimentación. El objetivo fue el establecimiento de un sistema de tratamiento mutagénico que minimice los efectos tóxicos del mencionado AA, que permita además interpretar la interacción de los sistemas biológicos, químicos y físicos en parámetros de evaluación en la generación M_1 (germinación, crecimiento de coleóptilo y plántula) estudiada bajo condiciones de laboratorio, utilizando el modelo de la cebada.

Finalmente se hicieron pruebas para inducción y selección de mutantes en Triticale hexaploide Lart, las cuales fueron analizadas tanto en la generación M_1 como en la M_2 , en experimentos de invernadero y campo.

MATERIALES Y METODOS

1. Material biológico utilizado*.

Se emplearon dos variables de cebada: la Himalaya C.I. -620 y la común o criolla. Del Triticale hexaploide Lart se utilizó la variedad Bacum la cual proviene de la cruzada Maya II - Am "S" y su pedegree es: x 2832 - 24N - 3M - 7N - 4M - OY.

El sistema de reproducción autógeno de estos organismos permite la posterior evaluación de posibles mutantes en generaciones avanzadas.

2. Reactivos utilizados.

El agua en la que se prepararon todos los reactivos fue desionizada y desmineralizada obtenida de un equipo ultramillipore de 9 mega ohms de resistencia.

Se utilizó el agente alquilante MMS (Merck) C₂H₆O₃S con un

* El autor agradece cumplidamente a las siguientes personas e instituciones, su generosa donación del material biológico empleado en el presente trabajo:

- 1) Cebada var. Himalaya C.I. -620:
Professor Cal. F. Konzak. Department of Agronomy and Soils, Washington State University, Pullman Wash, U.S.A.
- 2) Cebada var. común o criolla:
M. en C. Enrique Riojas. Depto. de Cereales I.N.I.A. Campo Experimental "El Horno", Chapingo, México.
- 3) Triticale hexaploide Lart var. Bacum:
Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. Campo Experimental "El Batán", (CIMMYT). México, por cortesía del Dr. Rubén Sosa Ch.

PM de 110.13; d=1.30 (20°/4°) y una pureza de 98% dada por cromatografía de gases. Este reactivo se mantuvo siempre en obscuridad y en refrigeración (8°C).

En la preparación de las soluciones amortiguadoras se utilizó el ácido poliprotónico H₃PO₄ y sus sales de potasio (KH₂PO₄; K₂HPO₄ y K₃PO₄) todos reactivos grado analítico (Merck).

Se uso L-cisteína con un PM de 121.16 y un 99% de pureza de la casa Merck, así como L-cistina (Eastman Organic Chemicals), para usos químicos.

Se trabajó con placas de sílica-gel (Merck 60F-254) de 5x10 cm. con espesor de la capa de 0.25 mm. El etanol y el ácido acético utilizados fueron de la casa Merck. ambos de 99.5% de pureza.

La ninhidrina fue de la casa Merck.

3. Tratamientos con el MMS.

La metodología seguida para cada tratamiento, tuvo ligeras variaciones de acuerdo a los objetivos de los experimentos debido a que se investigó el comportamiento del mutágeno en semillas tratadas en las siguientes condiciones experimentales:

- 3.1. Tratamientos de semillas de cebada var. Himalaya en soluciones de MMS hechas en agua desmineralizada y desionizada a las concentraciones 0.0, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1.1, 1.3, y 1.5 p/vol. y temperatura de tratamiento de 10 y 20°C.

- 3.2. Pretratamiento en agua (remojo) de las semillas de ce
bada var. Himalaya durante 15 horas a $20^{\circ}\text{C} \pm 1$ e inme
diatamente puestas en tratamiento en soluciones acu-
osas de MMS a las concentraciones 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4
0.5% p/vol. y temperaturas del tratamiento de 10 y 20°C .
- 3.3. Tratamiento de semillas de cebada var. Himalaya en so-
luciones de MMS efectuadas en amortiguadores de fosfa-
tos 0.05 M a los valores de pH: 3.0, 7.0 y 11.5; las
concentraciones de MMS estudiadas en este experimento
fueron 0.0, 0.3, y 0.5% p/vol. a temperaturas de trata-
miento de 10 y 20°C .
- 3.4. Pretratamiento en agua (remojo) de las semillas de ce
bada var. común o criolla durante 15 horas a $20^{\circ}\text{C} \pm 1$
e inmediatamente puestas en tratamiento en solución a
cuosa de MMS a las concentraciones 0.0, 0.2, 0.5, y
0.7% p/vol. a 20°C . En este experimento se aplicó in-
mediatamente después del tratamiento un postratamien-
to de 1 hora a 20°C en solución acuosa de cisteína
0.01 M.
- 3.5. Tratamiento de semillas de triticale en solución acuo-
sa de MMS a las concentraciones de 0.0, 0.3, 0.6, 0.9,
y 1.0% p/vol. a 20°C .

Todos los tratamientos fueron de una hora de exposición
al mutágeno.

Los lotes de semillas fueron seleccionados visualmente con
el objeto de tenerlos lo mas similares posible, tanto en tamaño

como en aspecto del embrión, para las variedades de cebada las semillas estuvieron entre 7 y 9 mm. (Himalaya) y 10-12 mm. para la variedad común o criolla, en tanto que para el triticale, las medidas fueron entre 8 y 10 mm., por lo general las semillas no estuvieron contaminadas, con hongos o bacterias exteriores, y no hubo necesidad de desinfectarlas, excepto para las semillas de triticale, las cuales se desinfectaron siempre con hipoclorito de sodio al 4.5% durante 1 min. y con agitación manual constante.

Las semillas se lavaron con agua corriente durante 2 horas antes de los tratamientos con el mutágeno, de acuerdo al sistema propuesto por Meneses y Rubluo (1978), en el caso de los experimentos en los que las semillas se llevaron al estado de S del ADN, se dieron pretratamientos en los que las semillas se colocaron en matraces de 100 ml. con agua desmineralizada y desionizada y se pusieron en una cámara de temperatura controlada (20°C) durante 15 horas antes de entrar a tratamiento con el mutágeno.

Las semillas con y sin pretratamiento fueron puestas inmediatamente en tubos de ensaye de 20x3 cm. los que contenían 100 ml. de solución acuosa de MMS fresca, es decir preparada justo antes de ser empleada. Los tratamientos se hicieron utilizando el sistema propuesto por Meneses y Rubluo (1978).

Al terminar el tiempo de tratamiento, las semillas fueron lavadas en agua corriente (Meneses y Rubluo, 1978) durante 5 min., para eliminar el exceso de alquilante y detener la reacción.

En todos los experimentos anteriores, después de que las semillas eran lavadas durante 5 min. en agua corriente, se sembraron en lotes de 50, 75, 100 o 120 semillas, en cajas de plástico de 35x28x14 cm. con una capa de algodón de 30 g. \pm 2 y cubiertas con una hoja de papel filtro Wattman 1, estéril y humedecido con 450 ml. de agua destilada, para evitar la evaporación, las palanganas fueron cubiertas con un armazón de bronce recubierto con polietileno transparente con 6 perforaciones de 1.2 cm. de diámetro cada uno. Los lotes fueron colocados en una cámara de germinación en total obscuridad a 21°C \pm 1 bajo un diseño de bloques completamente al azar con 3 repeticiones. Las semillas se consideraron germinadas cuando presentaban sus raíces, coleóptilo y plántula completas y fueron determinadas junto con el crecimiento de coleóptilos y plántulas las cuales se midieron 15 días después del tratamiento, tiempo en el que se ha propuesto que estas estructuras detienen su crecimiento (Konzak y Favret, 1972).

El porcentaje de daño inducido por las diferentes dosis de MMS sobre los coleóptilos y las plántulas de cebada fueron calculados de acuerdo al método propuesto por Conger y col. (1968) en el que:

$$\% \text{ de daño} = \frac{L_0 - L_t}{L_0} \times 100$$

donde: L_0 = longitud promedio del lote testigo

L_t = longitud promedio del lote tratado

4. Medición de los cambios de pH en soluciones acuosas de MMS.

Los cambios en valores de pH de soluciones acuosas de MMS se siguieron a tres diferentes temperaturas (10, 20 y 30°C) a las concentraciones 0.2, 0.4 y 0.6% p/vol., las lecturas fueron tomadas cada 20 min. durante 2 horas en un potenciómetro Beckman Zeromatic.

5. Análisis de la estabilidad de la cisteína.

Se corrieron cromatogramas de cisteína a diferentes tiempos para seguir el proceso de transformación de la cisteína a cistina teniendo como patrón de comparación soluciones equivalentes de esta última.

Se utilizó el método de Slaten y col. (1956) el cual detecta en el mismo sistema a la cisteína y a la cistina diferenciándolas por su Rf en cromatografía de capa fina. Para preparar las soluciones de cisteína y cistina se usó agua desionizada, desmineralizada y hervida para eliminar el O₂. Se hicieron soluciones de cisteína y de cistina (Merck) 0.01 M y 0.05 M de las cuales se tomaron alícuotas de 1 µl a las 0, 2, 4 y 18 horas y se aplicaron sobre placas de sílica-gel.

El eluyente utilizado fue una mezcla de etanol (5) H₂O (1) ácido acético (0.1). Una vez que las placas corrieron (1 hora) fueron secadas en estufa (110°C) y reveladas con ninhidrina.

Los resultados (fig. 3) mostraron que tanto a las 0 como a

las 2 horas de haber preparado las soluciones no se detectó transformación de cisteína a cistina, siendo hasta las 4 horas cuando comenzaron a aparecer manchas de cistina y a las 18 horas estas manchas se hicieron mas firmes.

6. Experimentos de invernadero y campo.

Se utilizaron las semillas de Triticale hexaploide Lart var. Bacum, y se sembraron en los invernaderos de la Escuela de Agricultura del Edo. de México en Santa Elena, (Edo. de México), (generación M₁) y en el campo experimental del Centro de Investigaciones y Desarrollo Agrícola y Ganadero del Edo. de México, en Metepec, México (generación M₂).

Los tratamientos mutagénicos se efectuaron como ha sido descrito pero para estos experimentos se utilizaron las dosis de MMS: 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5% p/vol./hora a 20°C. Los lotes para este experimento fueron de 30 semillas las cuales fueron puestas después del tratamiento en cajas de petri con algodón humedecido y llevadas al invernadero para su siembra en macetas. Se utilizó un diseño experimental de bloques al azar con 4 repeticiones. La germinación se determinó un mes después de la fecha de siembra y se cosechó cuando las espigas estuvieron maduras y secas (7 meses después de sembradas). De las semillas sembradas en el ciclo 1977 se evaluaron al azar 10 plantas de cada dosis y se les midió la altura, el número de hijuelos y el peso en gramos de todas las semillas obtenidas de una planta in

dividual.

Para la siembra de la generación M_2 se hizo una selección de progenie por planta en función de la menor altura de la planta y su rendimiento (peso del grano). Se sembraron tres repeticiones por tratamiento con 42 semillas cada uno.

Casi al final del ciclo de crecimiento de las plantas en el campo, se efectuó una selección visual de plantas probables mutantes, además se determinó el tiempo de maduración detectándose plantas normales, precoces, muy precoces, tardías y muy tardías.

RESULTADOS Y DISCUSION

1) Determinación de las dosis letales 50 (DL50) para las semillas de cebada var. Himalaya.

La determinación de las DL50 se ha considerado (Fuji y Matsumara, 1958; Yim, 1963; Clark y col., 1968 y Konzak y Mikaelson, 1977) como un factor muy importante en el conocimiento del comportamiento de los agentes mutagénicos frente a diferentes sistemas biológicos y en general, el comportamiento de la respuesta de parámetros fisiológicos medidos en la generación M₁ tales como longitud de la planta, daño cromosómico, etc. están en función de la dosis, es decir al incrementarse ésta, se eleva el efecto sobre los parámetros biológicos considerados (Prasad y Godward, 1975; Gaul, 1977). Nuestros resultados muestran también esta tendencia general (tablas II, III y VIII).

Los valores de la germinación de 3 experimentos para cada caso considerado fueron transformados a unidades probit y ajustados para obtener sus ecuaciones de regresión. La figura 4 nos muestra las líneas de regresión para semillas tratadas a 10 y 20°C con diferentes concentraciones de MMS, como se puede apreciar, el comportamiento para estas condiciones fue diferente en función de la temperatura encontrándose mayor mortalidad a 20°C en tanto que en 10°C la máxima dosis de MMS aplicada (1.5% p/vol/hora) disminuyó la viabilidad a un poco menos del 50% de las semillas expuestas y la línea quebrada para 10°C (fig. 4) es una extrapolación dada por el programa probit SAS

donde se corrieron los datos. La figura 5 muestra las líneas de regresión cuando las semillas fueron pretratadas durante 15 horas en agua, aquí la diferencia entre los tratamientos a las temperaturas probadas no fue tan pronunciada. En la tabla II se ven las concentraciones calculadas para diferentes valores de letalidad inducida sobre las semillas de cebada var. Himalaya, pueden observarse claramente las marcadas diferencias debidas a la temperatura asi como los efectos del pretratamiento que conduce a la semilla hasta el estado de S del ADN.

Al aplicarse una prueba de t de student modificada* para contrastar las ecuaciones de las líneas de regresión probit de las semillas expuestas en las diferentes condiciones experimentales (fig. 4 y 5) se encontró una diferencia claramente significativa ($t=9.32$) entre las líneas de regresión probit para estimar la mortalidad inducida en semillas de cebada expuestas a diferentes temperaturas (fig. 4) en tanto que no se encontró diferencia significativa ($t=1.39$) para el efecto de las temperaturas cuando se dio el pretratamiento de 15 horas en agua que condujo

$$* \quad t = \frac{b_1 - b_2}{S^2 b_1 + S^2 b_2}$$

donde:

b_1 = pendiente de la ec. 1

b_2 = pendiente de la ec. 2

$S^2 b_1$ = varianza de la pendiente de la ec. 1 tomada de la matriz de covarianza de la ec. 1

$S^2 b_2$ = varianza de la pendiente de la ec. 2 tomada de la matriz de covarianza de la ec. 2

con $g_1 = g_{11} + g_{12}$

a las semillas hasta el estado de S del ADN antes de administrar el mutágeno (fig. 5).

Estos resultados están de acuerdo con aquéllos reportados por Blixt (1967); Gelin (1968) y Blixt (1972); quienes encuentran que para el EMS los tratamientos dados a bajas temperaturas presentaron un menor efecto para las semillas tratadas debido a la menor toxicidad de los productos de hidrólisis del EMS, los cuales han mostrado ser tóxicos pero no mutagénicos; además en las bajas temperaturas las moléculas presentan una menor movilidad y en consecuencia una menor reactividad y un alargamiento de su vida media.

En nuestros resultados la menor acción tóxica del MMS cuando no se dio el pretratamiento (fig. 4 y tabla II) puede ser utilizada para elevar la efectividad mutagénica del agente ya que al retrasarse la hidrólisis por efectos de la temperatura, y presentar este AA un mecanismo de reacción S_N2 (fig. 1) en el cual no es necesario que la molécula del alquilante se escinda para actuar sobre las moléculas blanco, la toxicidad causada por los productos de degradación (ácido metilsulfónico) disminuye, en tanto que su capacidad de alquilación permanece.

Por otro lado, la vida media del MMS es temperatura dependiente (Kamra y Bruner, 1977) y por esta razón la cantidad del mutágeno activo decrece con el tiempo a una tasa que depende en gran parte de la temperatura del tratamiento (Konzak y col., 1965) mientras que en la misma medida se incrementa con el tiempo la concentración de productos tóxicos. Estos inconvenientes

son por lo tanto controlados y evitados con el uso de las bajas temperaturas, mas aun, si se considera que bajo estas condiciones la difusión del mutágeno a través de las semillas tratadas no se ve afectada (Kamra y Brunner, 1977).

Las dosis en mutagénesis química están dadas por la integral de la temperatura concentración y tiempo (Kamra y Brunner, 1977) por lo que es importante considerar el tiempo de exposición debido a la duración de la vida media del mutágeno (por ejemplo el iPms tiene una vida media de 108 min. a 20°C) sin embargo, para el MMS éste no es el caso ya que tiene una vida media de 68 horas a 20°C; a pesar de esto en nuestros experimentos se dieron tiempos de exposición de 1 hora debido a que se ha encontrado que la mayor efectividad de un mutágeno se expresa a concentraciones administradas durante tiempos cortos (Ashri y Levy, 1974; Padova y Ashri, 1977; Levy y col., 1979).

Los resultados obtenidos para la mortalidad inducida después de someter el material a pretratamientos de 15 horas no dieron diferencias significativas entre los tratamientos a 10 y 20°C (fig. 5 y tabla II), sin embargo a pesar de la no diferencia estadísticamente significativa, se observó (fig. 5) una menor mortalidad a 10°C particularmente a las dosis bajas. Además las dosis de las diferentes DL calculadas para las semillas pretratadas fueron sensiblemente menores a aquéllas calculadas sobre semillas sin pretratamiento (tabla II). Estos resultados implican que la mayor toxicidad del MMS está relacionada con la alquilación de las proteínas como ha sido señalado por Osterman-Golkar

y col. (1970) ya que después de 15 horas de pretratamiento una gran cantidad de proteínas fisiológicamente importantes han sido sintetizadas y el MMS que ha penetrado actúa sobre una mayor cantidad de ellas que cuando sin pretratamiento, se aplica el tratamiento a semillas en estado de G₁.

2) Determinación del daño sobre coleóptilo y plántula en cebada.

Se cuantificó el crecimiento y porcentaje de daño en coleóptilos y plántulas de semillas de cebada var. Himalaya en base a los datos de 3 repeticiones por experimento.

En la tabla III se presentan las medias así como diferentes estadísticos y el porcentaje de daño con respecto al testigo de los coleóptilos de semillas tratadas a diferentes temperaturas y dosis de MMS, en esta tabla se aprecia una caída de la media al incrementarse la dosis así como una tendencia general del coeficiente de variación a crecer con la concentración del mutágeno, sin embargo, esto no es una manifestación por heterogeneidad de varianzas, sino que es un efecto por la disminución del promedio. Para determinar la acción de las concentraciones de MMS y las temperaturas de los tratamientos, de las medias de la tabla III se generó un análisis de varianza con dos entradas y una observación (tabla IV). Sin embargo, como en los tratamientos a 20°C en la concentración 1.3% p/vol/hora se alcanzó la letalidad completa, solamente se analizó hasta la concentración 1.1 para ambas temperaturas. Los resultados muestran

(tabla IV) una significatividad tanto para temperaturas como para las concentraciones de MMS. En vista de estos resultados se decidió generar otro análisis de varianza para detectar el efecto de las interacciones entre temperatura y concentración. La tabla V muestra los valores obtenidos por repetición y la tabla VI es el análisis de varianza de estos datos, encontrándose una alta significatividad para todos los casos incluso la interacción temperatura por dosis; además se graficaron los promedios de la longitud de los coleóptilos contra las concentraciones dadas a las diferentes temperaturas para mostrar la interacción entre concentraciones y temperatura (fig. 6).

Nuestros conocimientos sobre las reacciones químicas precisas que se efectúan en el interior de la célula, las cuales conducen a los daños fisiológicos inducidos por los mutágenos son todavía muy incompletos, pero la acción modificadora de la temperatura sobre los efectos de los mutágenos, es fácil de comprender si consideramos que la reacción entre agente químico y molécula blanco es temperatura-dependiente, y que hay un retraso en la degradación del mutágeno (Kamra y Brunner, 1977); además se considera que los procesos de mutación son menos afectados por las temperaturas que el daño fisiológico o las aberraciones cromosómicas inducidas por los tratamientos (Blixt, 1972).

Por otro lado, debido a que se detectaron efectos de la temperatura y la concentración del MMS, se realizó la prueba de Student Newman-Keuls (SNK) para contraste múltiple de medias para determinar las semejanzas y diferencias entre los distintos

tratamientos. Los resultados se muestran en la tabla VII en la cual se establece que entre las concentraciones 1.1, 0.9 y 0.5% p/vol/hora de MMS a 20°C no hubo diferencias en cuanto a este parámetro, al igual que entre 1.1, 0.9% p/vol/hora de MMS a 10°C y entre los testigos para 10 y 20°C en tanto que todos los demás tratamientos fueron significativamente diferentes entre sí.

Para analizar el efecto de las temperaturas y concentraciones de MMS sobre el crecimiento de las plántulas de semillas de cebada var. Himalaya se siguió el mismo procedimiento que para los coleóptilos.

La tabla VIII muestra las medias de las longitudes de las plántulas así como el porcentaje de daño con respecto al testigo. Los resultados muestran una caída de la media al incrementarse la dosis así como un aumento del daño.

De las medias dadas en la tabla VIII, se generó un análisis de varianza (tabla IX) considerando solamente hasta la concentración 1.1% p/vol/hora de MMS, la significatividad de concentraciones y temperaturas mostradas por este análisis (tabla IX) obligó a realizar otro análisis de varianza factorial 2x6 con 3 repeticiones (tablas X y XI) para detectar la interacción temperatura-concentración de MMS. Al demostrarse esta interacción (tabla XI y fig. 7) se efectuó una prueba de contraste múltiple de medias (SNK) debido a que se presentaron diferente número de individuos como consecuencia de la mortalidad de los tratamientos. Los resultados (tabla XII) fueron semejantes a

los del coleóptilo, es decir las concentraciones 1.1 y 0.9 de MMS a 20°C fueron iguales y las concentraciones 1.1 y 0.9 a 10°C también tuvieron el mismo comportamiento así como los testigos de ambas temperaturas fueron iguales; todas las demás concentraciones no se agruparon entre sí indicando una independencia en su comportamiento.

El porcentaje de daño con respecto al testigo para coleóptilos y plántulas de semillas tratadas a 10 y 20°C a las diversas concentraciones de MMS analizados (tablas III y VIII) mostró un incremento al aumentar la dosis por lo que se hicieron los ajustes para encontrar la función matemática que definiera mejor la tendencia del comportamiento de este parámetro en las diversas condiciones estudiadas (tabla XIII) se encontró que en todos los casos el mejor ajuste fue el de la función cuadrática (parabólica) de acuerdo a la prueba de x^2 para la bondad de ajuste (tabla XIII) y al determinar los coeficientes de correlación para las ecuaciones cuadráticas generadas (tabla XIV) éstos fueron elevados por lo que se graficaron los resultados de acuerdo a esta función matemática.

La figura 8 muestra la expresión gráfica del efecto de la temperatura de tratamiento sobre el porcentaje de daño de los coleóptilos con respecto al testigo de semillas tratadas con diversas concentraciones de MMS, y la fig. 9 los resultados gráficos para las plántulas. En ambos casos (fig. 8 y 9) se nota un mayor daño a 20°C y una clara diferencia entre ambas temperaturas.

Los efectos de los agentes mutagénicos han sido evaluados por el daño fisiológico expresado como disminución del crecimiento de coleóptilos y plántulas, así como por el porcentaje de daño con respecto al testigo (Conger, 1968; Konzak y Favret, 1972; Veleminsky y col., 1973 y Gaul, 1977). Nuestros resultados muestran una disminución de estos parámetros al incrementar se la dosis, así como una elevación en el porcentaje de daño con respecto al testigo (tabla III y VIII), coincidiendo estos datos con aquéllos reportados por los mencionados autores así como con los de Nagaraja y Natarajan (1965); Yamaguchi y Matsubayashi (1973); Shkvarnikov y Kulik (1975); Lindgreen y col. (1976); así como con aquéllos presentados por Rubluo y col. (1980) al evaluar el daño cromosómico ocasionado por el MMS en cebada. Además en nuestros resultados se encontró que este comportamiento es independiente de la temperatura ya que tanto a 10°C como a 20°C se observaron los mencionados efectos. Por otro lado el porcentaje de daño con respecto al testigo siempre fue mayor para las plántulas que para los coleóptilos (tabla III y VIII) esto ya había sido señalado por Konzak y Favret (1972) quienes encontraron una mayor resistencia a los efectos de las radiaciones y agentes químicos para los coleóptilos con relación a las plántulas, fenómeno que se debe tal vez al hecho de que la plántula crece fundamentalmente por un proceso de división celular el cual se ve fuertemente alterado por los mutágenos, en tanto que los coleóptilos presentan principalmente elongación celular en su crecimiento mas que división celular y

de esta forma pueden ser menos afectados por los mutágenos (Liptay y Davidson, 1972). En consecuencia, se considera que los datos arrojados del análisis del crecimiento de los coleóptilos son menos útiles que los de las plántulas, aunque aun así es recomendable tomarlos en consideración (Konzak y Favret, 1972).

Las tablas VI y XI y las figuras 6 y 7 muestran que existe una clara interacción entre temperatura y dosis tanto para coleóptilos como para plántulas y esta interacción implica en consecuencia la dependencia del efecto del mutágeno en función de la temperatura al encontrarse claramente un mayor crecimiento a 10°C (fig. 6 y 7) y un porcentaje de daño mas elevado a 20°C que a 10°C (fig. 8 y 9). Estos datos no coinciden con aquéllos presentados por Kaul (1969a) para semillas de triticale tratadas con nitrosoguanidina (NG) ya que este autor no encontró diferencia significativa entre el efecto de los tratamientos a 10 y 20°C, estas discrepancias podrían deberse a la diferencia de ploidías entre cebada y triticale el cual presenta un mayor número de juegos cromosómicos y en consecuencia un efecto "amortiguador" (Djelepov, 1976) contra la expresión de acción de los mutágenos, sin embargo, cuando Kaul (1969a) dio los tratamientos a 32° los daños inducidos fueron altamente significativos con respecto a los tratamientos a 10 y 20°C.

Por otro lado, Rahman y Soriano (1972) describieron un comportamiento cuadrático para algunos parámetros evaluados en M_1 en semillas de arroz tratadas con MMS; estos daños coinciden con lo encontrado en el presente trabajo (fig. 8 y 9). El hecho

de que los datos experimentales se ajusten al modelo cuadrático puede tener cierta importancia desde el punto de vista práctico ya que de acuerdo a estas observaciones los daños ocasionados por el MMS se incrementan con la dosis, sin embargo esto no se presenta en forma directa o lineal, pues para las bajas dosis y las intermedias se mantiene una relación lineal, pero al elevarse las cantidades de mutágeno (altas dosis) el daño ocasionado ya no es tan acusado, es decir el efecto de las dosis disminuye (fig. 8 y 9) esto implica que el mutágeno después de ciertas dosis ya no puede continuar dañando tal vez por una saturación de blancos, sin embargo debido a la fuerte diferencia de daño por efecto de la temperatura (fig. 8 y 9) es posible utilizar dosis relativamente altas de MMS a bajas temperaturas controlando así el daño fisiológico e incrementando concomitantemente las probabilidades de inducción de mutaciones.

La prueba SNK para coleóptilos y plántulas arrojó poca información sobre los tratamientos óptimos ya que no formó grupos en los cuales puedan aprovecharse las condiciones experimentales (tablas VII y XII) sin embargo, si se observa el orden en que se establecieron los grupos con respecto al testigo se puede notar que los valores mas cercanos a éste son los tratamientos dados a 10°C (tablas VII y XII), además es necesario hacer notar la alta sensibilidad de la prueba SNK, ya que por ejemplo los valores de coleóptilos (tabla VII) para las dosis $0.7/10^{\circ}\text{C}$ y $0.3/20^{\circ}\text{C}$ fueron respectivamente 51.43 y 49.23, es decir diferencias mínimas fueron sin embargo significativamente diferentes.

3) Determinación del daño sobre coleóptilos y plántulas inducido en semillas de cebada pretratadas con agua.

Después del pretratamiento de semillas para alcanzar los diferentes estados del ciclo celular, se ha demostrado una mayor frecuencia de mutaciones durante el estado de S, particularmente si los tratamientos con el mutágeno se dan en tiempos cortos de exposición (Yamaguchi, 1976); se efectuaron estos experimentos con el objeto de conocer los daños fisiológicos inducidos por el MMS durante el arranque de la etapa de S.

Las tablas XV y XX muestran respectivamente los resultados obtenidos para el crecimiento y porcentaje de daño de los coleóptilos y las plántulas de semillas de cebada pretratadas durante 15 horas en agua y posteriormente tratadas con MMS a diferentes dosis y temperaturas, en ambos casos la tendencia general es la misma, disminución de los valores de las medias para las longitudes de las estructuras medidas y aumento del coeficiente de variación y del daño inducido por el mutágeno. Sin embargo, los resultados para el análisis de varianza de las medias de coleóptilos y plántulas, generadas de las tablas XV y XX no fueron iguales, para los coleóptilos (tabla XVI) se obtuvieron valores significativos tanto para las concentraciones como para las temperaturas, en tanto que para las plántulas ninguno de los factores analizados (concentración y temperatura) tuvo efecto significativo (tabla XXI). Sin embargo, al graficar los promedios de la longitud de coleóptilos y plántulas (fig. 10 y 11) se detectó un efecto de interacción entre dosis y temperatura por

lo que se pensó que el efecto de interacción se podría estar enmascarando para las plántulas. Cuando los datos se analizaron bajo un factorial de 2×6 con 3 repeticiones (tabla XVII para coleóptilos y XXII para plántulas) se demostró una significatividad para todos los parámetros analizados (tabla XVIII para coleóptilos y XXIII para plántulas) comprobándose además el efecto de interacción entre dosis y temperaturas.

Los coleóptilos y plántulas de semillas pretratadas y puestas en solución de MMS a 10°C mostraron tanto en sus medias de crecimiento como en el porcentaje de daño con respecto al testigo (tablas XV y XX), un efecto relacionado con la concentración (disminución para el crecimiento e incremento para el porcentaje de daño) sin embargo esta relación (concentración-daño) no fue muy marcada comparada a cuando no se dio el pretratamiento en donde los incrementos en la concentración de MMS provocaron un mayor daño (tabla III y VIII) particularmente al comparar el ocasionado a las plántulas de semillas pretratadas (tabla XX y fig. 11 y 13). Este efecto fue el que probablemente ocasionó el enmascaramiento de la interacción entre temperatura y dosis; la cual fue demostrada (fig. 10 y 11 y tablas XVIII y XXIII). Esta interacción temperatura-concentración puede ser utilizada particularmente a dosis medias y altas, ya que en éstas, a temperatura de 10°C , el daño fisiológico no es fuerte y es posible, debido al pretratamiento que sitúa a las células en un estado de S, el incrementar las posibilidades de lograr un buen rendimiento de mutantes (Savin y col., 1968; Tarasenko, 1974 y

Yamaguchi y col., 1974).

En vista de la significatividad de los análisis de varian-za para interacción dosis-temperatura en coleóptilo (tabla XVIII) y en plántula (tabla XXIII) las medias de estos experi-mentos fueron analizados por la prueba SNK para contraste múlti-ple de medias (tablas XIX y XXIV), donde se localizaron también algunas diferencias entre coleóptilos y plántulas, en ambos ca-sos los testigos fueron iguales, pero para el coleóptilo (tabla XIX) las concentraciones $0.5/10^{\circ}\text{C}$; $0.3/20^{\circ}\text{C}$; $0.4/10^{\circ}\text{C}$ y $0.2/20^{\circ}\text{C}$ tuvieron un comportamiento estadísticamente similar, en tanto que para plántulas en este mismo grupo, además de las mencionadas tenemos que las concentraciones $0.2/10^{\circ}\text{C}$ y $0.3/10^{\circ}\text{C}$ también formaron parte del mismo grupo (tablas XIX y XXIV) para coleóptilo hubo todavía otros 2 grupos formados uno por las con-centraciones $0.2/20^{\circ}\text{C}$ y $0.3/10^{\circ}\text{C}$ y el otro por $0.3/10^{\circ}\text{C}$ y $0.2/10^{\circ}\text{C}$ en tanto que para plántula se presentó solamente un grupo mas, el formado por las concentraciones $0.1/10^{\circ}\text{C}$; $0.3/10^{\circ}\text{C}$ y $0.2/20^{\circ}\text{C}$ todos los demás valores de las medias fueron signifi-cativamente diferentes entre si. En los análisis por la prueba SNK se refleja también una menor dependencia de la acción de la concentración con la temperatura (efecto de enmascaramiento de la interacción) con respecto a los experimentos efectuados sin pretratamiento particularmente para dosis bajas ya que por ejemplo para plántula (tabla XXIV) se formó un grupo que incluía las mismas dosis de MMS (0.2 y 0.3% p/vol/hora) dadas indistin-tamente a la temperatura de 10 o 20°C .

Al graficar los resultados del porcentaje de daño con relación al testigo para los coleóptilos y las plántulas pretratadas con agua a 10 y 20°C el mejor ajuste fue la función cuadrática (tablas XIII y XIV y fig. 12 y 13), en los coleóptilos (fig. 12) la diferencia inducida por la temperatura se ve clara a las concentraciones altas, lo cual no sucede en la mas baja concentración en la cual los valores son similares pero a partir de la concentración 0.2 estos se hacen diferentes (probadas por una t de student al α 0.01) y en cuanto se incrementan las concentraciones las diferencias son mas fuertes, un comportamiento similar se observa para las plántulas (tabla XX) pero en este caso las diferencias son mas dramáticas en las concentraciones altas (fig. 13) ya que hay un fuerte incremento del daño en estas concentraciones con tratamientos a 20°C (concentraciones 0.4 y 0.5% p/vol/hora). Rahman y Soriano (1972) informaron de un comportamiento cuadrático para germinación, supervivencia y longitud de las plántulas de semillas de arroz tratadas con MMS y otros AA, estos antecedentes coinciden con nuestros datos, en los cuales se nota que este ajuste a la función parabólica implica relativamente poco daño a las concentraciones bajas (fig. 12 y 13) pero un incremento sumamente fuerte en el daño al elevarse las concentraciones (fig. 12 y 13) este hecho también había sido señalado por Arnason y Minocha (1965).

Aun cuando el comportamiento que siguen los porcentajes de daño para semillas pretratadas (fig. 12 y 13, tablas XIII y XIV) es similar a aquél que siguen semillas sin pretratamiento

(fig. 8 y 9 y tablas XIII y XIV) las diferencias son muy fuertes, pues en semillas pretratadas a bajas concentraciones, no hay diferencia significativa con respecto a la temperatura, obteniéndose después una fuerte diferencia en el daño con respecto a la temperatura conforme se incrementa la concentración, estos hechos pueden ser explicados considerando que la semilla en estado de S (15 horas después de pretratarla) ha sintetizado ya una gran cantidad de moléculas importantes, las cuales serían a tacadas directamente por las bajas concentraciones y en forma independiente de la cinética molecular dada por la temperatura, en tanto que al incrementarse la concentración los efectos tóxi cos se hacen mas dramáticos debido a la mayor disponibilidad de moléculas alquilantes, en otras palabras, a bajas concentraciones a pesar de que los blancos son iguales en cantidad que en las altas, se ocasiona el máximo daño, en función de las moléculas de alquilante disponibles, independientemente de la temperatura de tratamiento, pero a concentraciones altas, esta independencia se pierde y el daño es mayor de acuerdo a la cinética de las moléculas.

Otra observación interesante resulta de comparar las longitudes medias de las plántulas sin tratamiento mutagénico (tes tigo) pero que fueron sometidas o no a un pretratamiento de 15 horas con agua (tablas VIII y XX); los resultados muestran un e fecto reductor del crecimiento inducido solo por el pretratamiento, estos resultados coinciden con los reportados por Padova y Ashri (1977) en semillas de cacahuete pretratadas, pe

ro el fenómeno sin explicación.

- 4) Efectos del MMS disuelto en Amortiguadores de Fosfatos a diferentes pH y temperaturas sobre los coleóptilos y plántulas de cebada.

La caída del pH en las soluciones mutagénicas es una de las vías de toxicidad para el MMS. En la tabla XXV se dan los valores de pH para soluciones de MMS a distinta concentración, temperatura y tiempos, en ella se ve que hay un abatimiento del pH con el incremento en la concentración, temperatura y tiempo (tabla XXV y fig. 14) estos resultados coinciden con los reportados por Arnason y col. (1966) para EMS y MMS. Cuando las soluciones del mutágeno fueron hechas en amortiguadores de fosfatos 0.05 M a pH 3.0; 7.0 y 11.5 no se detectó ningún cambio del pH, al incrementarse la concentración del ácido metil sulfónico durante el proceso de hidrólisis (Wickham y col., 1969).

La tabla XXVI muestra las medias para los coleóptilos tratados con MMS disuelto en los amortiguadores a los distintos pH y de los cuales se generó el análisis de varianza que se muestra en la tabla XXVII para coleóptilos de cebada Himalaya tratada a 10°C con diferentes concentraciones de MMS, en tanto que en la tabla XXVIII y la tabla XXIX se muestran los valores y el análisis de varianza para los coleóptilos a 20°C, en ambos casos se ve (tablas XXVII y XXIX) que se presenta un efecto debido a la concentración del mutágeno usado, pero no hubo efecto

por acción de los diferentes valores de pH utilizados. Los datos obtenidos y su análisis para plántulas se muestran en las tablas XXX y XXXI para tratamientos a 10°C y en las tablas XXXII y XXXIII para 20°C, los resultados fueron iguales a los de coleóptilos, una significatividad para las concentraciones del mutágeno y no efecto significativo para los diferentes pH analizados.

Debido a que en este experimento se estudió la temperatura, la concentración de MMS y el efecto de los pH de los amortiguadores en los que se hicieron las soluciones del mutágeno, para detectar las posibles interacciones entre estos tres factores, los datos se analizaron por un análisis de varianza factorial 2x3x4 con 3 repeticiones. Los resultados para coleóptilo se muestran en las tablas XXXIV y XXXV y para plántulas en las tablas XXXVI y XXXVII, en ambos casos los resultados son prácticamente iguales (tablas XXXV y XXXVII) demostrándose una diferencia significativa debida a la temperatura, las concentraciones de MMS y la interacción de primer orden temperatura por concentración; el pH no tuvo ningún efecto al igual que tampoco hubo interacción significativa entre la temperatura y el pH de la solución, de la misma manera la interacción de primer orden pH por concentración tampoco fue significativa en coleóptilos y plántulas. La interacción de segundo orden, temperatura x pH x concentración no fue significativa para los coleóptilos y ligeramente significativa para las plántulas aun cuando a una α de 0.01 no fue significativa (tabla XXXVII).

Ross (1962) había mostrado una reactividad diferencial del EMS en función del pH de la solución amortiguadora en que se daba el tratamiento mutagénico, encontrando que a pH 7.0 se localizaba la máxima probabilidad de alquilación de las bases nucleotídicas, en tanto que a pH ácidos la reactividad bajaba. Por otro lado Blixt (1967) encontró que en soluciones sin amortiguador los daños fisiológicos se incrementaban, básicamente por la concentración de productos de hidrólisis, sin embargo, cuando utilizó soluciones amortiguadoras para disolver los mutágenos no encontró diferencias en el daño expresado por la germinación y la longitud de las plántulas (Blixt, 1972) estos resultados coinciden con las observaciones en nuestros experimentos (tablas XXVII, XXIX, XXXI y XXXIII).

Los datos obtenidos sugieren una vez mas que la causa principal del daño fisiológico inducido por el MMS es la alquilación de las proteínas (Wheeler, 1967; Osterman-Golkar y col., 1970; Veleminsky y col., 1973) ya que por el solo control de la caída del pH no hubo ningún efecto protector observable en coleóptilos y plántulas, la interacción de las temperaturas con las concentraciones demuestra de nuevo el efecto que la temperatura ejerce sobre los parámetros evaluados (ver sección 2 y 3) pero esta interacción no fue suficientemente fuerte para manifestarse cuando se analizó la interacción temperatura x pH x concentración (tablas XXXV y XXXVII) implicando otra vez, el nulo efecto de los amortiguadores sobre coleóptilos y plántulas de semillas tratadas con el MMS, estos resultados coinciden con los reporta

dos por Blixt (1972) en los que no encuentra efecto alguno de los amortiguadores sobre el EMS en parámetros fisiológicos.

El incremento de la frecuencia de mutaciones utilizando soluciones amortiguadoras como solventes de AA, ha sido demostrado (Nilan, 1973), este efecto se presenta en los agentes EI, azida de sodio y NMU, sin embargo para nuestro caso (MMS) no se detectó ningún efecto (tablas XXVII, XXIX, XXXI y XXXIII) aun cuando este análisis solo se refiere a daño fisiológico, estos hechos pueden ser explicados por los diferentes mecanismos de reacción para el MMS y los mutágenos mencionados. Así, en el EI a pH 7.0, un 89% está en forma del catión etileiminamonio y solo el 11% en la forma inmina, la cual es la forma activa del mutágeno, al variar el pH un poco arriba de 7.0 la forma inmina se incrementa y en consecuencia actúa como un poderoso mutágeno (Wagner y col., 1968); el azida de sodio ha demostrado una mejor actividad a pH 3.0 (Konzak y col., 1972; Sarma y col., 1979), la misma situación se presenta para el NMU (Konzak y col., 1972).

El efecto de soluciones mutagénicas con rangos amplios de pH sobre semillas evaluando la longitud de las plántulas ha sido demostrado también con azida de sodio (Kleinhofs y col., 1974) encontrando una correlación entre efecto de reducción de la longitud de las plántulas y proporción de mutantes clorofílicos, sin embargo, los mecanismos de acción química de azida de sodio y el MMS al ser diferentes hacen difícil pensar en un posible incremento de mutaciones a los diferentes valores de pH de las soluciones.

- 5) Efecto de la L-Cisteína administrada como postratamiento sobre semillas de cebada pretratadas en agua y tratadas con MMS.

El propósito de este experimento fue el establecer la acción de la L-cisteína en una etapa crítica de la semilla de cebada (finales de G_1 y comienzo de S) intentando controlar la toxicidad del MMS contra alquilación de proteínas después del tratamiento mutagénico, es decir controlar los efectos negativos del mutágeno remanente.

Los análisis de varianza para coleóptilo (tabla XXXVIII) y para plántula (tabla XXXIX) mostraron que hubo un efecto de la concentración del MMS, pero no lo hubo para los postratamientos con cisteína.

La cisteína por si misma no expresó toxicidad en los parámetros evaluados, la tabla XL, muestra que este aminoácido no ejerció efecto protector sobre el daño ocasionado por el MMS sobre coleóptilo y plántula excepto una ligera protección en 0.5% para plántula y 0.7% para coleóptilo y plántula, es decir a las dosis altas del MMS, estos resultados coinciden con los obtenidos por Bhojwani y Kaul (1976) quienes encontraron la mas fuerte protección a las dosis mas elevadas en semillas de chícharo tratadas con EI. Narayanan y Konzak (1969) reportaron protección contra el EMS por postratamiento con L-cisteína, pero al comparar con otros tiosulfatos, la protección dada por la L-cisteína resulta pobre, lo cual concuerda en cierta forma con

nuestros datos (tabla XL), las diferencias son debidas probablemente a los mecanismos de reacci3n para EMS y MMS, pues mientras el primero muestra una mezcla S_N1/S_N2 , el segundo es exclusivamente S_N2 , adem1s el MMS es una mol3cula mas sencilla y presenta un valor de s (constante de sustrato) mas elevado que el EMS (tabla I) esto permite al EMS reaccionar menos r1pidamente que el MMS con las prote1nas o enzimas importantes y el remanente del mut1geno ser1a capturado por la L-ciste1na, en tanto que el MMS al actuar con mayor velocidad sobre las proe1nas no dar1a oportunidad a la L-ciste1na de proteger, al incrementarse las dosis de MMS 3ste tiene mayor oportunidad de permanecer disponible en las c3lulas cuando penetra la L-ciste1na y 3sta puede actuar mostrando asi cierta protecci3n (tabla XL).

La mayor1a de nuestros resultados est1n en desacuerdo con los reportados por Kaul (1969b) y Kaul y Chaudhary (1972) sin embargo el uso de diferentes AA puede explicar estas diferencias, adem1s algunos investigadores observaron la protecci3n preferentemente en tratamientos dados en mezcla entre protector y mut1geno (Kaul, 1969b; Kaul y Chaudhary, 1972), asi la L-ciste1na pudo reaccionar con el mut1geno antes de entrar a la c3lula neutral1ndolo, de esta forma ciertamente se presenta una protecci3n contra el da1o fisiol3gico pero tambi3n parcialmente se nulifica la funci3n del mut1geno.

La protecci3n de L-ciste1na en los tratamientos contra la acci3n de EI obtenido por Kaul y Chaudhary (1972), y Bhojwani y Kaul (1976) es mas dif1cil de conciliar con nuestros resultados,

ya que el EI y el MMS presentan semejanzas; ambos reaccionan vía S_N2 (Early y col., 1958; Lawley, 1974) presentan un valor de s similar (tabla I) y ambos son moléculas sencillas, sin embargo, la EI requiere un paso previo de apertura del anillo para la alquilación (Early y col., 1958), por lo que es mas lento en su reacción que el MMS, el cual puede atacar mas rápidamente proteínas importantes y causar la toxicidad observada, estas consideraciones explican el hecho mostrado en las tablas XXXVIII y XXXIX de no protección de la L-cisteína contra la toxicidad inducida por el MMS en la longitud de los coleóptilos y plántulas de cebada.

6) El efecto del MMS sobre semillas de Triticale hexaploide
Lart. var. Bacum.

Los métodos en fitomejoramiento utilizando mutaciones en plantas superiores tienen cada vez mayor importancia, particularmente cuando se trata de resolver problemas concretos aun en especies con una gran variabilidad natural (Shrvarnikov y Morgun, 1975).

Se han efectuado pocos trabajos en triticale utilizando agentes mutagénicos (Kaul, 1969a; Sapro y Constantin, 1978; Nadden y col., 1979) sin embargo, el uso de esta metodología para su mejoramiento ha sido recomendada (Muntzing, 1972). En un primer experimento en laboratorio se determinó la DL50 del Triticale

hexaploide Lart var. Bacum para diferentes concentraciones de MMS. La fig. 15 muestra la línea de regresión probit para estimar la mortalidad y calcular la DL50 la cual fue de 0.391% p/vol/hora \pm 0.042 para nuestras condiciones experimentales (20°C). Debido a que se ha propuesto (Konzak y Mikaelson, 1977) utilizar en estudios de mutagénesis con fines de fitomejoramiento dosis del 20% arriba y abajo de la DL calculada, y estos valores para nuestro caso son de 0.468 y 0.312% p/vol/hora, se decidió explorar el comportamiento del triticale en concentraciones de MMS de 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5% p/vol/1 hora.

La tabla XLI muestra la transformación arco cuyo seno es la raíz cuadrada de la proporción de los valores de germinación, con estos datos transformados se generó un análisis de varianza (tabla XLII) el cual dio una diferencia significativa para las repeticiones y la germinación, el contraste de las medias por la prueba de Duncan mostró (tabla XLIII) que la concentración de 0.5 de MMS fue diferente a todas las demás pero que entre testigo 0.1, 0.4 y 0.2 no hubo diferencias, en tanto que la concentración 0.3 fue diferente del testigo y de 0.5 pero no lo fue de los demás (0.1, 0.4 y 0.2% p/vol/hora).

Las tablas XLIV a XLIX muestran los resultados para las variables agronómicas evaluadas en M₁ después de exponer las semillas de Triticale hexaploide Lart al mutágeno, para todos los casos se demostró un efecto no significativo de las concentraciones de MMS sobre las variables consideradas, longitud de planta (tabla XLIV y XLV) peso del grano (tablas XLVI y XLVII)

asi como para el número de hijuelos (tablas XLVIII y XLIX). Estos resultados tienen un especial significado, ya que se demostró que de hecho las dosis probadas de MMS no fueron tóxicas para los parámetros evaluados (tablas XLIV a XLIX) debido probablemente a la naturaleza poliploide del triticale, ya que se sabe que las plantas presentan mayor resistencia al efecto tóxico de los mutágenos en función de sus niveles de ploidía (Prasad y Godward, 1975; Djelepov, 1976), estos hechos permitieron la obtención de semillas M_1 que pasaron a la generación M_2 en número suficiente para detectar probables mutantes.

Debido a que en este experimento se intentaba el aislamiento de mutantes enanos, se efectuó una selección visual para localizarlos en la población M_2 , el criterio que se adoptó fue el de seleccionar plantas al menos 20% mas pequeñas que la mas pequeña de los testigos, el rango del testigo estuvo entre 95-120 cm: por lo que se localizaron las plantas de 75 cm. o menos de altura y se hizo el registro individual de sus características para su posterior identificación. Se seleccionaron 21 plantas probables mutantes cuyo rango de altura fue de 55-75 cm. (tabla L), Nadeem y col. (1979) reportaron resultados similares pero no dan detalles metodológicos ni datos cuantitativos en su trabajo.

En la tabla L, se muestran los datos de algunas plantas enanas que presentan buenas características agronómicas (número de hijuelos y peso del grano) e incluso son precoces en su desarrollo (plantas 5, 6 y 7 de la tabla L) todas las dosis de

MMS probadas dieron mutantes, pero la máxima frecuencia correspondió a las dosis altas (0.4 y 0.5 tabla L y fig. 16).

Los probables mutantes seleccionados presentaron semillas suficientes para pasar a la generación M_3 donde se analizará la segregación y confirmación de estos resultados, aunque se ha establecido (Konzak y Mikaelson, 1977) que los mutantes seleccionados en la generación M_2 son homocigos, aun cuando no se puede descartar la posibilidad de interacciones epistáticas que puedan aparecer en la generación M_3 .

Aun cuando no se han efectuado trabajos de mutagénesis con MMS en triticale, este agente alquilante ha mostrado en otras plantas gran efectividad, así Vig y col. (1976) trabajaron comparativamente a diferentes dosis con varios AA en soya, encontrando una mayor efectividad del MMS para este sistema, siendo el orden decreciente en eficiencia $MMS > MES > MBS > EMS$. Otros autores (Kiang y Hallaran, 1977) trabajando con EMS lograron aislar también en soya mutantes enanos, estos autores sugieren además una probable correlación entre enanismo y maduración temprana, implicando la presencia de un fenómeno de pleiotropía lo cual puede ser el mismo caso para nuestros resultados (tabla L plantas 5, 6, 7, 9, 10 y particularmente la 1 y la 13). Franzone (1976) informa también de la inducción de mutantes para enanismo en trigo, aunque utilizando en este caso radiaciones gamma. Estos hechos sugieren que el carácter enanismo está controlado por un gene factible de aparecer en tratamientos mutagénicos con cierta frecuencia, además Konzak y Mikaelson (1977) hacen

notar que ciertos tipos de mutaciones aparecen con mayor frecuencia que otros, y dentro de este grupo sitúan la longitud de la planta.

RESUMEN

La inducción artificial de mutaciones ha sido propuesta como un útil método para incrementar la variabilidad genética de las plantas superiores. Sin embargo, se ha recomendado que se use solo en aquéllas plantas que no poseen una variabilidad natural muy amplia, o en la solución de problemas específicos.

Por otro lado, el uso de modelos adecuados para evaluación de sistema mutagénicos son monitores necesarios antes de abordar programas de mutagénesis con objetivos concretos.

La cebada, particularmente de variedad Himalaya ha sido probablemente el vegetal superior mas utilizado en el estudio de la inducción de mutaciones y así, se ha considerado como un modelo biológico para el estudio de los efectos tóxicos, citogénéticos y mas específicamente para el estudio del control experimental del proceso de inducción de mutaciones y de los mecanismos de acción de los agentes que las ocasionan.

El triticale es un nuevo género vegetal producido por el hombre, por lo cual posee un corto historial evolutivo pero con grandes potencialidades agronómicas, de modo que es recomendable la inducción artificial de mutaciones para superar dificultades en el mejoramiento de esta planta.

La potencialidad de los agentes alquilantes en la inducción de mutaciones no ha sido totalmente explorada, debido a la gran cantidad de factores físicos químicos y biológicos que modifican su acción siendo por lo tanto un sistema susceptible de me-

jora para incrementar la obtención de mutantes.

El Metil Metanosulfonato (MMS) es un agente alquilante monofuncional que ha sido relativamente poco utilizado en la inducción de mutaciones en plantas superiores, esto es debido básicamente a su elevada toxicidad, la cual se refleja en la fuerte mortalidad de las semillas tratadas y de esta manera, se evita la expresión de los cambios genotípicos inducidos por el mutágeno.

Sin embargo, este agente alquilante presenta características tales como la estereoquímica de su molécula, la sencillez de su estructura y su mecanismo de reacción S_N2 , que le hacen ser una sustancia con posibilidades de modificar su acción en base a manipulaciones adecuadas de los tratamientos mutagénicos.

En el presente trabajo se investigaron los efectos que el MMS tiene sobre algunas gramíneas bajo diferentes condiciones experimentales buscando establecer la respuesta fisiológica y genética sobre un organismo modelo (Cebada de la var. Himalaya) así como la inducción y selección de mutantes con fines antropocéntricos en organismos de interés económico (Triticale hexaploide L. var. Bacum).

Se establecieron las DL50 para el MMS en cebada var. Himalaya bajo diferentes condiciones de tratamiento, las DL50 fueron: 1.60% p/vol/hora a 10°C y 0.647% p/vol/hora para 20°C. Cuando las semillas fueron sujetas a la acción del mutágeno en la etapa de S, las DL50 fueron de 0.268% p/vol/hora a 10°C y 0.173 a 20°C.

Se demostró que la acción tóxica del MMS expresada en parámetros fisiológicos (reducción en la longitud de coleóptilos y plántulas) está en función de la dosis, pero que sufre alteraciones relacionadas con la temperatura del tratamiento y el estado fisiológico de las semillas en el momento de administrar el mutágeno. Se encontró una interacción temperatura x concentración cuando los tratamientos se dieron en semillas sin y con pretratamientos, pero en este último caso, la interacción fue menor, resultando incluso enmascarada para el caso de las plántulas.

Cuando se analizó el porcentaje de daño con respecto al testigo, se demostró un comportamiento cuadrático para todos los casos estudiados.

Al efectuar la solución del alquilante en amortiguadores de fosfatos a diferentes valores de pH, no se detectó ningún efecto sobre los parámetros evaluados, al igual que al dar posttratamientos con cisteína, en cuyo caso solo se observó cierta disminución en la toxicidad del mutágeno cuando las semillas fueron expuestas a las dosis altas.

Se estableció la DL50 para Triticale hexaploide Lart var. Bacum la cual fue de 0.39% p/vol/hora a 20°C. Se encontró que el MMS no fue tóxico a las dosis usadas para el triticale y se obtuvo un notable rendimiento de mutantes para el carácter enanismo y precocidad en la Generación M₂. La frecuencia de mutantes estuvo en función de la dosis.

LITERATURA

- ARNASON, T.J. y Minocha, J.L. (1965) *Can. J. Genet. Cytol.* 7: 262-267.
- ARNASON, T.J., El-Sadek, L.M. y Michocho, J.L. (1966) *Can. J. Genet. Cytol.* 8: 746-755.
- ASHRI, A. y Levy, A. (1974) *Radiat. Bot.* 14: 223-228.
- AUERBACH, C. (1976) *Mutation research. Problems, results and perspectives.* Chapman and Hall., New York. 504pp.
- BANNON, P. y Verly, W. (1972) *Eur. J. Biochem.* 31: 103-111.
- BENNETT, M.D. y Smith, J.B. (1971). *Can. J. Genet. Cytol.* 13: 607-611.
- BHOJWANY, K. y Kaul, B.K. (1976) *Indian J. Agric. Sci.* 46 (11): 524-527.
- BILAN, M.V. y Foster, C.D. (1970) *Tree Plrs. Notes* 21 (2): 10-11.
- BLIXT, S. (1967) *Agri. Hort. Genética* 25: 112-120.
- BLIXT, S. (1972) *Agri. Hort. Genética* 30: 1-293.
- CARLSON, P.S. y Smith, H.H. (1977) *En Manual on Mutation Breeding* 2ª ed. I.A.E.A. Tech. Rep. Ser. 119, Vienna. 205-212.
- CASARETT, A.P. (1968) *Radiation Biology.* Prentice-Hall, Inc. New Jersey. 368pp.
- CERVANTES, S.T. (1978) *Recursos Genéticos disponibles a México.* SOCIEDAD MEXICANA DE FITOGENÉTICA, A.C. Chapingo, México.
- CIMMYT. (1977) *Results of the eighth International Triticale Yield Nursery.* Information Bulletin No. 41. México.
- CLARK, G.M., Sweaney, W.P., Bunting, N.R. y Baker, D.G. (1968) *Radiat. Bot.* 8: 59-66.
- CONGER, B.V., Nilan, R.A., y Konzak, C.F. (1968) *Radiat. Bot.* 8: 31-35.

- CRAFTS, F.C., Jackson, D.L., Martin, P.M. y Patrick, J.W. (1971) Los vegetales y sus cosechas. Ed. Aedos, Barcelona, 145pp.
- CUMMING, R.B. y Walton, M.F. (1970) Mutation Res. 10: 365-377.
- DJELEPOV, K. (1976) Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences. Tome 29, No. 6: 895-897.
- DRAKE, J.W. y Baltz, R.H. (1976) Ann. Review of Biochemistry, 45: 11-37.
- EARLEY, J.E., O'Hourke, Ch.E., Clapp, L.B., Edwards, J.O. y Lawes, B.C. (1958) J. Am. Chem. Soc. 80: 3458-3462.
- EHRENBERG, L. (1971) Higher plants. En: Chemical mutagens. Principles and methods for their detection. vol. 2 Ed. A. Hollaender. Plenum Press, N.Y.: 365-386.
- FAHMY, O.G. y Fahmy, M.J. (1961) Nature (London) 191: 776-779.
- FOUSOVA, S., Veleminsky, J., Gichner, T. y Pokorny, V. (1974) Biol. Plant. 16: 168-173.
- FRANZONE, P.M. (1976) Mendeliana 1 (2): 75-80.
- FRESE, E. (1971) Molecular Mechanisms of Mutations. En: Chemical Mutagens. Principles and methods for their detection. vol. 1 Ed. A. Hollaender. Plenum Press. N.Y.: 1-56.
- FUJI, T. y Matsumura, S. (1958) Japan. J. of Genetics. 33 (12): 389-397.
- GAUL, H. (1977). En: Manual in mutation Breeding, 2^a ed. I.A.E.A. Tech. Rep. Ser. 119, Viena. 87-105.
- GELIN, O. (1968) Hereditas 59: 263-279.
- GICHNER, T. y Gaul, H. (1971) Radiat. Bot. 11: 53-58.
- GICHNER, T. y Veleminsky, J., Pokorny, V. y Suachulova, J. (1972) Radiat. Bot. 12: 221-227.
- GUSTAFSSON, A. (1975) En: Biomedical, Chemical and Physical Perspectives. (Nygaard, O.F., Adler, H.I., y Sinclair, W. K. Eds.) Academic Press, New York. 81-95.
- HESLOT, H. (1977) En: Manual on Mutation Breeding, 2^a ed. I.A.E.A. Tech. Rep. Ser. 119, Vienna. 51-58.
- KAMRA, O.P. y Brunner, H. (1977) En: Manual on Mutation Breeding 2^a ed. I.A.E.A. Tech. Rep. Ser. 119, Vienna, 59-70.

- KAUL, B.L. (1969a) *Experientia* 25: 74-75.
- KAUL, B.L. (1969b) *Mutation Res.* 7: 43-49.
- KAUL, B.L. y Choudhary, D.K. (1972) *Radiat. Bot.* 12: 57-61.
- KIANG, L. Ch. y Halloran, G.M. (1977) *Radiat. Res.* 43: 223-230.
- KLEINHOF'S, A., Sander, C., Nilan, R.A. y Konzak, C.F. (1974) *Polyploidy and Induced Mutations in Plant Breeding. I.A.E.A. (Vienna) 195-199.*
- KONZAK, C.F., Nilan, R.A., Wagner, J. y Foster, R.J. (1965) En: *The use of Induced Mutations in Plant Breeding (Rome, Italy) Pergamon Press: 49-70.*
- KONZAK, C.F. y Favret, A. (1972) En: Morton W. Miller (Ed) *The Dynamics of Meristem Cell Populations. Plenum Publishing Corporation. N.Y., 227-249.*
- KONZAK, C.F., Wickham, I.M. y Dekoek, M.J. (1972) En: *Induced Mutations and Plan Improvement. I.A.E.A., Vienna, 95-119.*
- KONZAK, C.F., Niknejad, M., Wickham, I. y Donaldson, E. (1975) *Mutation Res.* 30: 55-62.
- KONZAK, C.F. y Mikaelson, K. (1977) En: *Manual on Mutation Breeding 2^a ed. Ed. I.A.E.A. Tech. Rep. Ser. 119, Vienna, 125-137.*
- KONZAK, C.F., Nilan, R.A. y Kleinhofs, A. (1977) En: Amir Muhamed, Rusten Askel y R.C. Von Borstel (Eds) *Genetic Diversity in Plants. Plenum Press., New York, 163-177.*
- LAWLEY, P.D. y Shah, S.A. (1972) *Chem. Biol. Interactions*, 5: 286-288.
- LAWLEY, P.D. (1974) *Mutation Res.* 23: 283-295.
- LETT, J.T., Parkins, G.M. y Alexander, P. (1962) *Arch. Biochem. Biophys.* 97: 80-83.
- LEVY, A., Ashri, A. y Rubin, B. (1979) *Env. Exp. Bot.* 19: 49-57.
- LINDGREN, K., Ehrenberg, L. y Natarajan, A.T. (1976) *Env. Exp. Bot.* 16: 155-164.
- LIPTAY, A. y Davidson, D. (1972) *Am.J. Bot.* 59: 266-269.
- LOVELESS, A. y Howarth, S. (1959) *Nature (London)* 184: 1780-1782.

- MALIGA, P. (1978) En: *Frontiers of Plant Tissue Culture*. T.A. Thorpe (Ed.): 381-392.
- MALLING, H.V. y De Serres, F.J. (1969) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 163: 788-800.
- MALLING, H.V. y De Serres, F.J. (1973) *Mutation Res.* 18: 1-14.
- MENESES, P. M.A. y Rubluo, I.A. (1978) En: *Ciencia Forestal* 3 (16): 52-56.
- MIKAEISEN, K., Ahmstrom, G. y Li. W.C. (1968) *Hereditas*, 59: 353-374.
- MIKAEISEN, K. y Pedersen, K. (1968) *Hereditas* 60: 400-403.
- MIKAEISEN, K. (1969) En: *Induced Mutations in Plants*. Proc. Symp. Pullman, I.A.E.A. Viena: 245-249.
- MINOCHA, J.L. y Arnason, T.J. (1962) *Nature (London)*, 196: 499.
- MUNTZING, A. (1972) *Biol. Zentr.* 91: 69-80.
- NADEEM, M.T., Shakoor, A., Sadiq, M.S. y Ali, S. (1979) En: *Seed Proteins Improvement in Cereals and Grain Legumes*. vol. II I.A.E.A. Vienna. 444.
- NAGARAJA, R.R. y Natarajan, A.T. (1965) *Mutation Res.* 2: 132-148.
- NARAYANAN, K.R., Konzak, C.F. (1969) En: *Induced Mutations in Plants*, I.A.E.A., Vienna, 281-304.
- NILAN, R.A. (1973) En: *Srb, A.M. (Ed.) Genes, Enzymes and Populations*. Plenum Publishing Corporation, N.Y., 205-222.
- NILAN, R.A. y Vig, B.K. (1976) En: *A. Hollaender (Ed.) Chemical Mutagens. Principles and methods for their detection*. vol. 4. 143-169.
- OSTERMAN-GOLKAR, S., Ehrenberg, L. y Wachtmeister, C.A. (1970) *Radiat. Bot.* 10: 303-327.
- PADOVA, R. y Ashri, A. (1977) *Env. Exp. Bot.* 17: 167-171.
- PRASAD, A.B. y Godward, M.B.E. (1975) *Cytologia* 40: 535-542.
- PRICE, Ch. C., Gaucher, G.M., Komeru, P., Shibakawa, R., Sowa, J.R. y Yamaguchi, M. (1969) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 163: 593-600.

- QUIÑONES, M.A. (1973) En: *Triticale Breeding and Research at CIMMYT: A Progress Report*: 3-11.
- RAHMAN, M.M. y Soriano, J.D. (1972) *Radiat. Bot.* 12: 291-295.
- RAMANNA, M.S. y Natarajan, A.T. (1966) *Chromosoma* 18: 44-59.
- RAO, R.N. y Natarajan, A.T. (1967) *Mutation Res.* 2: 132-148.
- RHAESE, H. y Freese, E. (1969) *Biochim. Biophys. Acta.* 190: 418-423.
- RHAESE, H.J. y Boether, N.K. (1973) *Eur. J. Biochem.* 32: 166-172.
- RIOJAS, G.E. (1976) *Variedades Mexicanas de Cebada. I.N.I.A., S.A.G., México. Folleto No. 60*: 1-30.
- ROBERTS, E.H. (1972) *Viability of Seeds. Chapman and Hall LTD, London.* 488pp.
- ROMANTSEV, E.F. (1968) *Radiación y protección química (en ruso) Atomizdat. Moscú*: 161-167.
- ROSENKRANZ, H.S., Carr, H.S. y Zyroff, J. (1970) *J. of Bact.* 102: 672-676.
- ROSS, W.C.J. (1962) *Biological Alkylating Agents, Butterworths, London,* 232pp.
- RUBLUO, I.A., Gómez, A.S., Silva, F.E. y Villalobos-Pietrini, R. (1980) *Ann. Inst. Biol. U.N.A.M. Serie Biol. Exp. (en prensa).*
- SAPRA, V.T. y Constantin, M.J. (1978) *Env. Exp. Bot.* 18: 77-79.
- SARMA, N.P., Patnaik, A. y Jacnuck, P.J. (1979) *Env. Exp. Bot.* 19: 117-121.
- SAVIN, V.N., Swaminathan, M.S. y Sharma, B. (1968) *Mutation Res.* 6: 101-107.
- SHAPIRO, R. (1969) *Ann. N.Y. Acad. of Sci.* 163: 624-632.
- SHKVARNIKOV, P.K. y Kulik, M.I. (1975) *Proceedings of the Indian National Science Academy.* 41(B): 204-217.
- SHKVARNIKOV, P.K. y Morgun, V.V. (1975) *Proc. Ind. Natn. Sci. Acad.* 41(B): 177-187.
- SIGURBJORNSSON, B. (1971) *Sci. Ann.* 224: 86-95.

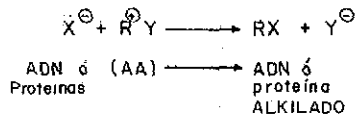
- SIGURBJORNSSON, B. y Micke, A. (1974) En: Poliploidy and Induced Mutations in Plant Breeding. I.A.E.A. (Vienna): 303-343.
- SINGER, B. (1975) Biochemistry 14(20): 4353-4357.
- SKULT, H. (1969) Acta Acad. Abo. B. 29: 1-15.
- SLATEN, L., Willard, M. y Green, A.A. (1956) J. Chem. Educat. 33(3): 140-143.
- STADLER, J.L. (1928) Science. 68: 186-187.
- STRAUSS, B., Scudiero, D. y Henderson, E. (1975) En: Molecular Mechanisms for Repair of DNA, Part A. P.C. Hanwalt y R.B. Seltow (Eds.) Plenum Publishing Corporation, New York: 13-24.
- TARASENKO, N.D. (1974) En: Polyploidy and Induced Mutations in Plant Breeding. I.A.E.A. Vienna. 367-375.
- TODD, P.A., Monti-Bragadin, C. y Glickman, B.W. (1979) Mutation Res. 62: 227-237.
- VAN'T HOFF, J. (1974) En: Handbook of Genetics vol. 2 Plants, Plant Viruses and Protists. R.C. King (Ed.) Plenum Press New York: 363-377.
- VELEMINSKY, J., Zadrazil, S., Pokorny, V., Gichner, T. y Srachulova, J. (1973) Mutation Res. 19: 73-81.
- VIG, B.K., Nilan, R.A. y Arenaz, P. (1976) Env. Exp. Bot. 16: 223-234.
- WAGNER, J.H., Maher, M.N., Konzak, C.F. y Nilan, R.A. (1968) Mutation Res. 5: 57-64.
- WALLES, S. y Ehrenberg, L. (1969) Acta Chem. Scand. 23(3): 1080-1082.
- WHEELER, G.P. (1967) Fedn. Proc. 26: 885-892.
- WICKHAM, M.I., Narayanan, K.R. y Konzak, C.F. (1969) En: Induced Mutations in Plants. Proc. Symp. Pullman. I.A.E.A. (Vienna) 153-167.
- YAMAGUCHI, H. y Matsubayashi, I. (1973) Mutation Res. 17: 191-197.
- YAMAGUCHI, H., Tano, S., Tatara, A., Hiari, S., Hasegawa, K. y Hiraki, M. (1974) En: Polyploidy and Induced Mutations in Plant Breeding, I.A.E.A. (Vienna): 393-399.

YAMAGUCHI, H. (1976) *Env. Exp. Bot.* 16: 145-149.

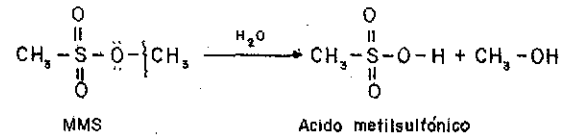
YIM, K.B. (1963) *Korean J. of Bot.* 6(3):6-14.

ZILLINSKY, F.J. y López, B.A. (1973) *En: Triticale Breeding and Research at CIMMYT: A Progress Report*: 12-32.

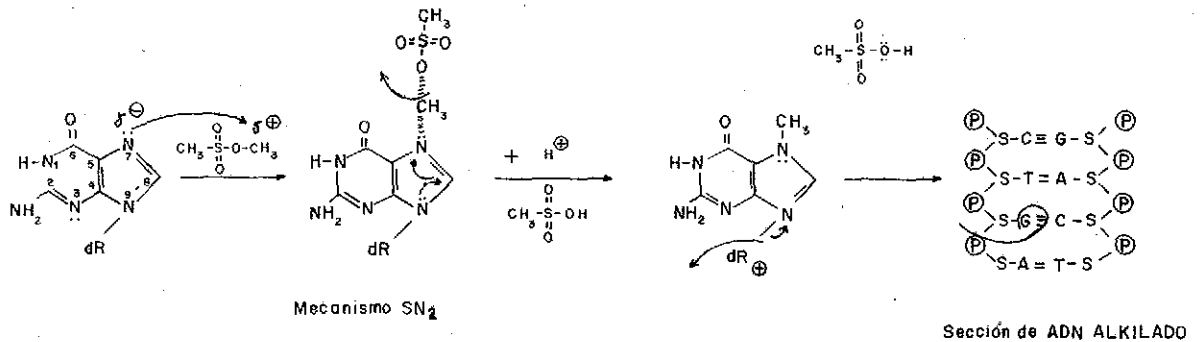
ZILLINSKY, F.J. (1974) *Adv. Agron.* 6: 315-348.



a) REACCIÓN GENERAL DE ALKILACION



b) REACCIÓN DE HIDROLISIS DEL MMS



c) REACCIÓN DE ALKILACION DEL MMS SOBRE N_7 DE LA GUANINA DEL ADN

P = Grupos fosfato A = Adenina
S = Desoxirribosa T = Timina
C = Citosina G = Guanina

Fig. 1 ALGUNOS ASPECTOS MOLECULARES DE LOS AGENTES ALKILANTES.

44

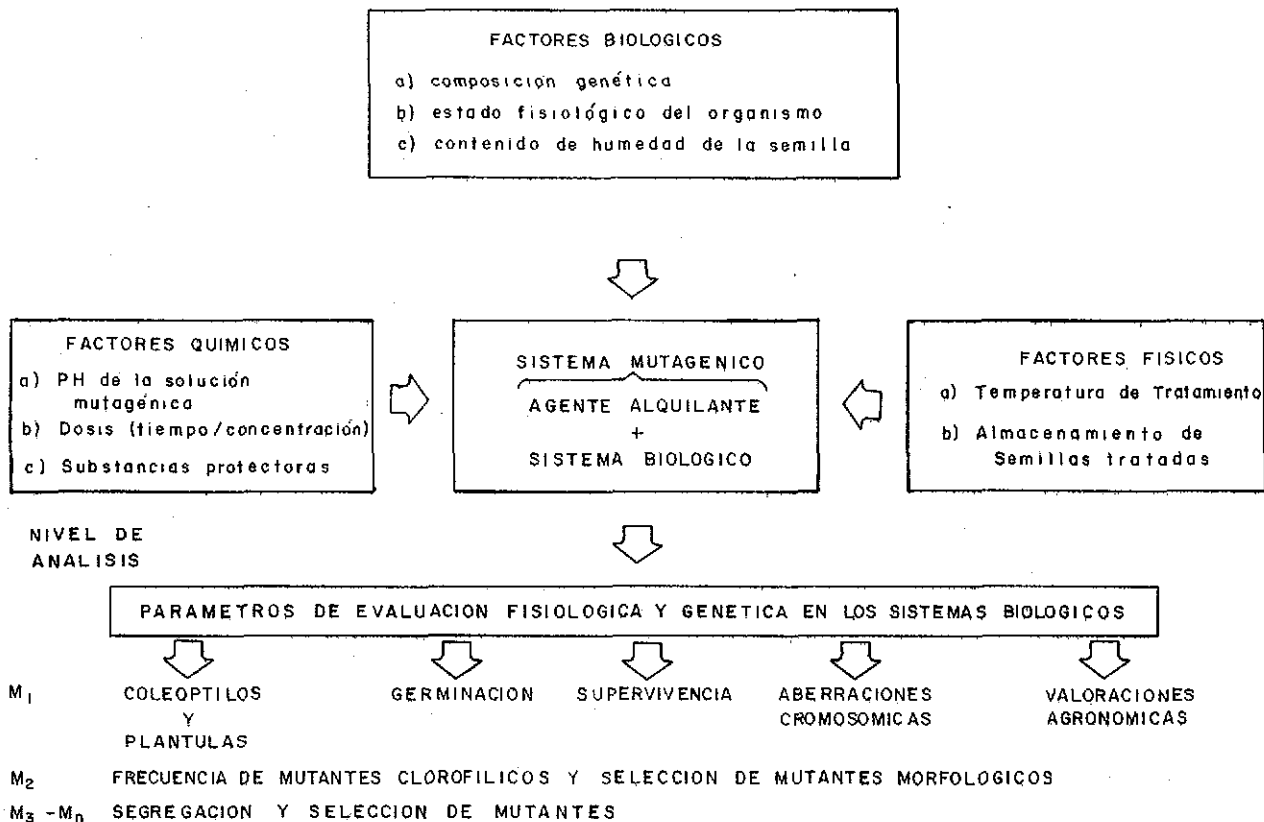
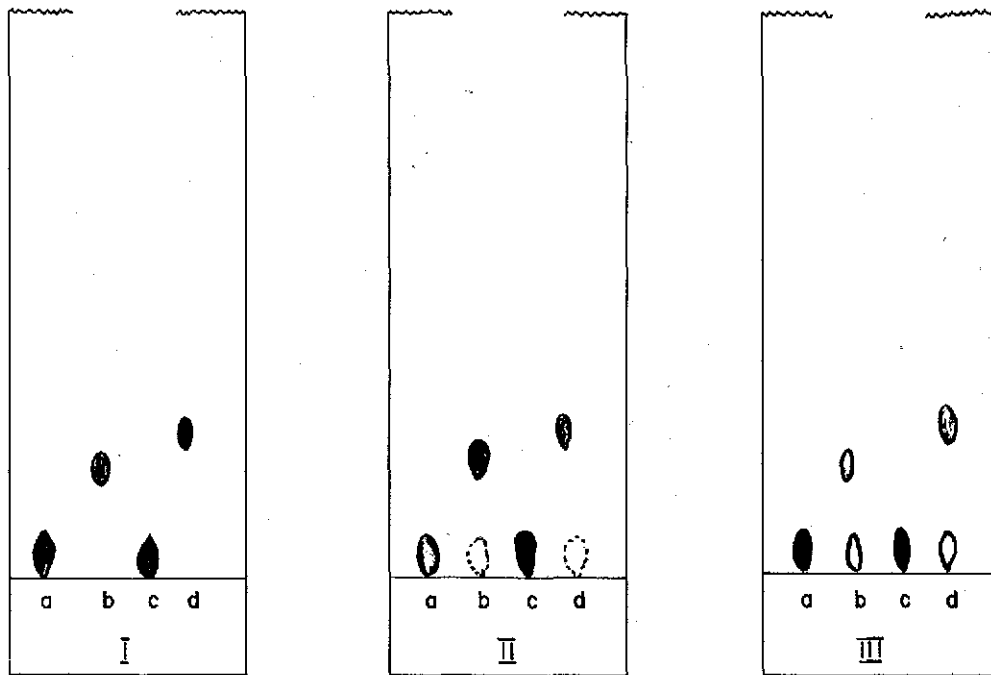


Fig. 2 ALGUNOS FACTORES QUE MODIFICAN LA ACCION DE LOS AGENTES ALQUILANTES EN PLANTAS SUPERIORES

Fig. 3 . Analisis cromatográfico a diferentes tiempos de
 cisteína y cistina disueltos en agua hervida.



a cistina 0.01 M
 b cisteína 0.01 M
 c cistina 0.05 M
 d cisteína 0.05 M

I tiempo cero y 2 hrs.
II tiempo 4 hrs.
III tiempo 18 hrs.

Rf cistina (en HCl 4%)=0.046
 Rf cisteína 0.01 M=0.23
 Rf cisteína 0.05 M=0.3

ML

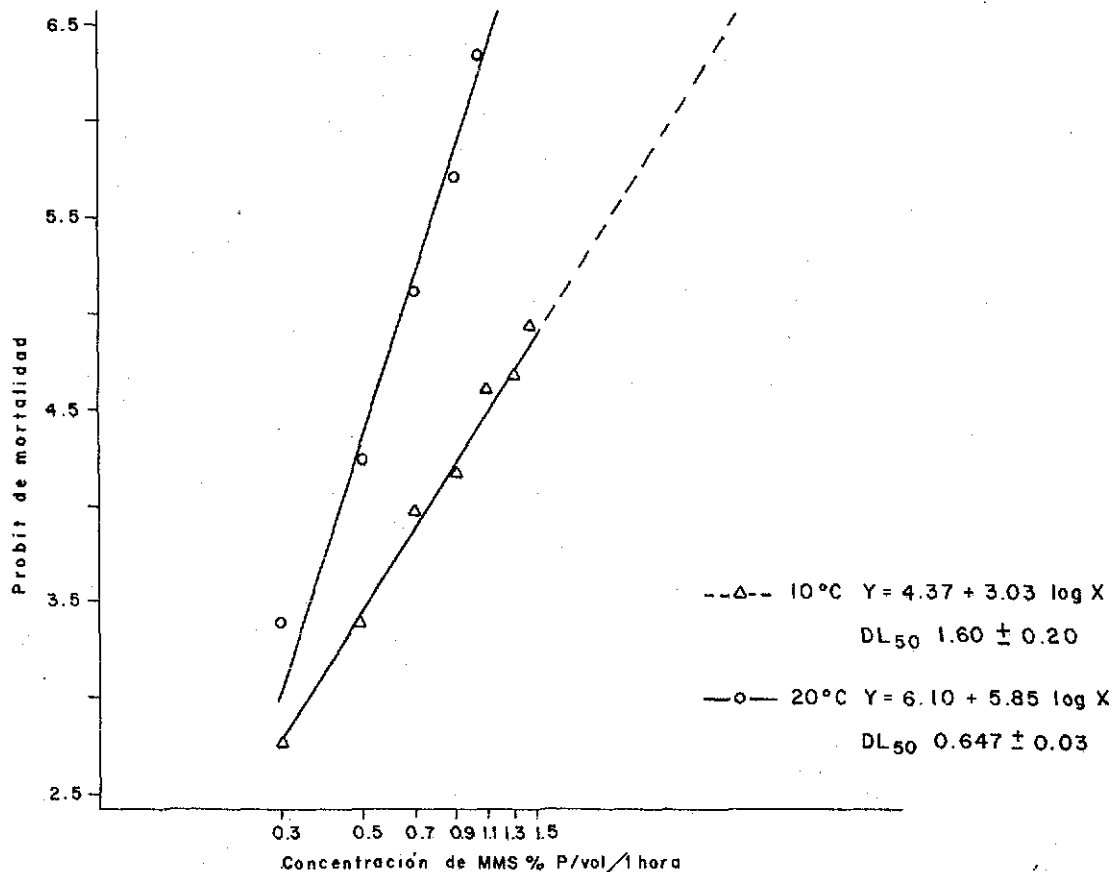


Fig. 4. LINEA DE REGRESION PROBIT PARA ESTIMAR LA MORTALIDAD INDUCIDA EN SEMILLAS DE CEBADA (HORDEUM VULGARE VAR. HIMALAYA) EXPUESTAS A DIFERENTES TEMPERATURAS Y CONCENTRACIONES DE MMS.

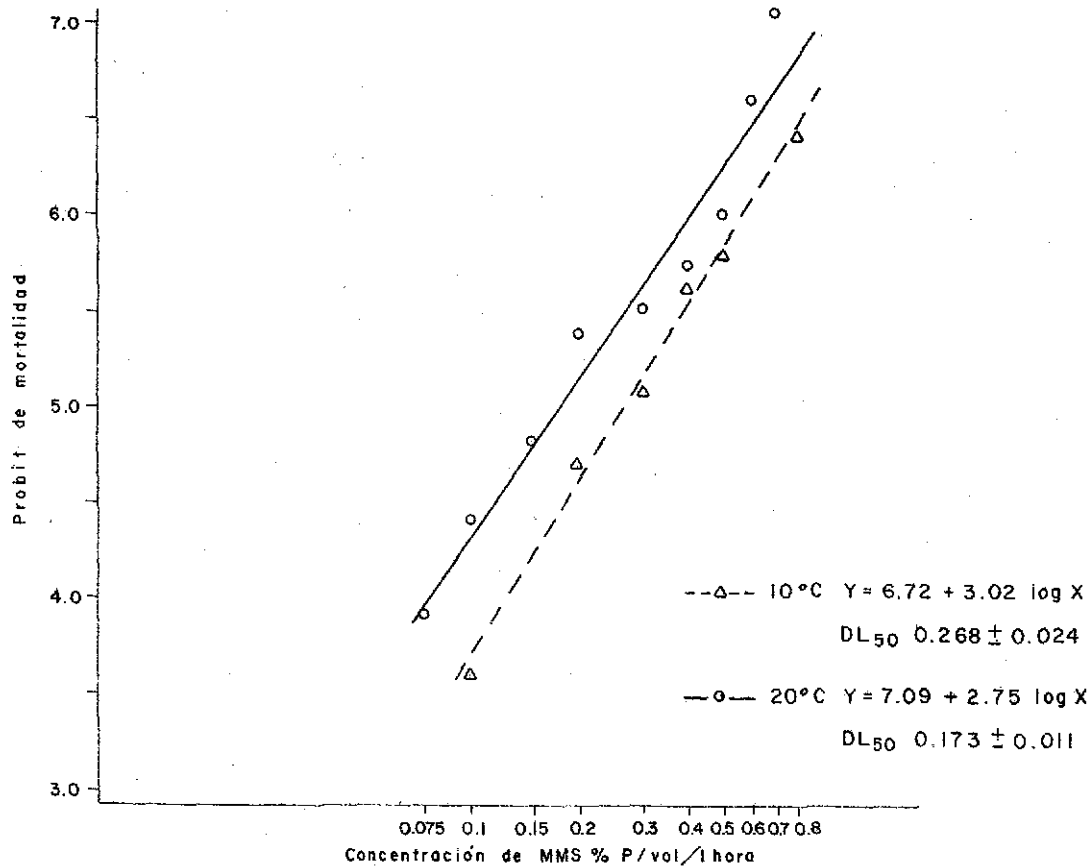


Fig. 5. LINEA DE REGRESION PROBIT PARA ESTIMAR LA MORTALIDAD INDUCIDA EN SEMILLAS DE CEBADA (HORDEUM VULGARE VAR. HIMALAYA) PRETRATADAS CON AGUA Y EXPUESTAS A DIFERENTES TEMPERATURAS Y CONCENTRACIONES DE MMS.

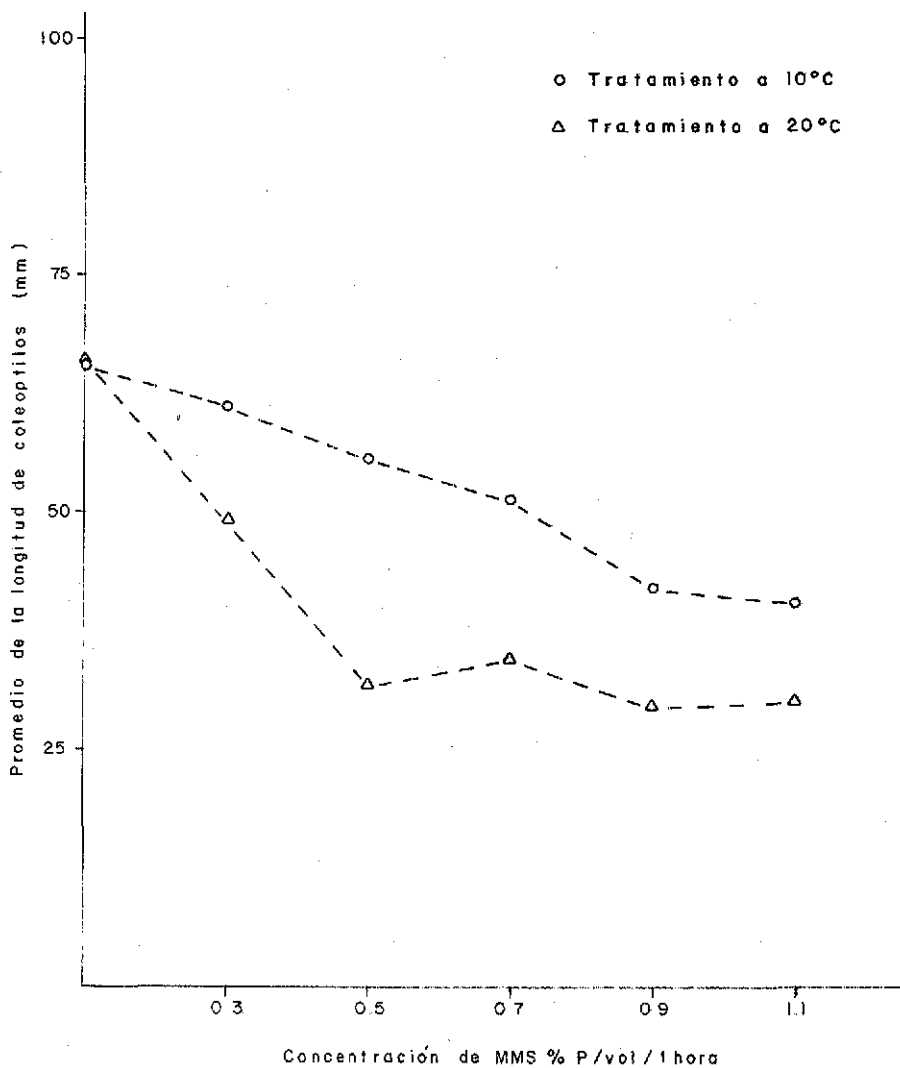


Fig 6. LONGITUD DE LOS COLEOPTILOS DE CEBADA VAR. HIMALAYA TRATADAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MMS Y DIFERENTES TEMPERATURAS DE TRATAMIENTO.

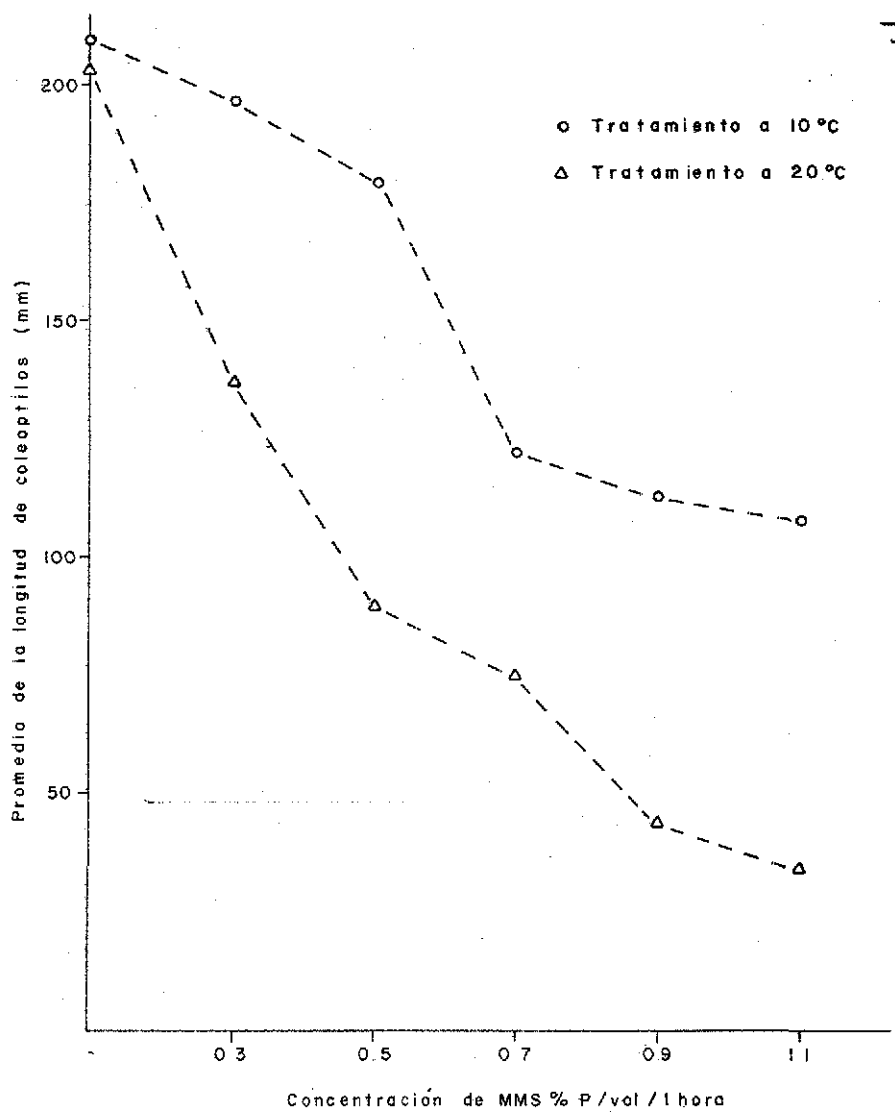


Fig. 7. LONGITUD DE LAS PLANTULAS DE SEMILLAS DE CEBADA VAR HIMALAYA TRATADAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MMS Y DIFERENTES TEMPERATURAS DE TRATAMIENTO.

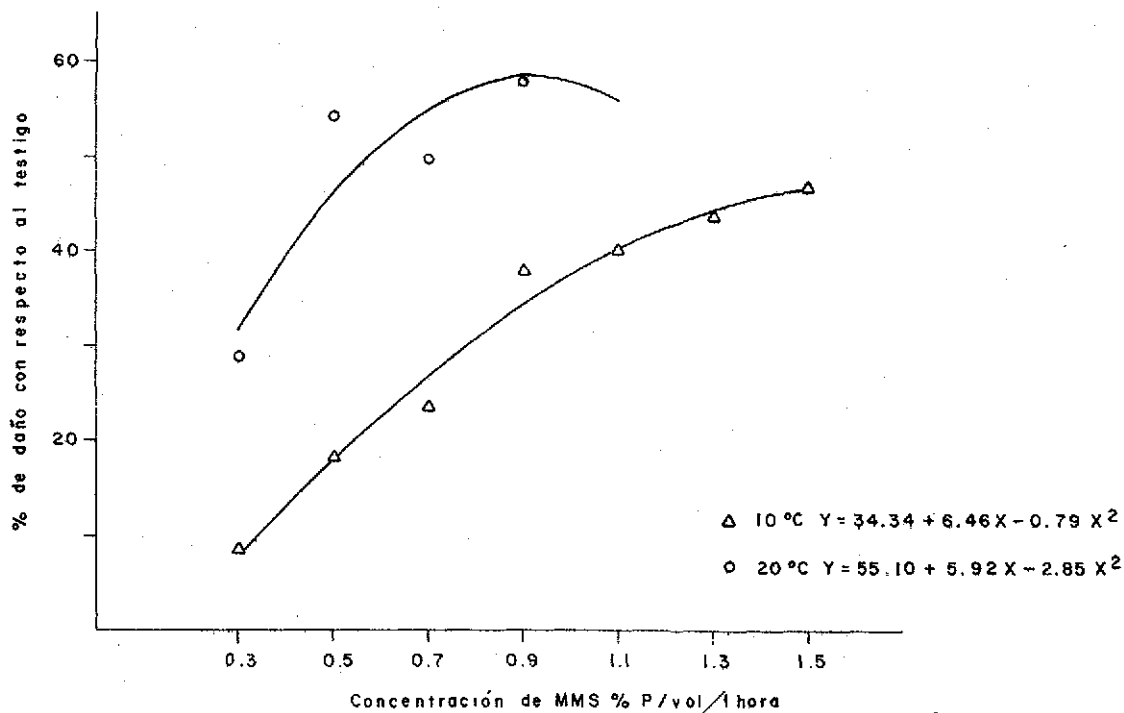


Fig. 8. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE TRATAMIENTO SOBRE COLEOPTILOS DE SEMILLAS DE CEBADA VAR. HIMALAYA TRATADAS CON MMS.

bt

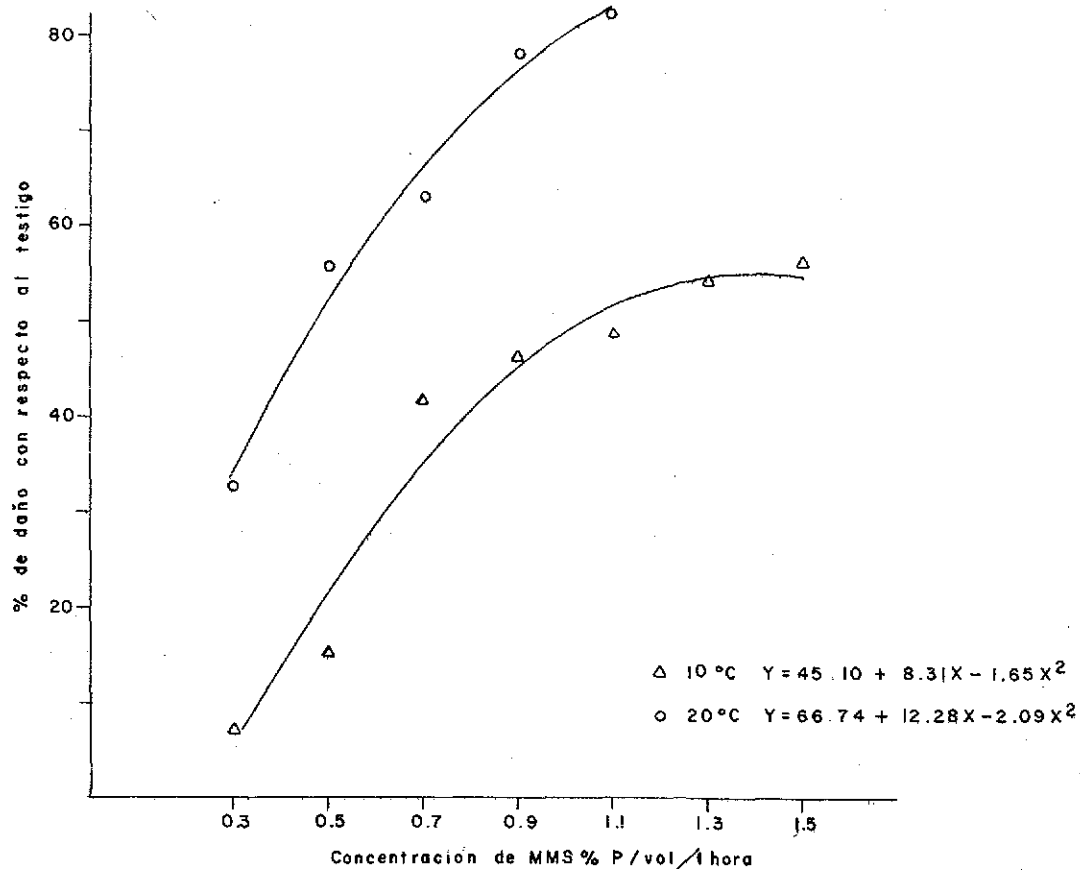


Fig. 9. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE TRATAMIENTO SOBRE PLANTULAS DE SEMILLAS DE CEBADA TRATADAS CON MMS.

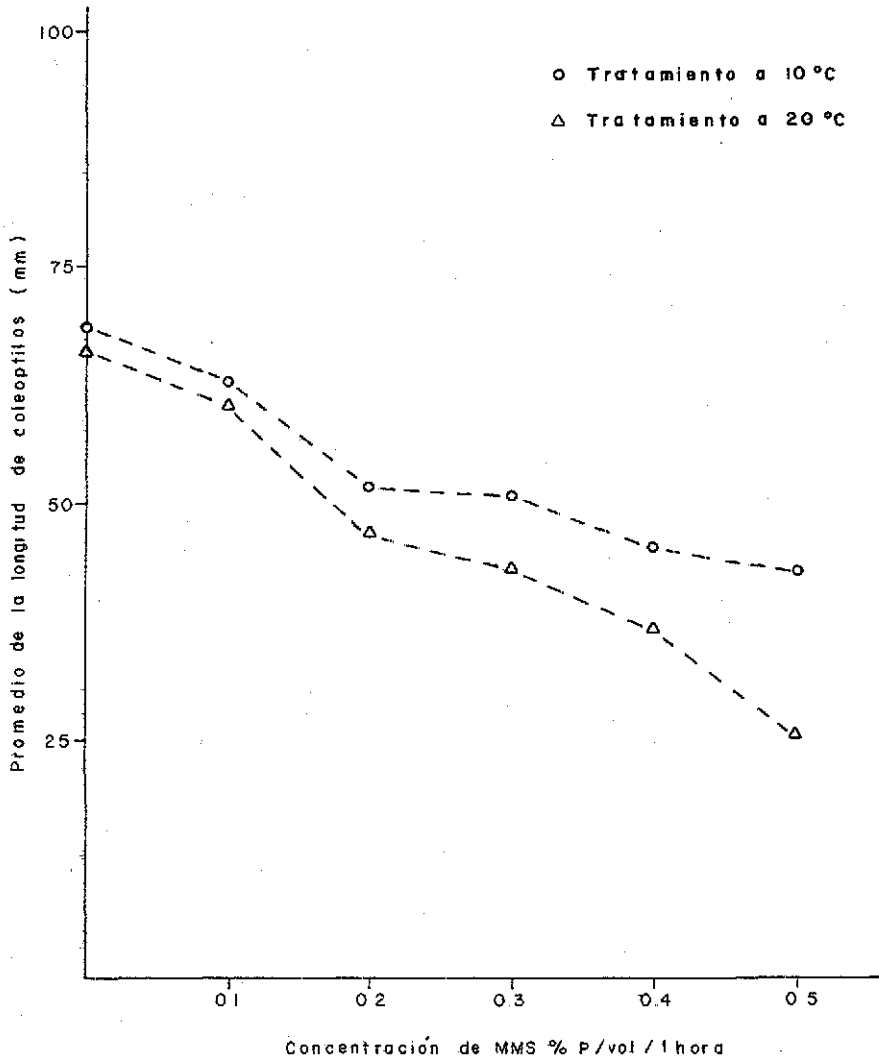


Fig. 10. LONGITUD DE LOS COLEOPTILOS DE SEMILLAS DE CEBADA PRETRATADAS EN AGUA Y PUESTAS EN SOLUCION DE MMS A DIFERENTES CONCENTRACIONES Y TEMPERATURAS.

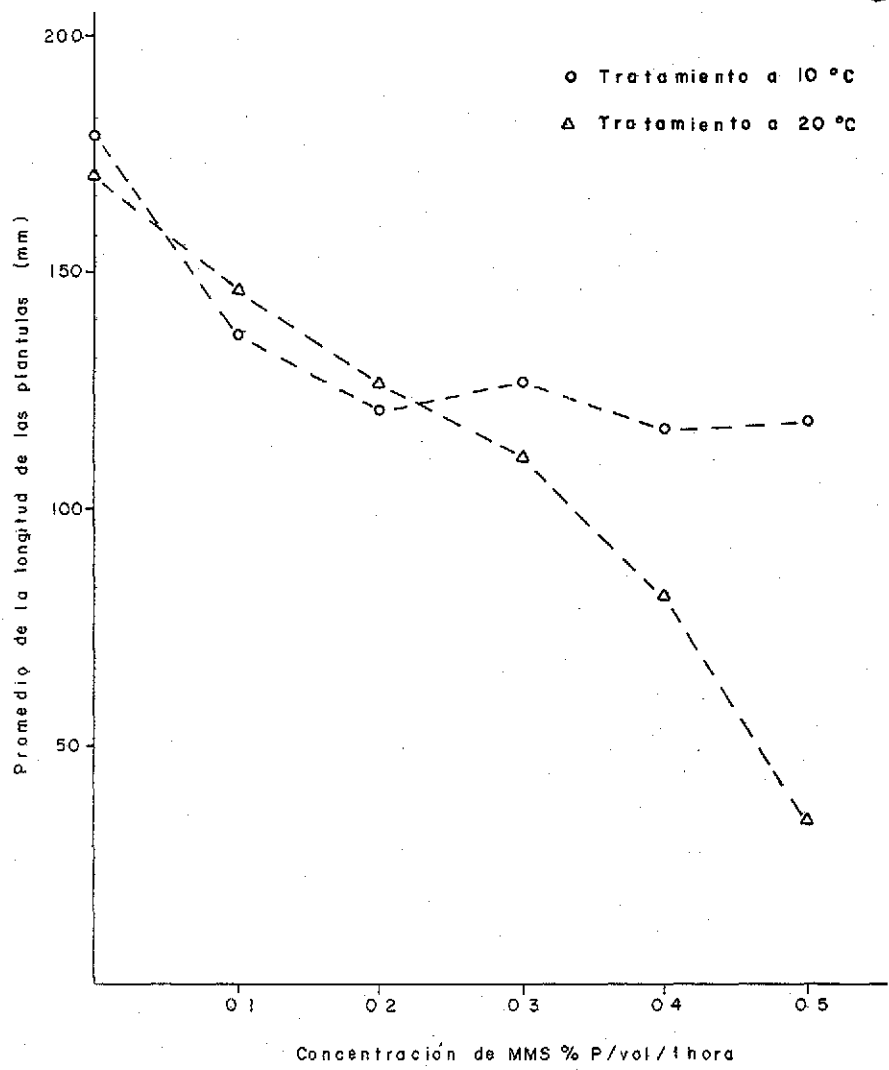


Fig. 11. LONGITUD DE LAS PLANTULAS DE SEMILLAS DE CEBADA PRETRATADAS EN AGUA Y PUESTAS EN SOLUCION DE MMS A DIFERENTES CONCENTRACIONES Y TEMPERATURAS.

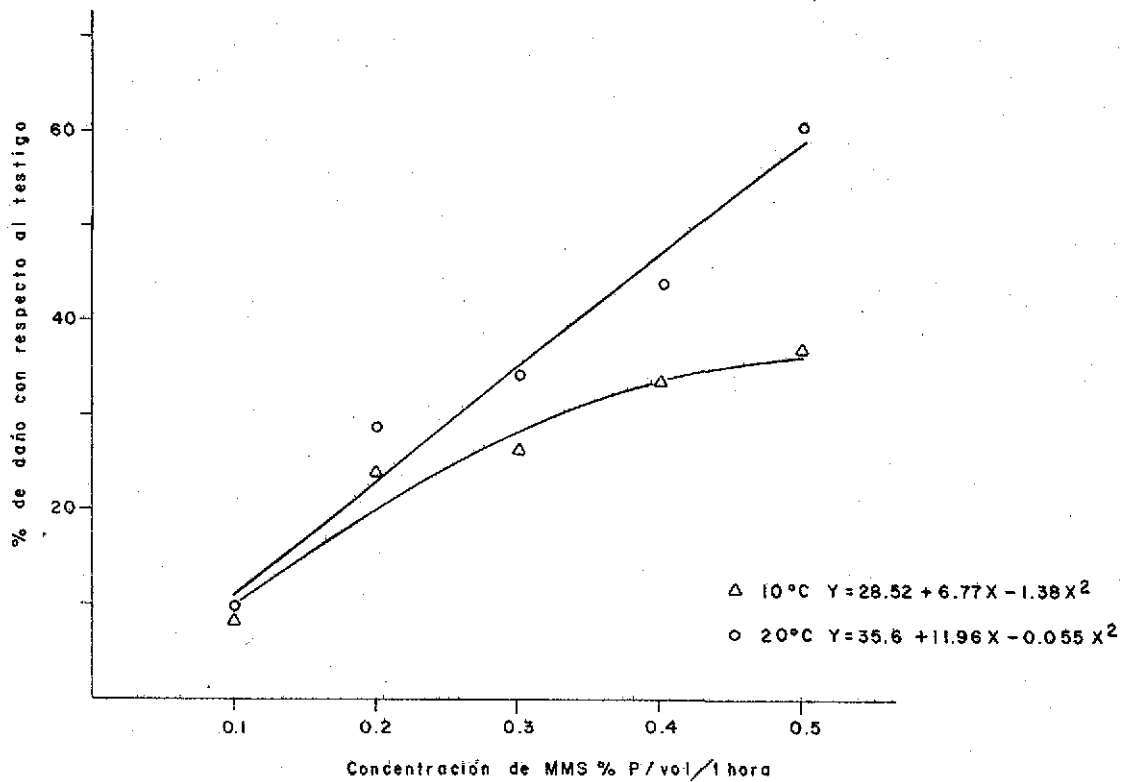


Fig.12. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE TRATAMIENTO CON EL MMS SOBRE COLEOPTILOS DE SEMILLAS PRETRATADAS CON AGUA

83

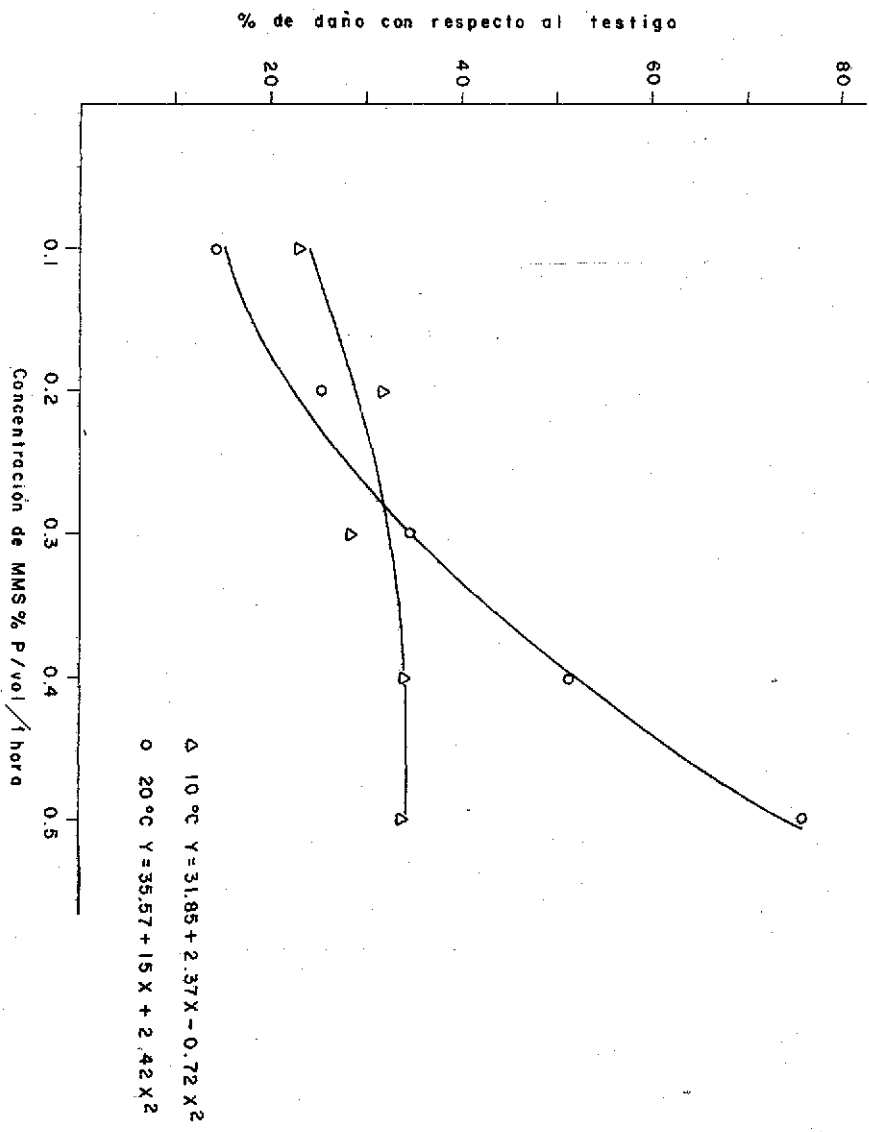


FIG. 13. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE TRATAMIENTO CON EL MMS SOBRE PLANTULAS DE SEMILLAS DE CEBADA VAR. HIMALAYA PRETRATADAS CON AGUA.

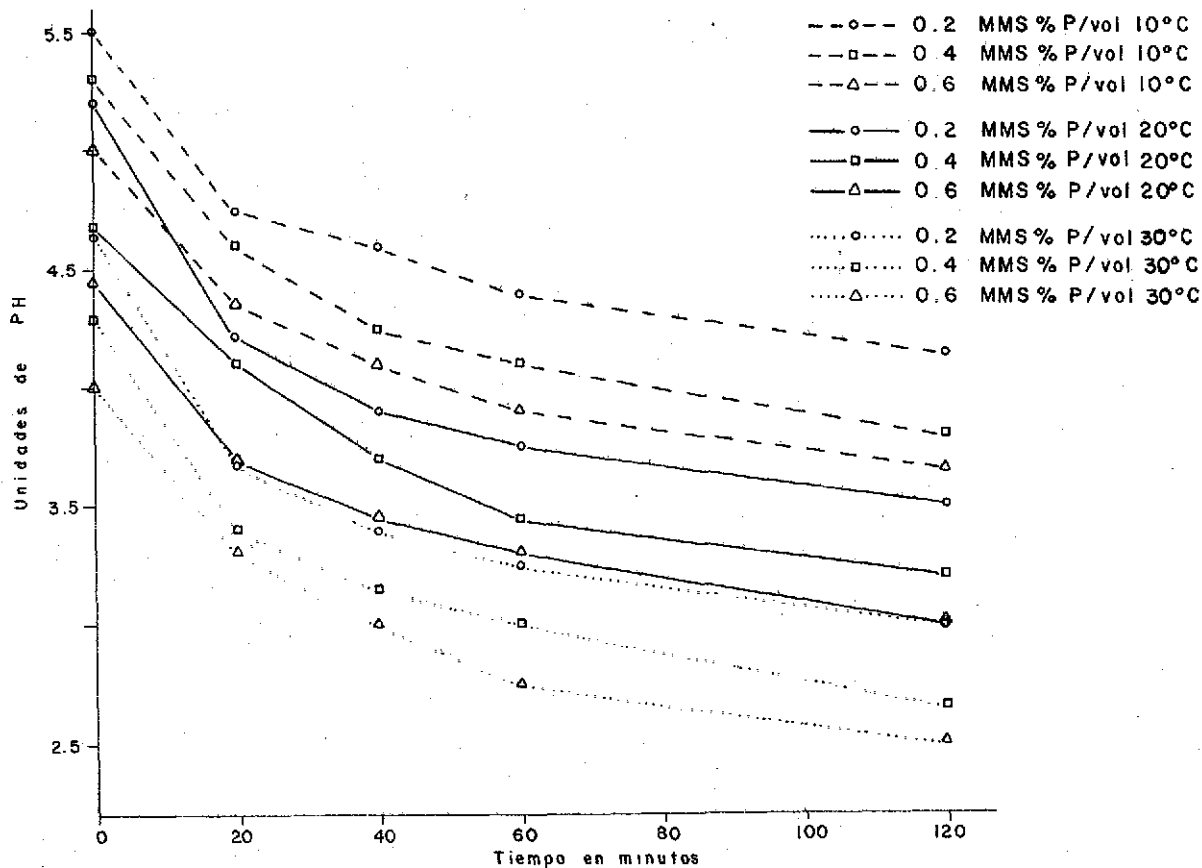


Fig.14. CAMBIOS EN EL PH DE SOLUCIONES ACUOSAS DE MMS A DIFERENTES CONCENTRACIONES Y TEMPERATURAS

BS

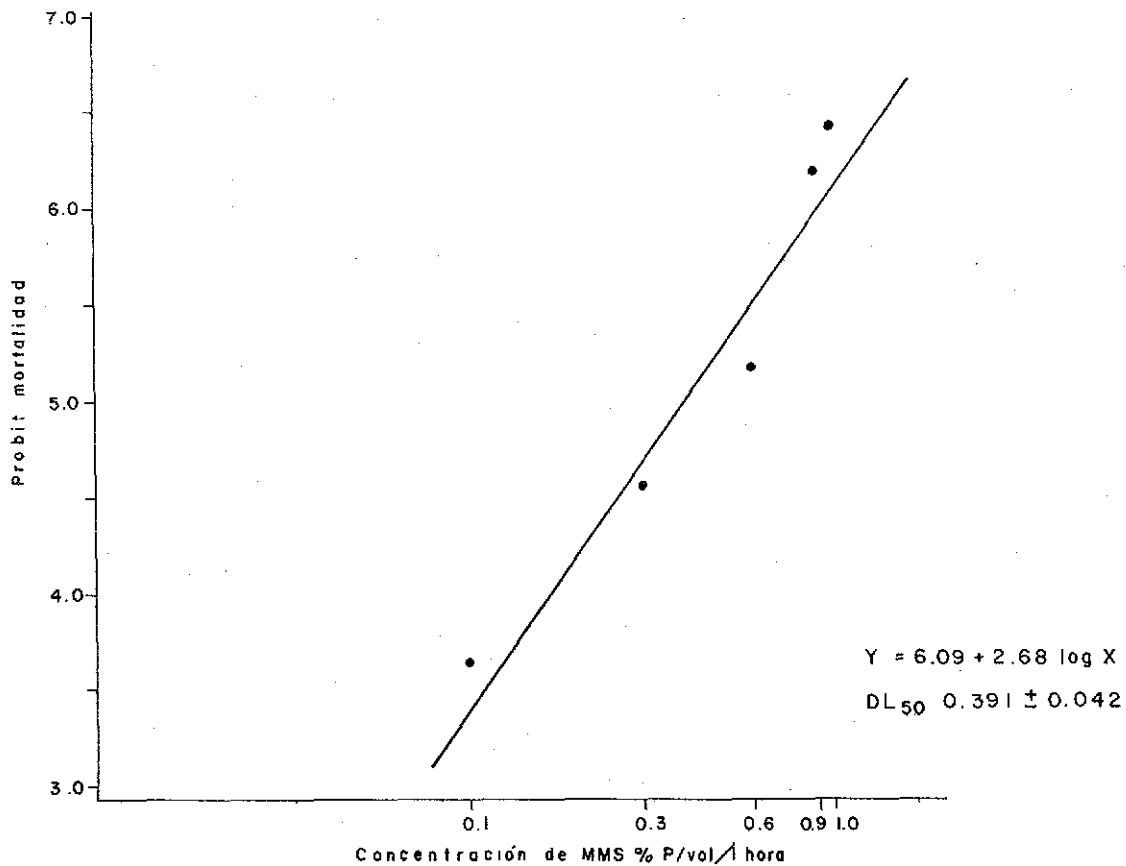


Fig. 15. LINEA DE REGRESION PROBIT PARA ESTIMAR LA MORTALIDAD INDUCIDA EN SEMILLAS DE TRITICALE HEXAPLOIDE LART (VAR. BACUM) EXPUESTAS A DIFERENTES DOSIS DE MMS

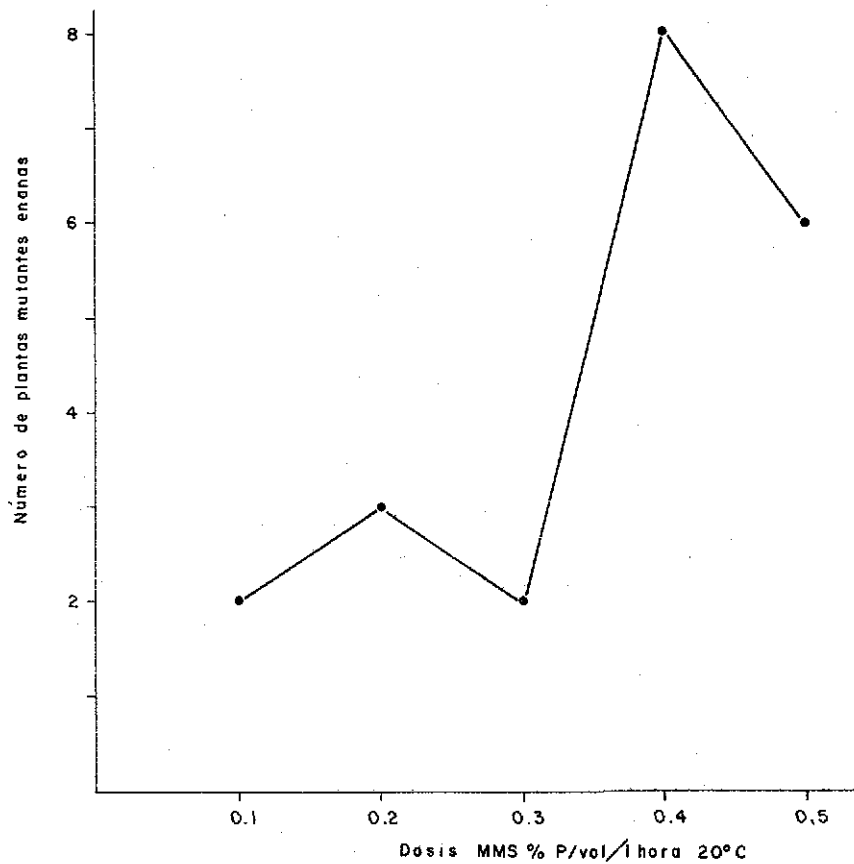


Fig.16 EFECTO DE LA DOSIS DE MMS SOBRE LA INDUCCION DE MUTANTES ENANOS EN TRITICALE HEXAPLOIDE LART

TABLA I (1).- ALGUNAS CONSTANTES DE INTERES PARA CIERTOS AGENTES ALQUILANTES.

AA	s	Temperatura °C	1 ADN/100 (2) /proteínas	Vida media 20 °C	Tipo de Mecanismo de reacción
OPMS	2.00	20	0.0025	---	SN ₂
AmMMS	1.40	20	0.02	---	SN ₂
MMS	0.86	20	0.4	68 hrs.	SN ₂
MOEMS	0.71	20	0.8	---	SN ₂
EMS	0.67	20	1.5	93 hrs.	SN ₁ /SN ₂
iBMS	0.55	37	2.5	193 hrs.	SN ₂
NeoMS	0.45	37	5.0	---	SN ₂
iPMS	0.31	20	12.0	108 min.	SN ₁

(1) Datos tomados de Osterman-Golkar y col. (1970)

(2) Constantes nucleofílicas (n) de moléculas de interés biológico:
ADN=2.5; P₂O₄=2.8; cisteína (proteínas)=5.1

TABLA II

CONCENTRACIONES DE MMS EN % P/VOL/1 HORA PARA DIFERENTES DOSIS LETALES INDUCIDAS SOBRE SEMILLAS DE CEBADA VAR. HIMALAYA CON Y SIN PRETRATAMIENTO EN AGUA PUESTAS A DIFERENTES TEMPERATURAS DE TRATAMIENTO *.

DOSIS LETAL	TEMPER. °C.	SIN PRETRATAMIENTO		CON PRETRATAMIENTO	
		10	20	10	20
25		0.96	0.49	0.16	0.09
40		1.32	0.58	0.22	0.14
50		1.60	0.64	0.26	0.17
60		1.94	0.71	0.32	0.21
75		2.67	0.84	0.44	0.30
90		4.23	0.07	0.71	0.50

* Calculados por el programa Probit SAS corrido en el Colegio de Postgrado de Chapingo, Méx.

TABLA III.- CRECIMIENTO Y PORCENTAJE DE DAÑO DE LOS COLEOPTILOS DE SEMILLAS DE CEBADA (HORDEUM VULGARE VAR. HIMALAYA) TRATADAS CON MMS A DIFERENTES CONCENTRACIONES (% P/VOL/HORA) Y TEMPERATURAS.

TEMPERATURA DE TRATAMIENTO	DOSIS DE MMS	CRECIMIENTO PROMEDIO DE LOS COLEOPTILOS (mm)				PORCENTAJE DE DAÑO CON RESPECTO AL TESTIGO.
		X	S	EE	CV	
10°C	0.0	65.18	5.72	0.44	8.77	---
	0.3	61.46	7.79	0.52	12.67	8.70
	0.5	55.16	7.59	0.50	13.75	18.06
	0.7	51.43	9.97	0.74	19.38	23.60
	0.9	41.90	7.55	0.59	18.01	37.75
	1.1	40.26	6.42	0.55	15.94	40.19
	1.3	38.00	6.85	0.61	18.02	43.55
	1.5	36.03	6.03	0.45	16.73	46.47
20°C	0.0	65.62	6.93	0.55	10.56	---
	0.3	49.23	10.75	0.82	21.83	28.83
	0.5	31.72	11.25	0.91	35.46	54.14
	0.7	34.76	6.59	0.66	18.95	49.75
	0.9	29.37	5.13	0.70	17.46	57.54
	1.1	29.92	4.84	0.92	16.17	56.75
	1.3	---	---	---	---	---
	1.5	---	---	---	---	---

06

TABLA IV.- ANALISIS DE LA VARIANZA PARA DETERMINAR EL EFECTO SOBRE LA LONGITUD DE COLEOPTILOS DE SEMILLAS TRATADAS CON MMS A DIFERENTES TEMPERATURAS Y CONCENTRACIONES.

FV	SC	GL	CM	F exp.
Temperatura	465.87	1	465.87	15.06*
Concentraciones de MMS	1408.91	5	281.78	9.11*
Error	154.61	5	30.92	
Total	2029.39	11		

* Significativos al 0.05%.

TABLA V.- EFECTO DEL MMS A DIFERENTES TEMPERATURAS Y CONCENTRACIONES SOBRE LA LONGITUD DEL COLEOPTILO DE SEMILLAS DE CEBADA VAR. HIMALAYA.

TEMPERATURA Concentración MMS % p/vol Repetición	10 °C						20 °C					
	0.0	0.3	0.5	0.7	0.9	1.1	0.0	0.3	0.5	0.7	0.9	1.1
I	65.30	59.78	53.48	50.67	40.56	40.15	65.20	52.60	28.44	35.88	28.62	30.54
II	65.07	62.41	57.72	52.19	43.24	40.38	64.70	47.72	32.67	33.64	30.13	30.80
III	65.20	62.19	54.05	51.43	41.90	40.25	66.94	48.08	34.06	34.76	29.36	28.42

TABLA VI.- ANALISIS DE LA VARIANZA PARA UN DISEÑO COMPLETAMENTE AL AZAR FACTORIAL 2x6 CON 3 REPETICIONES PARA DETERMINAR EL EFECTO DEL MMS Y LA TEMPERATURA DE TRATAMIENTO SOBRE LA LONGITUD DEL COLEOPTILO DE SEMILLAS DE CEBADA VAR. HIMALAYA TRATADAS CON DIFERENTES TEMPERATURAS Y CONCENTRACIONES DEL MUTAGENO.

FV	GL	SC	CM	F
Tratamiento	11	6089.74	553.61	217.10*
Temperatura	1	1386.07	1386.07	543.55*
Concentración de MMS	5	4242.48	848.49	332.74*
Inter TxC	5	461.19	92.23	36.18*
Error	24	61.24	2.55	
Total	35	6150.98		

* Significativos al 0.01%

TABLA VII. PRUEBA SNK PARA COMPARACION MULTIPLE DE MEDIAS DE LA LONGITUD DE LOS COLEOPTILOS DE SEMILLAS TRATADAS CON MMS A DIFERENTES TEMPERATURAS

94

RANGO				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
DOSIS [▼]				0.9(20°)	1.1(20°)	0.5(20°)	0.7(20°)	1.1(10°)	0.9(10°)	0.3(20°)	0.7(10°)	0.5(10°)	0.3(10°)	0.0(10°)	0.0(20°)	
\bar{X}				29.37	29.92	31.72	34.76	40.26	41.90	49.23	51.43	55.16	61.46	65.18	65.62	
RANGO	DOSIS	\bar{X}	Ni	53	28	150	98	135	161	170	180	225	225	167	157	
1	0.9(20°)	29.37	53	—												
2	1.1(20°)	29.92	28	0.17 [▼]	—											
3	0.5(20°)	31.72	150	1.97 [▼]	1.80 [▼]	—										
4	0.7(20°)	34.76	98	5.01	4.84	3.04	—									
5	1.1(10°)	40.26	135	10.51	10.34	8.54	5.50	—								
6	0.9(10°)	41.90	161	12.15	11.98	10.18	7.14	1.64 [▼]	—							
7	0.3(20°)	49.23	170	19.48	19.31	17.51	14.17	8.97	7.33	—						
8	0.7(10°)	51.43	180	21.68	21.51	19.71	16.67	11.17	9.53	2.20	—					
9	0.5(10°)	55.16	225	25.41	25.24	23.44	20.40	14.90	13.26	5.93	3.73	—				
10	0.3(10°)	61.46	225	31.71	31.54	29.74	26.70	21.20	19.56	12.23	10.03	6.30	—			
11	0.0(10°)	65.18	167	33.43	35.26	33.46	30.42	24.92	23.28	15.95	13.75	10.02	3.72	—		
12	0.0(20°)	65.62	157	35.87	35.70	33.90	30.86	25.36	23.72	16.39	14.19	10.46	4.16	0.44 [▼]	—	

▼ Diferencia no significativa

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

▼ Dosis de MMS en % P/vol / 1 hora a 10 y 20 °C

TABLA VIII.- CRECIMIENTO Y PORCENTAJE DE DAÑO DE LAS PLANTULAS DE SEMILLAS DE CEBADA -----
 (HORDEUM VULGARE VAR. HIMALAYA) TRATADAS CON MMS A DIFERENTES CONCENTRACIONES
 (% P/VOL/HORA) Y TEMPERATURAS:

TEMPERATURA DE TRATAMIENTO	DOSIS DE MMS	CRECIMIENTO PROMEDIO DE LAS PLANTULAS (mm)				PORCENTAJE DE DAÑO CON RESPECTO AL TESTIGO
		\bar{X}	S	EE	CV	
10 °C	0.0	209.92	30.29	2.34	14.42	—
	0.3	196.44	29.65	1.97	15.09	7.20
	0.5	179.78	39.73	2.64	22.09	15.07
	0.7	123.31	32.02	2.35	26.01	41.74
	0.9	113.60	28.94	2.21	25.47	46.33
	1.1	108.69	28.78	2.29	26.41	48.65
	1.3	96.87	25.22	2.08	26.03	54.23
	1.5	92.46	18.64	1.34	20.16	56.32
20 °C	0.0	203.46	38.05	3.03	19.57	—
	0.3	136.94	34.41	2.64	25.05	32.69
	0.5	89.74	22.58	1.84	25.16	55.89
	0.7	75.12	13.38	1.34	17.81	63.07
	0.9	44.07	12.67	1.83	28.74	78.33
	1.1	34.88	4.56	0.97	13.07	82.85
	1.3	---	---	---	---	---

TABLA IX.- ANALISIS DE LA VARIANZA PARA DETERMINAR EL EFECTO SOBRE LA LONGITUD DE IAS --
 PLANTULAS DE SEMILLAS TRATADAS CON MMS A DIFERENTES TEMPERATURAS.

FV	SC	GL	CM	F exp.
Temperatura	10597.56	1	10597.56	32.12*
Concentración de MMS	26822.75	5	5364.55	16.26*
Error	1649.52	5	329.90	

Total 39069.83 11

* Significativos a 0.01%.

TABLA X.- MEDIAS DE TRES REPETICIONES QUE MUESTRAN EL EFECTO DEJ MMS A DIFERENTES --
 TEMPERATURAS Y CONCENTRACIONES SOBRE LA LONGITUD DE LAS PLANTULAS DE SEMI--
 LLAS DE CEBADA VAR. HIMALAYA.

TEMPERATURA °C	CONCEN. M M S					
	0.0	0.3	0.5	0.7	0.9	1.1
10	206.20	193.28	182.32	123.34	118.20	108.93
	212.00	200.30	180.25	123.29	109.00	108.45
	210.96	195.74	176.20	123.30	112.63	108.69
20	206.58	132.91	88.03	77.16	40.72	34.16
	193.28	137.68	92.58	71.98	47.12	33.00
	210.52	140.24	88.61	76.22	44.37	37.50

TABLA XI.- ANALISIS DE LA VARIANZA FACTORIAL 2x6 PARA DETERMINAR EL EFECTO SOBRE LA LONGITUD DE LAS PLANTULAS DE SEMILLAS DE CEBADA VAR. HIMALAYA TRATADAS CON MMS A DIFERENTES TEMPERATURAS Y CONCENTRACIONES.

FV	GL	SC	CM	F
Tratamientos	11	121150.66	11013.69	717.03*
Temperatura	1	30106.86	30106.86	1960.08*
Concentraciones de MMS	5	84827.81	16965.56	1104.52*
Interacción TxC	5	6215.99	1243.19	80.93*
Error	24	368.87	15.36	
Total	35	121519.53		

* Altamente significativas.

TABLA XII PRUEBA SNK PARA COMPARACION MULTIPLE DE MEDIAS DE LA LONGITUD DE LAS PLANTULAS DE SEMILLAS TRATADAS CON MMS A DIFERENTES TEMPERATURAS.

				RANGO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
				DOSIS [▼]	1.1(20°)	0.9(20°)	0.7(20°)	0.5(20°)	1.1(10°)	0.9(10°)	0.7(10°)	0.3(20°)	0.5(10°)	0.3(10°)	0.0(20°)	0.0(10°)	
				\bar{X}	34.88	44.07	75.12	89.74	108.69	113.60	123.31	136.94	179.78	196.44	203.46	209.92	
RANGO	DOSIS	\bar{X}	Ni		22	48	99	150	157	171	185	170	225	225	157	167	
1	1.1(20°)	34.88	22	—													
2	0.9(20°)	44.07	48	9.19 [▼]	—												
3	0.7(20°)	75.12	99	40.24	31.05	—											
4	0.5(20°)	89.74	150	54.86	45.67	14.62	—										
5	1.1(10°)	108.69	157	73.81	64.62	33.57	18.95	—									
6	0.9(10°)	113.60	171	78.72	69.53	38.48	23.86	4.91 [▼]	—								
7	0.7(10°)	123.31	185	88.43	79.24	48.19	33.57	14.62	9.71	—							
8	0.3(20°)	136.94	170	102.06	92.87	61.82	47.20	28.25	23.34	13.63	—						
9	0.5(10°)	179.78	225	144.90	135.71	104.66	90.04	71.09	66.18	56.47	42.84	—					
10	0.3(10°)	196.44	225	161.56	152.37	121.32	106.70	87.75	82.84	73.13	59.50	16.66	—				
11	0.0(20°)	203.46	157	168.58	159.39	128.34	113.72	94.77	89.86	80.15	66.52	23.68	7.02	—			
12	0.0(10°)	209.92	167	175.04	165.85	134.80	120.18	101.23	96.32	86.61	72.98	30.14	13.48	6.46 [▼]	—		

▼ Diferencia no significativa

▼▼ Dosis de MMS en % P/vol / 1 hora a 10 y 20 °C

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

TABLA XIII.- PRUEBA DE χ^2 PARA LA BONDAD DE AJUSTE DE LOS VALORES ESPERADOS Y OBSERVADOS PARA ENCONTRAR LA FUNCION MATEMATICA QUE RELACIONE MEJOR EL DAÑO EN COLEOPTILOS Y PLANTULAS DE SEMILLAS DE CEBADA TRATADAS CON MMS A DISTINTAS TEMPERATURAS Y CONDICIONES DE TRATAMIENTO.

EVENTO ANALIZADO % DE DAÑO CON RESPECTO AL TESTIGO	RECETA (NORMAL - NORMAL) $y=a+a_1x$	EXPONENCIAL (LOG. NORMAL) $\text{Log } y=a_0+a_1x$	GEOMETRICA (LOG - LOG) $\text{Log } y=\log a_0+a_1 \log x$	CUADRATICA (PARABOLICA) $y=a_0+a_1x+a_2x^2$
COLEOPTILOS DE SEMILLAS TRATADAS A 10°C	$y=2.11+32.31x$ $\chi^2c=2.75$ $P > 0.05$	$\text{Log } y=0.93+0.56x$ $\chi^2c=9.29$ $P > 0.05$	$\text{Log } y=1.36+1 \log x$ $\chi^2c=41.70$ $P < < 0.001$	$y=34.34+6.46-.79x^2$ $\chi^2c=0.93$ $P >> 0.1$
COLEOPTILOS DE SEMILLAS TRATADAS A 20°C	$y=28.65+29.63x$ $\chi^2c=5.06$ $P > 0.05$	$\text{Log } y=1.54+0.2x$ $\chi^2c=5.85$ $P > 0.05$	$\text{Log } y=2.90+.41 \log x$ $\chi^2c=7.31$ $P > 0.05$	$y=55.10+5.92x-2.85x^2$ $\chi^2c=2.15$ $P > 0.05$
PLANTULAS DE SEMILLAS TRATADAS A 10°C	$y=1.12+41.54x$ $\chi^2c=11.98$ $P > 0.05$	$\text{Log } y=0.88+0.68x$ $\chi^2c=33.74$ $P < 0.001$	$\text{Log } y=.83+1.41 \log x$ $\chi^2c=18.14$ $P < 0.01$	$y=45.10+8.31x-1.65x^2$ $\chi^2c=4.29$ $P > 0.05$
PLANTULAS DE SEMILLAS TRATADAS A 20°C	$y=19.57+61.42x$ $\chi^2c=1.75$ $P > 0.05$	$\text{Log } y=1.45+0.46x$ $\chi^2c=45.81$ $P < < 0.001$	$\text{Log } y=2.65+.63 \log x$ $\chi^2c=1.54$ $P > 0.05$	$y=66.74+12.28x-2.09x^2$ $\chi^2c=0.50$ $P >> 0.1$
COLEOPTILOS DE SEMILLAS PRETRATADAS CON AGUA Y TRATADAS A 10°C	$y=5.42+67.75x$ $\chi^2c=2.78$ $P > 0.05$	$\text{Log } y=.92+1.46x$ $\chi^2c=6.40$ $P > 0.05$	$\text{Log } y=2.09+.94 \log x$ $\chi^2c=4.99$ $P > 0.05$	$y=28.52+6.77x-1.38x^2$ $\chi^2c=0.98$ $P >> 0.1$
COLEOPTILOS DE SEMILLAS PRETRATADAS CON AGUA Y TRATADAS A 20°C	$y=6.82+95.54x$ $\chi^2c=4.61$ $P > 0.05$	$\text{Log } y=0.96+1.76x$ $\chi^2c=6.67$ $P > 0.05$	$\text{Log } y=1.90+1.12 \log x$ $\chi^2c=6.67$ $P > 0.05$	$y=35.6+11.96x-.0058x^2$ $\chi^2c=2.23$ $P 0.05$
PLANTULAS DE SEMILLAS PRETRATADAS CON AGUA Y TRATADAS A 10°C	$y=23.26+23.82x$ $\chi^2c=0.99$ $P > 0.05$	$\text{Log } y=1.37+.34x$ $\chi^2c=1.15$ $P > 0.05$	$\text{Log } y=3.18+0.26 \log x$ $\chi^2c=4.53$ $P > 0.05$	$y=31.85+2.37x-.72x^2$ $\chi^2c=0.76$ $P >> 0.1$
PLANTULAS DE SEMILLAS PRETRATADAS CON AGUA Y TRATADAS A 20°C	$y=4.6+150.02x$ $\chi^2c=2.89$ $P > 0.05$	$\text{Log } y=1+1.76x$ $\chi^2c=0.47$ $P >> 0.05$	$\text{Log } y=2.14+1 \log x$ $\chi^2c=2.13$ $P > 0.05$	$y=35.57+15+2.42x^2$ $\chi^2c=0.38$ $P >> 0.1$

TABLA XIV.- COEFICIENTE DE CORRELACION Y ERROR ESTANDAR PARA LAS ECUACIONES CUADRATICAS ($y=a_0+a_1x+a_2x^2$) QUE RELACIONAN EL DAÑO EN EL COLEOPTILO Y LA PLANTULA DE SEMILLAS DE CEBADA TRATADAS CON MMS A DISTINTAS TEMPERATURAS Y CONDICIONES DE TRATAMIENTO.

EVENTO ANALIZADO EN % DE DAÑO CON RESPECTO AL TESTIGO	ECUACION	r (+)	S y X (+)
COLEOPTILOS DE SEMILLAS TRATADAS A 10°C	$y=34.34+6.46x-0.79x^2$	0.99	0.86
COLEOPTILOS DE SEMILLAS TRATADAS A 20°C	$y=55.10+5.92x-2.85x^2$	0.90	0.49
PLANTULAS DE SEMILLAS TRATADAS A 10°C	$y=45.10+8.31x-1.65x^2$	0.97	0.38
PLANTULAS DE SEMILLAS TRATADAS A 20°C	$y=66.74+12.28x-2.09x^2$	0.99	0.45
COLEOPTILOS DE SEMILLAS PRETRATADAS CON AGUA Y TRATADAS A 10°C	$y=28.52+6.77x-1.38x^2$	0.97	0.45
COLEOPTILOS DE SEMILLAS PRETRATADAS CON AGUA Y TRATADAS A 20°C	$y=35.6+11.96x-0.058x^2$	0.98	0.45
PLANTULAS DE SEMILLAS PRETRATADAS CON AGUA Y TRATADAS A 10°C	$y=31.85+2.37x-0.72x^2$	0.86	0.51
PLANTULAS DE SEMILLAS PRETRATADAS CON AGUA Y TRATADAS A 20°C	$y=35.57+15x+2.42x^2$	0.99	0.44

TABLA XV.- CRECIMIENTO Y PORCENTAJE DE DAÑO DE LOS COLEOPTILOS DE SEMILLAS DE CEBADA --
 (HORDEUM VULGARE VAR. HIMALAYA) PRETRATADAS EN AGUA Y PUESTAS EN SOLUCION DE
 MMS A DIFERENTES CONCENTRACIONES (% P/VOL/HCRA) Y TEMPERATURAS.

TEMPERATURA DE TRATAMIENTO	DOSIS DE MMS	CRECIMIENTO PROMEDIO DE LCS COLEOPTILOS (mm)				PORCENTAJE DE DAÑO CON RESPECTO AL TESTIGO
		X	S	EE	CV	
10 °C	0.0	68.40	7.11	0.75	10.39	---
	0.1	62.88	13.31	0.99	21.16	8.07
	0.2	52.10	13.48	1.28	25.87	23.83
	0.3	50.44	8.95	1.00	17.74	26.25
	0.4	45.51	9.91	1.51	21.77	33.46
	0.5	43.00	8.46	1.20	19.67	37.13
20 °C	0.0	66.24	8.12	0.85	12.25	---
	0.1	60.30	10.88	0.96	18.04	8.96
	0.2	47.05	7.13	0.92	15.15	28.97
	0.3	43.52	5.76	0.81	13.23	34.29
	0.4	37.19	5.34	0.85	14.35	43.85
	0.5	25.60	5.30	0.89	20.70	61.35

169

TABLA XVI.- ANALISIS DE LA VARIANZA PARA DETERMINAR EL EFECTO SOBRE LA LONGITUD DE LOS COLEOPTILOS DE SEMILLAS PRETRATADAS CON AGUA Y TRATADAS CON MMS A DIFERENTES TEMPERATURAS Y CONCENTRACIONES:

FV	SC	GL	CM	F Exp.
Temperaturas	150.02	1	150.02	9.50*
Concentraciones de MMS	1529.42	5	305.88	19.37*
Error	78.98	5	15.79	
Total	1758.36	11		

* Significativas al 0.01%

TESIS CON
 CALIFICACION

TABLA XVII.- MEDIAS DE TRES REPETICIONES QUE MUESTRAN EL EFECTO DEL MMS A DIFERENTES TEMPERATURAS Y CONCENTRACIONES SOBRE LA LONGITUD DE LOS COLEOPTILOS DE SEMILLAS DE CEBADA VAR. HIMALAYA PRETRATADAS CON AGUA.

Concentración de MMS. Temperatura	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
10°C	65.62	61.46	53.60	54.34	46.28	45.57
	73.88	64.31	50.61	46.55	43.94	41.43
	65.70	62.87	53.83	50.43	46.31	42.00
20°C	69.06	62.85	47.66	45.30	36.39	24.32
	65.00	59.76	47.44	41.75	35.80	27.40
	64.67	58.29	45.91	43.56	39.38	25.02

104

TABLA XVIII.- ANALISIS DE VARIANZA PARA DETERMINAR EL EFECTO SOBRE LA LONGITUD DE LOS COLEOPTILOS DE SEMILLAS PRETRATADAS CON AGUA Y TRATADAS CON MMS A DIFERENTES TEMPERATURAS Y CONCENTRACIONES.

FUENTE DE VARIACION	GL	SC	CM	F
Tratamiento	11	5281.47	480.13	80.55**
Temperatura	1	463.04	463.04	77.69**
Concentraciones de MMS.	5	4586.71	917.34	153.91**
Inter. T x C	5	231.72	46.34	7.77*
Error	24	143.26	5.96	
Total	35	5424.73		

* Significativo al 0.05%
 ** Significativo al 0.01%

105

TABLA XIX. PRUEBA SNK PARA COMPARACION MULTIPLE DE MEDIAS DE LA LONGITUD DE LOS COLEOPTILOS DE SEMILLAS PRETRATADAS CON AGUA Y TRATADAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MMS Y DIFERENTES TEMPERATURAS.

RANGO				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
DOSIS ▼▼				0.5(20°)	0.4(20°)	0.5(10°)	0.3(20°)	0.4(10°)	0.2(20°)	0.3(10°)	0.2(10°)	0.1(20°)	0.1(10°)	0.0(20°)	0.0(10°)	
\bar{X}				25.60	37.19	43.00	43.52	45.51	47.05	50.44	52.10	60.30	62.88	66.24	68.40	
RANGO	DOSIS	\bar{X}	Ni	35	39	49	50	43	59	79	110	127	180	90	90	
1	0.5(20°)	25.60	35	—												
2	0.4(20°)	37.19	39	11.59	—											
3	0.5(10°)	43.00	49	17.40	5.81	—										
4	0.3(20°)	43.52	50	17.92	6.33	0.52 ▼	—									
5	0.4(10°)	45.51	43	19.91	8.32	2.51 ▼	1.99 ▼	—								
6	0.2(20°)	47.05	59	21.45	9.86	4.05 ▼	3.53 ▼	1.54 ▼	—							
7	0.3(10°)	50.44	79	24.84	13.25	7.44	6.92	4.93	3.39 ▼	—						
8	0.2(10°)	52.10	110	26.50	14.91	9.10	8.58	6.59	5.05	1.66 ▼	—					
9	0.1(20°)	60.30	127	34.70	23.11	17.30	16.78	14.79	13.25	9.86	8.20	—				
10	0.1(10°)	62.88	180	37.28	25.69	19.88	19.36	17.37	15.83	12.44	10.78	2.58	—			
11	0.0(20°)	66.24	90	40.64	29.05	23.24	22.72	20.73	19.19	15.80	14.14	5.94	3.36	—		
12	0.0(10°)	68.40	90	42.80	31.21	25.40	24.88	22.89	21.35	18.00	16.30	8.10	5.52	2.16 ▼	—	

▼ Diferencia no significativa

▼▼ Dosis de MMS en % P/vol /1 hora a 10 y 20 °C

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

TABLA XX.- CRECIMIENTO Y PORCENTAJE DE DAÑO DE LAS PLANTULAS DE SEMILLAS DE CEBADA -- -
 (HORDEUM VULGARE VAR. HIMALAYA) PRETRATADAS EN AGUA Y PUESTAS EN SOLUCION --
 MUTAGENICA DE MMS A DIFERENTES TEMPERATURAS Y CONCENTRACIONES (% p/vol/hora)

TEMPERATURA DE TRATAMIENTO	DOSIS DE MMS	CRECIMIENTO PROMEDIO DE LAS PLANTURAS (mm)				PORCENTAJE DE DAÑO CON RESPECTO AL TESTIGO.
		X	S	EE	CV	
10 °C	0.0	178.93	24.46	2.58	13.67	23.15 31.90 28.89 34.42 33.75
	0.1	137.49	35.62	2.92	25.90	
	0.2	121.84	41.99	4.12	34.46	
	0.3	127.22	42.20	4.40	33.17	
	0.4	117.33	45.17	6.09	38.49	
	0.5	118.54	37.60	5.16	31.71	
20 °C	0.0	170.60	33.60	3.54	19.69	14.23 25.36 34.66 51.84 75.97
	0.1	146.31	35.60	3.06	24.33	
	0.2	127.33	35.19	4.74	27.63	
	0.3	111.46	25.80	3.42	23.14	
	0.4	82.15	18.62	2.87	22.66	
	0.5	34.66	4.70	0.77	13.56	

TABLA XXI.- ANALISIS DE LA VARIANZA PARA DETERMINAR EL EFECTO SOBRE LA LONGITUD DE LAS PLANTULAS DE SEMILLAS PRETRATADAS CON AGUA Y TRATADAS CON MMS A DIFERENTES TEMPERATURAS Y CONCENTRACIONES.

FV	SC	GL	CM	F exp.
Temperatura	1383.22	1	1383.22	2.33
Concentraciones de MMS.	11493.06	5	2298.61	3.87
Error	2966.33	5	593.26	
Total	15842.61	11		

TABLA XXII.- MEDIA DE TRES REPETICIONES QUE MUESTRAN EL EFECTO DEL MMS A DIFERENTES --
 TEMPERATURAS Y CONCENTRACIONES SOBRE LA LONGITUD DE PLANTULAS DE SEMILLAS
 DE CEBADA VAR. HIMALAYA PRETRATADAS CON AGUA.

Temperatura °C	Concentración MMS % p/vol /hora					
	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
10	174.13	138.17	120.22	128.70	115.48	129.78
	183.73	136.81	124.80	125.75	116.28	105.61
	178.93	138.72	120.50	127.21	120.23	120.23
20	172.23	146.52	128.67	113.17	85.72	34.33
	168.10	146.50	127.19	109.46	80.58	36.30
	171.48	145.91	125.97	112.35	80.15	33.35

TABLA XXIII - ANALISIS DE LA VARIANZA FACTORIAL 2x6 PARA DETERMINAR EL EFECTO SOBRE LA --
LONGITUD DE PLANTULAS DE SEMILLAS DE CEBADA VAR. HIMALAYA PRETRATADAS CON --
AGUA Y TRATADAS CON MMS A DIFERENTES TEMPERATURAS Y CONCENTRACIONES.

FV	GL	SC	CM	F
Tratamiento	11	47550.42	4322.76	247.15*
Temperatura	1	4166.67	4166.67	238.23*
Concentración de MMS.	5	34522.70	6904.54	394.77*
Interacción TxC	5	8861.05	1772.21	101.32*
Error	24	419.85	17.49	

Total 35 47970.27

* Altamente significativos

TABLA XXIV. PRUEBA SNK PARA COMPARACION MULTIPLE DE MEDIAS DE LA LONGITUD DE LAS PLANTULAS DE SEMILLAS DE CEBADA VAR. HIMALAYA PRETRATADAS CON AGUA Y TRATADAS CON MSS A DIFERENTES TEMPERATURAS.

RANGO				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
DOSIS ^{▼▼}				0.5 (20°)	0.4 (20°)	0.3 (20°)	0.4 (10°)	0.5 (10°)	0.2 (10°)	0.3 (10°)	0.2 (20°)	0.1 (10°)	0.1 (20°)	0.0 (20°)	0.0 (10°)	
\bar{X}				34.66	82.15	111.46	117.33	118.54	121.84	127.22	127.33	137.49	146.31	170.60	178.93	
RANGO	DOSIS	\bar{X}	Ni	37	42	57	55	53	104	92	55	148	135	90	90	
1	0.5 (20°)	34.66	37	—												
2	0.4 (20°)	82.15	42	47.49	—											
3	0.3 (20°)	111.46	57	76.80	29.31	—										
4	0.4 (10°)	117.33	55	82.67	35.18	5.87 [▼]	—									
5	0.5 (10°)	118.54	53	83.88	36.39	7.08 [▼]	1.21 [▼]	—								
6	0.2 (10°)	121.84	104	87.18	39.69	10.38 [▼]	4.51 [▼]	3.30 [▼]	—							
7	0.3 (10°)	127.22	92	92.56	45.07	15.76 [▼]	9.89 [▼]	8.68 [▼]	5.38 [▼]	—						
8	0.2 (20°)	127.33	55	92.67	45.18	15.87 [▼]	10.00 [▼]	8.79 [▼]	5.49 [▼]	0.11 [▼]	—					
9	0.1 (10°)	137.49	148	102.83	55.34	26.03	20.16	18.95	15.65	10.27 [▼]	10.16 [▼]	—				
10	0.1 (20°)	146.31	135	111.65	64.16	34.85	28.98	27.77	24.47	19.09	18.98	8.82	—			
11	0.0 (20°)	170.60	90	135.94	88.45	59.14	53.27	52.06	48.76	43.38	43.27	33.13	24.29	—		
12	0.0 (10°)	178.93	90	144.27	96.78	67.47	61.60	60.39	57.09	51.71	51.60	41.44	32.62	8.33 [▼]	—	

▼ Diferencia no significativa
 ▼▼ Dosis de MMS en % P/vol / 1 hora a 10 y 20 °C

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

TABLA XXV.- CAMBIOS DEL pH DE SOLUCIONES DE MMS EN AGUA A DIFERENTES TEMPERATURAS Y TIEMPOS.

Solución de MMS % p/vol y diferentes temperaturas.		Tiempo en min.				
		0	20	40	60	120
0.2	10 °C	5.55	4.75	4.60	4.40	4.15
0.2	20 °C	5.20	4.20	3.90	3.75	3.50
0.2	30 °C	4.65	3.70	3.40	3.25	3.00
0.4	10 °C	5.30	4.60	4.25	4.10	3.80
0.4	20 °C	4.70	4.10	3.60	3.45	3.20
0.4	30 °C	4.30	3.40	3.15	3.00	2.65
0.6	10 °C	5.00	4.35	4.10	3.90	3.65
0.6	20 °C	4.45	3.70	3.45	3.30	3.00
0.6	30 °C	4.00	3.30	3.00	2.75	2.50

TABLA XXVI.- MEDIAS DE TRES REPETICIONES QUE MUESTRAN EL EFECTO DEL MMS DISUELTO EN AMORTIGUADORES A DIFERENTES VALORES DE pH SOBRE LA LONGITUD DE LOS COLEOPTILOS DE SEMILLAS DE CEBADA VAR. HIMALAYA TRATADAS A 10°C.

Dosis de MMS % p/vol/hora \ pH	H ₂ O	3.0	7.0	11.5
0.0	65.18	64.43	66.75	65.36
0.3	61.46	61.11	63.78	62.20
0.5	55.16	57.08	56.21	57.86

TABLA XXVII.- ANALISIS DE LA VARIANZA PARA EVALUAR EL EFECTO DEL MMS EN DIFERENTES - -
 AMORTIGUADORES DE FOSFATO SOBRE LA LONGITUD DEL COLEOPTILO DE SEMILLAS - -
 DE CEBADA TRATADAS A 10°C.

FUENTE DE VARIACION	SC	GL	CM	F exp.
Concentración de MMS	159.34	2	79.67	91.57*
pH.	5.21	3	1.73	1.98
Error	5.56	6	0.87	
Total	170.11	11		

* Significativo al 0.01%.

111

TABLA XXVIII.- MEDIAS DE TRES REPETICIONES QUE MUESTRAN EL EFECTO DEL MMS DISUELTO EN -- AMORTIGUADORES DE FOSFATO A DIFERENTES PH SOBRE LA LONGITUD DE COLEOPTILOS DE SEMILLAS DE CEBADA TRATADAS A 20°C.

Concentración de MMS % p/Vol/hora	PH de la solución			
	H ₂ O	3.0	7.0	11.5
0	65.62	68.12	68.08	67.84
0.3	49.23	44.40	44.68	48.76
0.5	31.72	36.16	31.78	33.64

TABLA XXIX.- ANALISIS DE LA VARIANZA PARA DETERMINAR EL EFECTO DEL MMS DISUELTO EN --
 AMORTIGUADORES DE FOSFATO SOBRE COLEOPTILOS DE SEMILLAS DE CEBADA VAR. -
 HIMALAYA TRATADAS A 20°C.

FV	SC	GL	CM	F
Concentración de MMS	2358.85	2	1179.42	226.81*
pH	6.16	3	2.05	0.39
Error	31.23	6	5.20	

Total

2396.24

11

* Significativo al 0.01%

TABLA XXX.- MEDIAS DE TRES REPETICIONES QUE MUESTRAN EL EFECTO DEL MMS DISUELTO EN AMORTIGUADORES DE FOSFATO A DIFERENTES pH SOBRE PLANTULAS DE SEMILLAS DE CEBADA TRATADAS A 10°C.

Concen- tración MMS % p/vol /hora	PH de la solución			
	H ₂ O	3.0	7.0	11.5
0	209.92	211.46	210.66	210.76
0.3	196.44	199.73	195.00	197.36
0.5	179.78	170.15	182.94	174.38

117

TABLA XXXI.- ANALISIS DE LA VARIANZA PARA EVALUAR EL EFECTO DEL MMS EN DIFERENTES - -
 AMORTIGUADORES DE FOSFATO SOBRE LA LONGITUD FINAL DE PLANTULA DE SEMILLAS
 DE CEBADA TRATADAS A 10 °C.

FUENTE DE VARIACION	SC	GL	CM	F exp.
Concentración MMS	2327.13	2	1163.56	70.86*
PH	11.13	3	3.71	0.225
Error	98.52	6	16.42	
Total	2436.78	11		

* Diferencia significativa al 0.01%.

TABLA XXXII.- MEDIAS DE TRES REPETICIONES QUE MUESTRAN EL EFECTO DEL MMS DISUELTO EN AMORTIGUADORES A DIFERENTES pH SOBRE PLANTULAS DE SEMILLAS DE CEBADA - TRATADAS A 20°C.

MMS \ PH	H ₂ O	3.0	7.0	11.5
0	194.38	210.87	205.44	204.3
0.3	136.94	122.51	132.92	123.07
0.5	89.74	99.12	88.9	97.21

TABLA XXXIII.- ANALISIS DE LA VARIANZA PARA DETERMINAR EL EFECTO SOBRE LA LONGITUD DE LAS PLANTULAS DE CEBADA TRATADAS CON MMS A DIFERENTES CONCENTRACIONES Y DISUELTAS EN AMORTIGUADORES DE FOSFATO A 20 °C.

FUENTES DE VARIACION	SC	GL	CM	F exp
Concentración MMS	25256.53	2	12628.26	213.74*
PH	23.25	3	7.75	0.13
Error	354.50	6	59.08	

Total 25634.28

* Diferencia significativa al 0.01%

TABLA XXXIV.- MEDIAS DE TRES REPETICIONES QUE MUESTRAN EL EFECTO DEL MMS DISUELTO EN --
 AMORTIGUADORES DE FOSFATO A DIFERENTES pHs Y TEMPERATURAS SOBRE LA LONGI-
 TUD DE LOS COLEOPTILOS DE SEMILLAS DE CEBADA VAR. HIMALAYA.

Temperatura Dosis MMS PH % p/vol/h.	10 °C			20 °C		
	0.0	0.3	0.5	0.0	0.3	0.5
H ₂ O	65.30	59.78	53.48	65.26	45.85	28.44
	65.07	63.14	56.84	64.67	46.50	32.67
	73.88	71.90	63.76	66.94	54.60	34.06
3.0	63.66	58.54	48.13	66.32	41.08	30.26
	65.20	63.67	57.72	70.42	47.72	31.78
	69.92	67.67	58.44	67.62	45.92	30.32
7.0	67.76	62.19	54.05	69.58	46.87	37.69
	66.57	64.08	58.38	66.96	43.66	28.42
	65.64	65.90	60.88	70.72	43.52	34.64
11.5	63.96	60.50	57.20	68.94	45.18	34.32
	66.76	66.32	60.52	69.48	43.02	35.68
	70.51	63.82	53.80	65.10	48.08	30.94

TABLA XXXV.- ANALISIS DE LA VARIANZA FACTORIAL 2x3x4 PARA DETERMINAR EL EFECTO SOBRE LOS COLEOPTILOS DE SEMILLAS DE CEBADA VAR. HIMALAYA TRATADAS CON NMS DISUELTAS EN AMORTIGUADORES DE FOSFATO A DIFERENTES VALORES DE pH Y TEMPERATURAS.

FV	GL	SC	CM	F
Temp.	1	3497.13	3497.13	278.21*
pH	3	24.87	8.29	0.66
Concentración	2	6178.24	3089.12	245.75*
I temp x pH	3	5.71	1.90	0.15
I temp x concentración	2	2043.03	1021.51	81.26*
I pH x concentración	6	41.48	6.91	0.55
I temp x pH x concen tración	6	31.84	5.30	0.42
Error	48	603.44	12.57	

TOTAL 71 12425.74

* Altamente significativos.

TABLA XXXVI.- MEDIDAS DE TRES REPETICIONES QUE MUESTRAN EL EFECTO DEL MMS DISUELTO EN AMORTIGUADORES DE FOSFATOS A DIFERENTES pH Y TEMPERATURAS SOBRE LA LONGITUD DE LAS PLANTULAS DE SEMILLAS DE CEBADA VAR. HIMALAYA.

pH	Temperatura	10 °C			20 °C		
	MMS Concentr. % p/vol	0.0	0.3	0.5	0.0	0.3	0.5
H ₂ O		206.20	193.28	185.93	197.04	132.91	85.77
		215.00	200.30	173.64	188.50	137.68	93.72
		208.58	195.74	174.23	197.62	140.24	90.26
3.0		210.20	191.82	164.10	296.58	124.43	83.56
		210.96	199.16	176.20	215.52	120.59	97.12
		213.26	193.22	170.86	210.52	138.51	101.12
7.0		206.11	191.55	173.24	207.00	127.28	92.58
		221.49	195.20	182.32	203.89	138.56	85.22
		204.40	197.40	183.56	204.12	131.46	90.85
11.5		203.48	191.84	168.00	198.56	122.58	92.84
		216.62	202.89	174.90	209.50	123.56	101.58
		212.18	197.36	180.25	204.84	127.04	96.21

TABLA XXXVII.- ANALISIS DE VARIANZA FACTORIAL 2x3x4 PARA DETERMINAR EL EFECTO SOBRE LA LONGITUD DE LAS PLANTULAS DE SEMILLAS DE CEBADA VAR. HIMALAYA TRATADAS CON MMS DISUELTO EN AMORTIGUADORES DE POSFATOS A DIFERENTES pH Y TEMPERATURAS.

FUENTE DE VARIACION	GL	SC	CM	F
TEMP.	1	48 366.10	48 366.10	1 584.24*
pH	3	11.00	3.66	0.12
DOSIS	2	65 007.25	32 503.62	1 064.64*
I temp x pH	3	99.80	33.26	1.08
I temp x Dosis	2	18 971.45	9 485.72	310.70*
I pH x Dosis	6	405.95	67.65	2.21
I T x pH x D	6	454.35	75.72	2.48* (1)
ERROR	48	1 465.90	30.53	

TOTAL 71 134 781.80

* Significativos al 0.05%

(1) No significativos al 0.01%

124

TABLA XXXVIII.- ANALISIS DE VARIANZA PARA DETERMINAR EL EFECTO SOBRE LA LONGITUD DE --
 COLEOPTILOS DE SEMILLAS DE CEBADA VAR. COMUN TRATADAS CON MMS Y POSTRA
 TADAS CON L-CISTEINA. 0.01 M.

FUENTE DE VARIACION	SC	GL	CM	F
Postratamiento con L-Cisteina	4.30	1	4.30	1.66
Dosis MMS	1402.90	3	467.63	181.25*
Error	7.74	3	2.58	

Total 1414.94 7

* Altamente significativo.

125

TABLA XXXIX.- ANALISIS DE VARIANZA PARA DETERMINAR EL EFECTO SOBRE LA LONGITUD DE LAS --
 PLANTULAS DE SEMILLAS DE CEBADA VAR. COMUN TRATADAS CON MMS Y POSTRATADAS
 CON L-CISTEINA 0.01 M.

FUENTE DE VARIACION	SC	GL	CM	F
Postratamiento con L-cisteina	19.18	1	19.18	0.627
Dosis MMS.	30893.55	3	10297.85	
Error.	91.78	3	30.59	336.64*

TOTAL 31004.51 7

* Altamente significativa.

TABLA XL.- CRECIMIENTO Y PORCENTAJE DE DAÑO DE COLEOPTILOS Y PLANTULAS DE SEMILLAS DE CEBADA (HORDEUM VULGARE VAR. COMUN) TRATADAS CON MMS Y POSTRATADAS CON L-CISTEINA 0.01 M.

MMS Dosis %/1Hora	POST. TRATAMIENTO 1 HORA	LONGITUD DEL COLEOPTILO % de daño con referencia al testigo.			LONGITUD DE LA PLANTULA % daño con referencia al testigo.		
		Xmm. ±	E.E.		Xmm ±	E.E.	
0.0	H ₂ O	53.98	0.10	---	201.20 ±	1.96	---
0.0	L-Cisteina	54.52	0.10	---	195.30 ±	2.41	---
0.2	H ₂ O	29.75	0.04	44.88	152.95 ±	1.56	23.98
0.2	L-Cisteina	29.80	0.05	44.79	153.00 ±	1.33	23.95
0.5	H ₂ O	20.84	0.04	61.39	60.80 ±	0.69	69.78
0.5	L-Cisteina	21.26	0.06	60.61	66.70*±	0.76	66.84
0.7	H ₂ O	20.54	0.06	61.94	42.12 ±	1.19	79.06
0.7	L-Cisteina	25.40*	0.03	52.94	54.46*±	1.09	72.93

* Significativa al 0.05% de acuerdo a la prueba de z.

TABLA XLI.- VALORES DE LA TRANSFORMACION ARCO CUYO SENO ES LA RAIZ CUADRADA DE LA PROPORCION DE GERMINACION DE SEMILLAS DE TRITICALE HEXAPLOIDE IART VAR; BACUM TRATADAS CON DIFERENTES DOSIS DE MMS:

CONCENTR. MMS. Rep.	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
I	65.88	71.56	68.61	65.88	71.56	43.11
II	71.56	58.89	65.88	58.89	56.79	33.21
III	54.76	54.76	48.85	46.89	58.89	26.56
IV	68.61	68.61	63.44	56.79	63.44	39.23

TABLA XLIII.- ANALISIS DE VARIANZA PARA DETERMINAR EL EFECTO DEL MMS SOBRE LA GERMINACION DE SEMILLAS DE TRITICALE HEXAPLOIDE LART VAR. BACUM.

FUENTE DE VARIACION	SC	GL	CM	F
REPETICION	817.46	3	272.48	17.31*
TRATAMIENTO	2487.82	5	497.58	31.61*
ERROR	236.15	15	15.74	
TOTAL	3541.53	23		

* Significativo al 0.01%

129

TABLA XLIII.- PRUEBA DE RANGO MULTIPLE DE DUNCAN* PARA MEDIAS DE GERMINACION** EN LA GENERACION M₁ DE SEMILLAS DE TRITICALE HEXAPLOIDE LART VÁR. BACUM -- TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NMS.

DOSIS	\bar{X}	$S_{\bar{X}}$
0.0	65.20	1.98
0.1	63.45	
0.4	62.67	
0.2	61.69	
0.3	57.11	
0.5	35.52	

* 5% de significatividad.

** Germinación en valores angulares (Arco-seno)

TABLA XLIV.- LONGITUD (EN CMS.) DE PLANTAS M₁ DE TRITICALE HEXAPLOIDE LART VAR. BACUM TRATADAS CON MMS:

Rep. \ MMS Dosis	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
I	66.30	64.20	67.90	71.00	66.50	66.62
II	78.8	82.40	68.60	66.62	79.25	80.57
III	86.7	83.20	85.90	91.25	72.20	88.00
IV	83.30	89.0	83.60	94.20	93.0	99.62

TABLA XLV.- ANALISIS DE VARIANZA DE LA LONGITUD DE PLANTAS M₁ DE TRITICALE HEXAPLOIDE LART VAR. BACUM TRATADAS CON MMS.

FUENTE DE VARIACION	SC	GL	CM	F
REPETICION	1868.70	3	622.9	17.20*
TRATAMIENTO	127.72	5	25.54	0.70
ERROR	543.13	15	36.20	
TOTALES	2439.55	23		

* Significativo al 0.01%

139

TABLA XLVI.- PESO (EN GRAMOS) DE GRANOS DE PLANTAS M, DE TRITICALE HEXAPLOIDE LART VAR. BACUM TRATADAS CON MMS:

Repetición	DOSIS MMS % p/vol /hora					
	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
I	8.36	7.71	8.34	7.73	7.79	5.50
II	13.86	12.21	10.65	8.51	12.78	10.48
III	16.16	15.72	13.57	15.96	8.24	11.7

TABLA XLVII.- ANALISIS DE VARIANZA DEL PESO DE GRANOS DE PLANTAS M. DE TRITICALE
 HEXAPLOIDE LART VAR. BACUM TRATADAS CON MMS.

FUENTE DE VARIACION	SC	GL	CM	F
Repeticiones	111.06	2	55.53	12.12*
Tratamiento	27.43	5	5.48	1.19
Error	45.84	10	4.58	
Total	184.33	17		

+ Significativo al 0.01%

TABLA XLVIII.- NUMERO DE HIJUELOS DE PLANTAS M_1 DE TRITICALE HEXAPLOIDE LART VAR. BAÇUM TRATADAS CON MMS.

Dosis MMS Rep.	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
I	16.30	17.40	16.20	14.5	16.4	16.12
II	10.30	10.70	12.20	14.50	12.5	12.0
III	11.80	12.80	11.30	9.40	12.4	8.00
IV	16.6	11.50	13.60	11.40	15.7	13.60

TABLA XLIX.- ANALISIS DE LA VARIANZA PARA EL NUMERO DE HIJUELOS DE PLANTAS M, DE TRITICALE HEXAPOIDE L. VAR. BACUM TRATADAS CON MMS.

FUENTE DE VARIACION	SC	GL	CM	F
Repeticiones	92.56	3	30.85	10.23*
Tratamientos	10.32	5	2.064	0.68
Error	45.21	15	3.014	
Total	148.09	23		

* Significativo al 0.01%.

TABLA L.- CARACTERISTICAS DE LOS PROBABLES MUTANTES PARA -
 ENENISMO AISLADOS DE LA POBLACION M. DE SEMILLAS
 DE TRITICALE HEXAPLOIDE LART VAR BACUM TRATADAS
 CON MMS.

MUTANTE	DOSIS DE MMS % p/vol /hora/20°C	ALTURA (cms)	MADUREZ *	NUMERO DE HIJUELOS	PESO/ GRANO
1	0.1	67	MP	6	8.0
2	0.1	70	T	4	2.0
3	0.2	60	T	3	0.5
4	0.2	65	N	12	2.5
5	0.2	75	P	28	15.0
6	0.3	60	P	18	11.0
7	0.3	60	P	16	8.0
8	0.4	55	N	12	1.5
9	0.4	60	P	6	34.5
10	0.4	60	P	9	5.5
11	0.4	70	N	1	24.5
12	0.4	70	N	5	2.0
13	0.4	75	MP	3	3.0
14	0.4	75	N	21	4.0
15	0.4	75	N	10	14.0
16	0.5	60	N	17	7.0
17	0.5	65	T	3	22.0
18	0.5	75	N	2	2.0
19	0.5	75	N	13	9.5
20	0.5	75	N	5	4.0
21	0.5	75	N	3	1.0

* MP = Muy precoz

P = precoz

N = Normal

T = Tardío