

27. 183

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA



EFFECTO DEL METIL METANOSULFONATO Y
ETIL METANOSULFONATO EN CEBADA DE TALLO
RAMIFICADO (HORDEUM VULGARE)

ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

T E S I S
P R E S E N T A D A
P A R A O P T A R P O R E L T I T U L O D E :
B I O L O G O

México, D. F.

1981



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

C O N T E N I D O.

R E S U M E N

I N T R O D U C C I O N I

O B J E T I V O S 7

M A T E R I A L E S Y

M E T O D O S 8

R E S U L T A D O S 11

D I S C U S I O N 34

C O N C L U S I O N E S 38

R E F E R E N C I A S 39

RESUMEN.

La cebada de tallo ramificado es un mutante que resultó de las cruces de diferentes variedades de cebada. Esta planta presenta características agronómicas que la hacen tener interés, sin embargo presenta algunas inconveniencias tales como el contenido de reservas del grano, ya que es muy pequeño. En base a esta característica, el presente trabajo de investigación se llevó a cabo utilizando sustancias mutagénicas altamente eficientes, como sea el Metil Metanosulfonato (MMS)- y Etil Metanosulfonato (EMS) a diferentes concentraciones y 10°C de temperatura en el tratamiento. Se utilizó cebada de tallo ramificado con el objeto de provocar una mutación en ésta, que resolviera el problema de las reservas del grano y aumentar su tamaño. En la generación M_1 se tomaron datos de germinación, número de tallos y número de ramificaciones. Se encontró que el efecto fisiológico en M_1 de los mutágenos sobre las semillas tratadas no fué severo. Tomando en cuenta que la mayoría de las mutaciones son recesivas y solo se manifiestan en la M_2 , una vez que se obtuvieron las semillas procedentes de la M_1 se sembraron directamente en el campo. En la generación M_2 se observaron las alteraciones producidas por las sustancias mutagénicas y se seleccionaron aquellos caracteres que resultaran favorables al objetivo planteado en este trabajo. Los cuales fueron: el peso de grano expresado en gramos, el número de tallos, número de ramificaciones y por último, el número de espigas por tallo. De cada uno de éstos caracteres se aislaron varios mutantes.

INTRODUCCION.

La mutación ha sido considerada como la capacidad del material genético para sufrir cambios que se hagan permanentes y hereditarios en la célula, siempre y cuando éstos no sean debidos a segregación o a recombinación.

Sigurbjörnsen (22) menciona que éstos cambios químicos alteran la estructura del cromosoma de las células o la constitución molecular del material hereditario provocando diferencias en la estructura y función de los descendientes que pueden o no expresarse fenotípicamente. Además, Sigurbjörnsen (22) considera a la mutación desde el punto de vista evolutivo como el origen de la variabilidad genética que ocurre espontáneamente en los organismos. A menudo ésta mutación es dañina y los cambios desaparecen por la selección natural, otras veces es beneficiosa incrementando la capacidad de supervivencia y reproducción de los seres vivos.

Dobzhansky (4) propone varios tipos de mutaciones que pueden describirse y clasificarse de acuerdo a las partes de la célula donde se localizan. Estas pueden ser cambios en los genes, cambios cromosómicos estructurales, cambios debidos a una alteración en la agrupación de genes o a cambios numéricos que afectan al número de cromosomas. Estas mutaciones pueden ser dominantes o recesivas, pero éstas últimas son las mas frecuentes.

La evidencia experimental ha demostrado que los genes en los que se producen pequeñas variaciones son mas frecuentes que en los que se producen grandes cambios ya que los primeros tienen menor efecto en la alteración del equilibrio genético de una especie que aquellas mutaciones que son mas drásticas, Dobzhansky (4).

El efecto acumulativo de variaciones pequeñas han hecho que las mutaciones hayan constituido un factor importante en los cambios evolutivos que las especies han sufrido. Muchas variedades importantes de plantas han tenido su origen en mutaciones espontáneas que aparecieron como mutaciones sobresalientes en variedades conocidas y cultivadas ampliamente.

La frecuencia de mutaciones espontáneas es baja, Sigurbjörnsson (22) pero esta frecuencia puede incrementarse experimentalmente, así en 1927, Muller trabajando con Drosophila logró un notable incremento en la frecuencia de mutaciones después de irradiar las moscas con rayos X, y en 1928, Stadler describió que éste fenómeno podría generalizarse a las plantas, ya que obtuvo también incremento en la frecuencia de mutantes en semillas de maíz y cebada tratadas con rayos X, Rubino (21).

Existe una gran variedad de mutágenos físicos y químicos. Después del descubrimiento de Muller en 1927 se han realizado numerosos trabajos con distintos tipos de radiaciones, los cuales tienen efectos mutagénicos de mucha importancia, Briggs y Constantia (3).

Los mutágenos químicos, Heslot (7) han sido utilizados con más frecuencia en muchas investigaciones y el número de éstos ha sido constantemente incrementado.

Heslot (7) ha clasificado a los mutágenos químicos en los siguientes grupos: Análogos de Base, Antibióticos, Agentes Alquilantes, además de considerar el Azido, Hidroxilaminas, Acido Nitroso y Aoridinas como sustancias altamente mutagénicas.

El primer grupo formado por los Análogos de Base pueden ser incorporados por el DNA sin impedir su replicación. Sin embargo ciertas sustancias son diferentes a las bases y pueden aparecerse erró -

ocamente. Entre estos tipos de mutágenos se pueden citar al 5-bromo-uracil (BU), 5-bromo-deoxiuridina (BudR) y 2-amino-purina (AP).

Los antibióticos que forman el segundo grupo se han investigado muy poco, los mas trabajados son compuestos parecidos a la Azaserina, Mitomicina C, Estreptenigrina y Actinomicina D, que tienen la propiedad de romper cromosomas.

El tercer grupo lo forman los Agentes Alquilantes, este es el grupo mas importante de los mutágenos químicos por ser mas reactivos y eficientes, (Ehrenberg, 5), estas substancias reaccionan con el DNA alquilando las bases nitrogenadas del mismo. Entre estas substancias se tiene al Sulfuro de Mostaza, Nitrógeno de Mostaza, Epóxidos, Etilenamias, Diazoalcanos y Compuestos de Nitrógeno. Dependiendo del número de grupos funcionales que tengan estas substancias será la toxicidad con la que actúen, siendo ésta mayor cuando el número de grupos funcionales se incrementa, Henlet (7).

Estos agentes tienen propiedades reactivas sobre los centros nucleofílicos, Wheeler (26) y pueden ser mono o polifuncionales (cada molécula del agente puede combinarse con una del centro nucleofílico o varias en el caso de los polifuncionales).

Las actividades mutagénicas o carcinogénicas ocurren en el DNA, que es un sitio importante de alquilación, lo cual es muy evidente - in vitro y in vivo, esto ocurre principalmente en el N₇ de la guanina produciéndose una labilización en el enlace glucosídico entre la base y el azúcar. De esta manera durante la replicación del DNA hay incorporaciones en las diferentes bases resultando una alteración en el código.

Se ha reportado que ocurre aproximadamente una alquilación en 3500 unidades de desoxirribosa, Wheeler (26) aunque menos alquilación es requerida para la citotoxicidad que pueda destruir o trans-

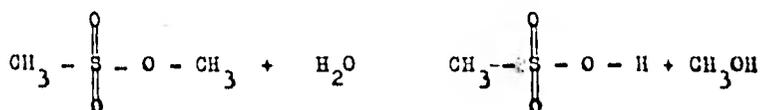
formar la actividad celular (el nivel de alquilación es aproximadamente de 1×10^{-6} de mol). La toxicidad de los agentes alquilantes, según cita Wheeler (26) puede interferir en algunas áreas metabólicas de la célula inhibiendo la glicólisis e respiración, disminuyendo la generación de energía, además afectando las fases del ciclo celular formando células alargadas, lo cual indica una alteración en la síntesis del DNA, RNA y proteínas de la célula. Se ha observado que este aumento es de 3 a 10 veces más que el contenido normal.

El Metil Metanesulfonato (MMS) y el Etil Metanesulfonato (EMS), Arnason y Minecha (1), son mutágenos altamente eficientes que pertenecen al grupo de los agentes alquilantes. Alexander, Letty y Perkins (citados por Minecha, 3 y Kamra, 8) consideran a los agentes etilantes más mutagénicos que los metilantes, debido a que estos últimos son más tóxicos usados a altas dosis en comparación con los primeros. Estas sustancias que pertenecen a los alquilalcanesulfonatos han sido objeto de una serie de estudios para considerar su eficiencia mutagénica en una gran cantidad de organismos, incluyendo a las plantas superiores, Arnason y Minecha (1).

El MMS es más efectivo a bajas concentraciones que el EMS, Arnason y Minecha (1). Desde el punto de vista químico la principal limitante en el uso de los alquilalcanesulfonatos en relación al mejoramiento genómico es su alta toxicidad, la cual tiene 2 vías de acción:

- a) La formación del ácido sulfónico debido al proceso de hidrólisis - el cual es muy tóxico para el material biológico tratado, Wickham y col (27).

En el caso del MMS los productos de reacción de hidrólisis son el ácido metil sulfónico y metanol; en tanto que para el EMS se presenta también el ácido sulfónico y etanol.



MMS

+ AGUA

ACIDO METIL SULFONICO

+

ALCOHOL

b) La segunda vía de acción es la alquilación de las proteínas que conduce a la inactivación de enzimas y consecuentemente a la muerte del material biológico tratado, Osterman y col. (16).

Kenzak y col. (9), Blizt, (2) y Nilas (14), indican que la temperatura influye en la degradación de los mutágenos químicos mientras que la difusión es poco afectada por ésta y la hidrólisis disminuye a bajas temperaturas, por otra parte el mutágeno se estabiliza por un mayor tiempo asegurando su reactividad en los centros nucleofílicos (blanco). Este es particularmente importante en aquellos mutágenos que actúan por un mecanismo SN_2 tales como el MMS.

Una diferencia importante entre el MMS y el EMS es el mecanismo de reacción, ya que el primero es un SN_2 y el segundo reacciona por una mezcla $\text{SN}_1 / \text{SN}_2$, la diferencia fundamental entre estos dos tipos de mecanismos está en que en el SN_1 se tiene que formar necesariamente el ión carbénico, es decir debe de haber reacción de hidrólisis en tanto que en el SN_2 éste paso de formación del ión carbénico no es necesario y reacciona la molécula del alquilante completa sobre el centro nucleofílico formándose un producto intermedio inestable, Rubius (20).

Kenzak y Favret (10), Nilan y Vig (15) indican que la cebada se ha utilizado como moniter en la inducción de mutaciones debido a que tiene pocos cromosomas relativamente grandes ($2n=14$). Se ha demostrado que por medio de mutaciones, Sigurbjörnsen (23) se ha contribuido al mejoramiento genético y agronómico de una amplia variedad de plantas de interés acenómico.

La cebada de tallo ramificado, que fué usada particularmente en este trabajo es un mutante que se aisló de las cruizas de cebada siguientes, en 1969:

As54 - Tra X Cer² - Tel. I⁴ / Avt² - K1 / B_Z Vt / Pro

identificada con el siguiente número : XV-2780, Riejas (19). Esta planta presenta características diferentes a las plantas normales, como por ejemplo tallos de 17-23 entrenudos en la primera inflorescencia, gran número de hojas delgadas que miden de 5 a 7 mm. de ancho en la parte central de la hoja y de 4 a 17 cm. de largo. Los entrenudos van disminuyendo de tamaño a medida que se acercan a la base de la primera espiga que generalmente es de mayor tamaño. Todas las espigas producen granos normales capaces de germinar. En las plantas originales se llegaron a contar hasta 50 tallos principales con 80 a 100 ramificaciones. En virtud del gran número de tallos independientemente de sus ramificaciones, a este tipo de cebada se le considera deseable para el ganadero desde el punto de vista forrajero, para la alimentación humana no ha sido utilizada todavía ya que el contenido de reservas del grano es muy pobre debido a que éste es muy pequeño.

OBJETIVOS.

En el presente trabajo se pretende conocer la respuesta de la cebada de tallo ramificado (Hordeum vulgare) ante dosis diferentes de los mutágenos MMS y EMS, para evaluar la capacidad de inducción de mutaciones de estas sustancias bajo ciertas condiciones experimentales. Se intentó asimismo establecer un mecanismo protector contra la toxicidad de los mutágenos aplicando los tratamientos a baja temperatura (10°C).

En la primer etapa se evaluó la generación M_1 en la cual se consideró la germinación, el número de tallos y número de ramificaciones para determinar los efectos fisiológicos de los mutágenos en el invernadero.

En la segunda etapa se evaluó el efecto genético de los mutágenos para lo cual se seleccionaron los mutantes de interés - bajo condiciones de campo, asimismo se analizó la germinación, número de tallos, número de ramificaciones al igual que en la M_1 y - el peso del grano por planta.

MATERIALES Y METODOS.

Se seleccionaron visualmente 150 semillas de caudata de tallo ramificado (Hordeum vulgare), escogiéndose aquellas que tuvieran el mayor tamaño y el embrión exento de daños físicos para hacer una prueba de germinación en un cuarte con temperatura constante con el fin de conocer el porcentaje de semillas viables. Posteriormente se seleccionaron con la misma técnica lotes de 20 semillas para cada tratamiento y 4 repeticiones, las cuales se lavaron durante 2 horas en agua corriente para homogeneizar su estado metabólico, barrer inhibidores de germinación y amortiguar la entrada del mutágeno según el sistema propuesto por Meneses y Rubiue (12), que consiste en estandarizar las condiciones de lavado. Posteriormente las semillas se sometieron a tratamientos durante 1 hora a las concentraciones de 0.0 (testigo), 0.2, 0.4 y 0.6 / % / P / Vol. / Hora de MMS y EMS a 10°C. Las soluciones mutagénicas fueron preparadas poco antes de utilizarse, con agua desionizada y desmineralizada. Al terminar el tiempo de tratamiento las semillas fueron lavadas durante 5 minutos en agua corriente para eliminar el exceso del mutágeno y se colocaron en cajas de petri con algodón húmedo. Inmediatamente se llevaron al invernadero para ser sembradas en vasos de cartón (una semilla por vaso) y con tierra esterilizada con Bromuro de Metilo antes de la siembra. Los experimentos se efectuaron bajo un diseño de bloques al azar con 4 bloques y 7 tratamientos cuyo modelo estadístico es :

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \epsilon_{ij} ; \text{ en donde } Y_{ij} = \text{variable considerada} -$$

(porcentaje de germinación, número de tallos, número de ramificaciones, peso del grano), μ = media general, τ_i = efecto del tratamiento, β_j = efecto del bloque, ϵ_{ij} = error experimental, i = tratamiento (0.2, 0.4 y 0.6 de MMS y 0.2, 0.4 y 0.6 de EMS) y j = bloques o repeticiones (4).

Después de 3 semanas de haberse realizado la siembra se obtuvieron los porcentajes de germinación transformándolos a valores angulares-arco-seno para normalizar los valores. Posteriormente las plántulas fueron transplantadas a cubetas de 10 litros de capacidad (una planta por cubeta) y se les adicionó fertilizante con fórmula 60-40-0 kg./ Ha. (60 Kg. de Nitrógeno - 40 Kg. de Fósforo). Se hizo la conversión correspondiente y se adicionó a cada maceta 3.57 grs. de Nitrato de Amonio y 1.74 grs. de Superfosfato de Calcio disueltos en agua en los cuales se encontraban los elementos antes citados. Todo esto con el fin de que tuvieran las plantas un mejor desarrollo ya que la tierra usada no había sido fertilizada anteriormente. Las macetas se sacaron del invernadero a un lugar donde recibieran suficiente luz con el fin de que se desarrollaran los tallos hijos característicos de este tipo de cebada (amacollamiento). Después de 4 semanas de haberse sacado del invernadero se volvieron a colocar por orden en el mismo (respetando la distribución al azar que se había hecho con los tratamientos y bloques al iniciarse la siembra).

Una vez obtenidos los valores de arco-seno para la germinación se aplicó un análisis de varianzas (ANVA) para determinar el efecto de los tratamientos, posteriormente se aplicó una prueba de rango múltiple de Duncan para contraste de medias. Los mismos procedimientos estadísticos se llevaron a cabo para el número de tallos y para el número de ramificaciones de las plantas, pero éstos valores no fueron transformados a valores de arco-seno sino que se manejaron directamente. La segunda etapa del experimento se llevó a cabo en el campo una vez que se obtuvieron las semillas (M_1) resultantes de la siembra hecha en el invernadero. Se distribuyeron las semillas en bloques al azar para los distintos tratamientos. Se sembraron 20 semillas por tratamiento (10 en cada surco) con 4 repeticiones -

cada uno y a una distancia de 10 y 30 cm. entre surco además se sembraron las semillas provenientes de los tratamientos en donde las plantas resultaron con características normales. Se obtuvieron al igual que en la primera etapa, el porcentaje de germinación, número de tallos, ramificaciones y rendimiento por planta aplicando los mismos procedimientos estadísticos para establecer diferencias entre los tratamientos de la M_2 . Previamente se seleccionaron visualmente los mutantes de interés agronómico que se pensó pudieran ser favorables, así como aquellas plantas que mostraron diferencias significativas en cuanto al peso de grano.

RESULTADOS.

TABLA I.- VALORES DIRECTOS DEL PORCENTAJE DE GERMINACION EN LA GERMINACION M_1 DE SEMILLAS DE CEBADA DE TALLO RAMIFICADO (Hordeum vulgare) TRATADAS A 10°C CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE KMS Y EMS.

Rep.	nutrógeno % P/V hra.	KMS			EMS			
		0.0	0.2	0.4	0.6	0.2	0.4	0.6
I		35%	50%	40%	25%	70%	40%	35%
II		50%	45%	35%	10%	40%	40%	55%
III		40%	45%	40%	25%	40%	60%	30%
IV		20%	55%	25%	35%	65%	50%	55%

* tratamiento P/Vol.

TABLA II.- VALORES ANGULARES (ARCO-SENO) DEL PORCENTAJE DE GERMINACION EN LA GENERACION M_1 DE SEMILLAS DE CEBADA DE TALLO - RAMIFICADO (Hordeum vulgare) TRATADAS A $10^{\circ}C$ CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE KMS Y EMS.

mutágeno % P / Vol. Rep. Hra.	0.0	KMS 0.2	KMS 0.4	KMS 0.6	EMS 0.2	EMS 0.4	EMS 0.6
I	36.27	45	39.23	30	56.79	39.23	36.27
II	45	42.13	36.27	18.44	39.23	39.23	47.87
III	39.23	42.13	39.23	30	39.23	50.77	33.21
IV	26.56	47.87	30	36.27	53.73	45	47.87

TABLA III.- CUADRO DE ANALISIS DE VARIANZA (ANVA) PARA VALORES DE GERMINACION EN LA GENERACION H_1 TRANSFORMADOS A VALORES ANGULARES DE ARCO-SENO EN SEMILLAS DE CEBADA DE TALLO - RAMIFICADO (Hordeum vulgare) TRATADAS A 10°C CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ICS Y IES.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F EXP.
REPETICIONES	3	31.957	10.6523	0.207
TRATAMIENTOS	6	951.45	158.575	3.09*
ERROR	18	922.01	51.222	
TOTAL	27	1905.417		

* SIGNIFICATIVO AL 5% DE PROBABILIDAD

TABLA IV.- PRUEBA DE RANGO MULTIPLE DE DUNCAN ⁺ PARA MEDIAS DE GERMINACION⁺⁺ EN LA GENERACION H_1 DE SEMILLAS DE CEBADA DE TALLO - RAMIFICADO (*Hordeum vulgare*) TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE KMS Y EMS A 10°C.

DOSIS	\bar{x}	S \bar{x}
0.6 KMS	28.67	3.57
0.4 KMS	36.18	
0.0 TEST.	36.76	
0.6 EMS	41.30	
0.4 EMS	43.55	
0.2 KMS	44.28	
0.2 EMS	47.24	

+ SIGNIFICATIVO AL 5% DE PROBABILIDAD

++ GERMINACION EN VALORES ANGULARES (ARCO-SENO)

TABLA V.- MEDIAS DE 4 REPETICIONES PARA NUMERO DE TALLOS EN LA GENERACION H_1 EN CEBADA DE TALLO RAMIFICADO (*Hordeum vulgare*)-TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MMS Y EMS A $10^{\circ}C$.

mutágeno Rep 1 P/Vol. Hra.	0.0	MMS 0.2	MMS 0.4	MMS 0.6	EMS 0.2	EMS 0.4	EMS 0.6
I	10.33	9.22	11.5	10.4	11.28	11.12	9.14
II	8.33	10.11	10	7.5	9.62	8.25	9.45
III	9.71	10.22	8.37	6.6	11.87	9.25	8.66
IV	8	11.18	7.4	5.57	9.46	10.2	10.45

TABLA VI.--. CUADRO DE ANALISIS DE VARIANZA (ANVA) PARA NUMERO DE -
 TALLOS EN LA GENERACION H_1 DE PLANTAS DE CEBADA DE TALLO-
 RAMIFICADO (Hordeum vulgare) TRATADAS A 10°C CON DIS -
 TINTAS CONCENTRACIONES DE NMS Y EMS.

FUENTE DE VA- RIACION	GRADOS LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F _{EXP.}
REPETICIONES	3	10.457	3.48	2.21 NS
TRATAMIENTOS	6	22.7637	3.79	2.41 NS
ERROR	18	28.4268	1.57	
TOTAL	27	61.6469		

TABLA VII.- MEDIAS DE 4 REPETICIONES PARA NUMERO DE RAMIFICACIONES EN LA GENERACION H_1 EN CEBADA DE TALLO RAMIFICADO (Hordeum vulgare) TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES - DE EMS Y EMS A $10^{\circ}C$.

mutágeno % P/Vol Rep. Hrs.	0.0	EMS 0.2	EMS 0.4	EMS 0.6	EMS 0.2	EMS 0.4	EMS 0.6
I	14	19.55	12.87	21.8	16.92	18.22	12.42
II	16.55	18	21.5	20	14.75	16.37	11.45
III	17.7	25.6	15.25	11.2	17.37	11.25	22.83
IV	24	13	9.8	14.42	12.76	13.7	6.81

TABLA VIII.- CUADRO DE ANALISIS DE VARIANZA (ANVA) PARA NUMERO DE RAMIFICACIONES EN LA GENERACION N₁ DE PLANTAS DE CEBADA DE TALLO RAMIFICADO (Hordeum vulgare) TRATADAS CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE MMS Y EMS A 10°C.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F EXP.
REPETICIONES	3	64.0374	21.3458	0.971 NS
TRATAMIENTOS	6	95.6263	15.9377	0.725 NS
ERROR	18	395.6006	21.97	
TOTAL	27	555.2643		

TABLA IX.- VALORES ANGULARES (ARCO-SENO) DEL PORCENTAJE DE GERMINACION EN LA GENERACION M_2 DE SEMILLAS DE CEBADA DE TALLO - RAMIFICADO (Hordeum vulgare) PROVENIENTES DE SEMILLAS TRATADAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MMS Y EMS A $10^{\circ}C$.

mutágeno % P/Vol/Hra Rep.	0.0	MMS 0.2	MMS 0.4	MMS 0.6	EMS 0.2	EMS 0.4	EMS 0.6
I	71.65	67.21	63.44	71.56	56.79	67.21	53.73
II	60	67.21	63.44	63.44	60.	63.44	60
III	71.56	53.73	71.56	90	45	67.21	67.21
IV	60	60	65.05	67.21	60	71.56	56.79

TABLA X.- CUADRO DE ANALISIS DE VARIANZA (ANVA) PARA VALORES DE -
GERMINACION EN M_2 TRANSFORMADOS A VALORES DE ARCO-SENO EN-
SEMILLAS DE CEBADA DE TALLO RAMIFICADO (Hordeum vulgare)
PROVENIENTES DE SEMILLAS DE CEBADA TRATADAS A $10^{\circ}C$ CON DIS-
TINTAS CONCENTRACIONES DE EMS Y EMS.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F EXP.
REPETICIONES	3	72.35	24.11	0.438 NS
TRATAMIENTOS	6	790.4	131.73	2.39 NS
ERROR	17	934.5	54.97	
TOTAL	26	1797.25		

TABLA XI.- MEDIAS DE 4 REPETICIONES PARA EL NUMERO DE TALLOS EN LA GENERACION M₂ EN CEBADA DE TALLO RAMIFICADO (Hordeum - vulgare) PROCEDENTES DE SEMILLAS TRATADAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MMS Y EMS.A 10°C.

mutágeno % P/Vol/Hra. Rep.	0.0	MMS 0.2	MMS 0.4	MMS 0.6	EMS 0.2	EMS 0.4	EMS 0.6
I	24.57	26.2	20.66	21.29	28.61	24.82	34.35
II	19.87	23.56	18.06	18.2	23.53	25.25	22.8
III	20.61	19.69	22.64	19.66	26.75	21.93	19.41
IV	23.26	22.35	21.69	21.93	27.92	27.93	24.41

TABLA XII.- CUADRO DE ANALISIS DE VARIANZA (ANVA) PARA NUMERO DE TALLOS EN LA GENERACION M_2 DE PLANTAS DE CEBADA DE TALLO RAMIFICADO (*Hordium vulgare*) PROVENIENTES DE SEMILLAS TRATADAS A 10°C CON DISTINTAS CONCENTRACIONES - DE HES Y EMS.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F EXP.
REPETICIONES	3	91.07	30.35	4.21 ⁺
TRATAMIENTOS	6	141.654	23.61	3.27 ⁺
ERROR	17	122.539	7.20	
TOTAL	26	355.273		

+ SIGNIFICATIVOS AL 5% DE PROBABILIDAD.

TABLA XIII.- PRUEBA DE RANGO MULTIPLE DE DUNCAN* PARA MEDIAS DEL NUMERO DE TALLOS EN LA GENERACION M_2 DE PLANTAS DE CEBADA DE TALLLO RAMIFICADO (Hordeum vulgare) PROVENIENTES DE SEMILLAS TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EMS Y EMS-A A $10^{\circ}C$.

DOSES	\bar{X}	$S_{\bar{X}}$
0.6 EMS	20.27	1.34
0.4 EMS	20.76	
0.0 TEST.	22.07	
0.2 EMS	22.95	
0.4 EMS	24.98	
0.6 EMS	25.24	
0.2 EMS	26.70	

* SIGNIFICATIVO AL 5% DE PROBABILIDAD

TABLA XIV.- MEDIAS DE 4 REPETICIONES PARA NUMERO DE RAMIFICACIONES EN LA GENERACION M_2 EN CEBADA DE TALLO RAMIFICADO (Hordeum vulgare) PROVENIENTE DE SEMILLAS TRATADAS A DIFERENTES - CONCENTRACIONES DE MMS Y EMS A $10^{\circ}C$.

mutágeno § P/V / Rep. Hra.	0.0	MMS 0.2	MMS 0.4	MMS 0.6	EMS 0.2	EMS 0.4	EMS 0.6
I	17.36	10	10.46	17.11	11.84	26	22.28
II	8.68	17.12	4.86	15.13	20.13	37.5	13.73
III	22.83	14.61	7.23	28.11	30.75	40.5	12.41
IV	19.66	15.92	19.03	32.87	31.38	60.12	31.16

TABLA XV.- CUADRO DE ANALISIS DE VARIANZA (ANVA) PARA NUMERO DE RAMIFICACIONES EN LA GENERACION M₂ EN CEBADA DE TALLO RAMIFICADO (Hordium vulgare) PROVENIENTE DE SEMILLAS TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NMS Y EMS A 10⁰C.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F EXP.
REPETICIONES	3	851.22	283.74	6.74 ⁺
TRATAMIENTOS	6.	2335.566	372.59	8.66 ⁺
ERROR	17	714.784	42.04	
TOTAL	26	3901.57		

+ SIGNIFICATIVO AL 5% DE PROBABILIDAD.

TABLA XVI.- PRUEBA DE RANGO MULTIPLE DE DUNCAN* PARA MEDIAS DEL NUMERO DE RAMIFICACIONES DE PLANTAS DE CEBADA DE TALLO RAMIFICADO (Hordeum vulgare) PROVENIENTES DE SEMILLAS TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EMS Y EMS A 10°C.

DOSIS	\bar{x}	S \bar{x}
0.4 EMS	10.39	3.24
0.2 EMS	14.41	
0.0 TEST.	17.13	
0.6 EMS	19.89	
0.6 EMS	23.30	
0.2 EMS	23.52	
0.4 EMS	41.03	

* SIGNIFICATIVO AL 5% DE PROBABILIDAD

TABLA XVII.- MEDIAS DE 4 REPETICIONES PARA EL PESO DEL GRANO EXPRESADO EN GRAMOS EN LA GENERACION H_2 EN CEBADA DE TALLO RAMIFICADO (Hordeum vulgare) PROVENIENTE DE SEMILLAS TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MMS Y EMS A $10^{\circ}C$.

mutágeno % P/Vol./Hra. Rep.	0.0	MMS 0.2	EMS 0.4	MMS 0.6	EMS 0.2	EMS 0.4	EMS 0.6
I	1.5	2.21	1.45	1.53	3.1	5.64	4.03
II	1.45	1.34	0.61	0.67	2.16	2.72	1.73
III	0.8	1.6	1.34	0.93	2.2	1.93	1.16
IV	0.45	0.67	1.06	1.50	4.47	3.11	1.62

ABLA XVIII.- CUADRO DE ANALISIS DE VARIANZA (ANVA) PARA EL PESO DEL GRANO EXPRESADO EN GRAMOS EN LA GENERACION M₂ EN CEBADA DE TALLO RAMIFICADO (Hordeum vulgare) PROCEDENTE DE SEMILLAS TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MMS Y EMS A 10°C.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F EXP.
REPETICIONES	3	8.02	2.67	2.20 NS
TRATAMIENTOS	6	22.09	3.68	3.04*
ERROR	17	20.62	1.21	
TOTAL	26	50.73		

* SIGNIFICATIVO AL 5% DE PROBABILIDAD.

TABLA XIX.- PRUEBA DE RANGO MULTIPLE DE DUNCAN⁺ PARA MEDIAS DEL PESO DEL GRANO EXPRESADO EN GRAMOS EN LA GENERACION M₂ DE CEBADA DE TALLO RAMIFICADO (Hordeum vulgare) PROCEDENTE DE SEMILLAS TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EMS Y EMS A 10° C.

DOSES	\bar{x}	$S \frac{1}{x}$
CONTROL.	1.05	0.547
0.4 EMS	1.11	
0.6 EMS	1.15	
0.2 EMS	1.45	
0.6 EMS	2.13	
0.2 EMS	2.98	
0.4 EMS	3.35	

+ SIGNIFICATIVO AL 5% DE PROBABILIDAD.

TABLA XX.- FRECUENCIA DE LOS PROBABLES MUTANTES QUE SE AISLARON PARA DIFERENTES CARACTERES EN LA GENERACION M_2 EN CEBADA DE TALLO RAMIFICADO (Hordeum vulgare) PROVENIENTE DE SEMILLAS TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MMS Y EMS A 10°C.

tratamiento con mutágeno μ /P/ Vol./hora.	TEST.	MMS	MMS	MMS	EMS	EMS	EMS
	0.0	0.2	0.4	0.6	0.2	0.4	0.6
plantas con mayor peso de grano expresado en gramos con respecto al testigo	-	-	-	-	1	3	1
plantas con mayor número de tallos con respecto al testigo	-	-	-	-	-	-	1
plantas con número de ramificaciones mayores que el testigo	-	-	-	2	2	9	3
plantas con doble espiga por tallo	-	12	12	9	13	10	10

En la tabla I se expresan los porcentajes de germinación de las semillas en la generación M_1 , tratadas con diferentes concentraciones de MMS y EMS a 10°C . Con el fin de normalizar los valores se hizo la transformación a valores angulares de arco-seno mostrados en la tabla II, con los cuales se llevó a cabo un análisis de varianza (tabla III) el cual dió una diferencia significativa al 5% para los tratamientos, indicando que hubo un efecto debido a las dosis usadas pero no con respecto a las repeticiones. Posteriormente se realizó la Prueba de Duncan para los tratamientos debido a que se encontró significancia para dichos valores. El contraste de medias (tabla IV) muestra dos grupos de dosis, el primero formado por las concentraciones de 0.4 y 0.6 de MMS y el grupo Testigo (0.0), el otro grupo formado por el Testigo, 0.2 y 0.4 de MMS y las 3 dosis de EMS utilizadas (0.2, 0.4 y 0.6). Todas las dosis de este último grupo no muestran diferencia significativa en cuanto al efecto de la germinación de las semillas. La tabla V muestra las medias de 4 repeticiones para el número de tallos en la generación M_1 en Cebuda de Tallo Ramificado, de las cuales se generó el análisis de varianza (tabla VI) el cual dió un efecto no significativo para repeticiones y tratamientos. En la tabla VII se muestran las medias de 4 repeticiones para el número de ramificaciones en la generación M_1 , y en la tabla VIII el análisis de varianza correspondiente mostrando también (al igual que en la tabla VI) un efecto no significativo para esta variable. En la tabla IX se muestra la transformación de los valores de germinación a valores angulares de arco-seno en la generación M_2 con el fin de normalizarlos al igual que en la generación M_1 ; el análisis de varianza, tabla X[†] presenta datos no significativos tanto para repeticiones como para tratamientos. En la tabla XI se muestran las medias de las 4 repeticiones con las que se trabajaron para el número de tallos en la

generación M_2 , y en la tabla XII⁺, al análisis de varianza muestra efectos significativos al 5% para repeticiones y tratamientos. Por haberse concentrado significancia en los tratamientos de la tabla anterior, se procedió a hacer el contraste de medias (tabla XIII), el cual dió lugar a la formación de 4 grupos de dosis diferentes, el primer grupo formado por el Testigo y las dosis de 0.2, 0.4 y 0.6 de MMS, el segundo, por las concentraciones de 0.2 y 0.4 de MMS, Testigo y 0.4 de EMS, el tercer grupo, por el Testigo, 0.2 de MMS, 0.4 y 0.6 de EMS, y el último por las 3 dosis de EMS utilizadas (0.2, 0.4 y 0.6), indicando este que los tratamientos del cuarto grupo produjeron una media mayor de tallos que los otros tratamientos. La tabla XIV muestra las medias de las 4 repeticiones para el número de ramificaciones, y su análisis de varianza presentado en la tabla XV⁺, en la cual se observa significancia al 5% para las repeticiones y tratamientos. Se elaboró el contraste de medias para éste parámetro debido a la significancia encontrada, formando 3 grupos de dosis diferentes (tabla XVI), el primer grupo formado por el Testigo, las concentraciones de 0.2, 0.4 de MMS y la de 0.6 de EMS, el segundo grupo formado por el Testigo, 0.2, 0.6 de MMS y 0.2, 0.6 de EMS y el último grupo por la concentración de 0.4 de EMS. En la tabla XVII se presentan las medias de 4 repeticiones para el peso del grano expresado en gramos en las plantas de Cebada de Tallo Ramificado en la generación M_2 , el análisis de varianza se muestra en la tabla XVIII⁺ indicando significancia al 5% para los tratamientos. En la tabla XIX se encuentra el contraste de medias para este parámetro, señalando 4 grupos de dosis formadas, el primer grupo dado por el Testigo, y las 3 dosis de MMS (0.2, 0.4 y 0.6), el segundo grupo por las concentraciones

+ Las tablas X, XII, XV y XVIII, se vieron modificadas en los grados de libertad debido a que la repetición IV del tratamiento 3 (0.4% de MMS) no fué sembrada por falta de semillas y no restituyó ese dato.

nes de 0.2, 0.6 de MMS y 0.2, 0.6 de EMS, el tercero formado por 0.2 - de MMS y 0.2, 0.6 de EMS, y el último por las concentraciones de 0.2- y 0.4 de EMS, indicando éstas últimas una media mayor para éste carácter. En la tabla XX se muestran las frecuencias de los probables mutantes que se aislaron para diferentes características en la generación - M_2 . En el grupo testigo se observaron plantas con 8.5 grs. de grano, - 49 tallos, 64 ramificaciones y una sola espiga por tallo, a diferencia de lo mostrado en la tabla XX en donde los probables mutantes presentan características superiores al testigo con un rango del 20% en relación a este, y plantas con 2 espigas por tallo, carácter que no había sido presentado antes en esta línea de cebada.

DISCUSION.

La cebada ha sido utilizada en un alto grado para inducir mutaciones, Ehrenberg (5). Se ha incrementado considerablemente el progreso de las cosechas, sobre todo en cereales, por medio de métodos de fitomejoramiento usando mutágenos en el aspecto de productividad, resistencia a desecación, a enfermedades, etc., Sigurbjörasson (24). Dichos métodos tienen cada vez mayor importancia, sobre todo cuando se usan mutaciones en plantas superiores al tratar de resolver problemas concretos aún para especies con una gran variabilidad natural, - Rublue, (20).

Varios autores, Mischa y Aranson (13), Aranson y Mischa (14), - Rao y Natarajan (18) han efectuado estudios comparativos entre los agentes alquilantes EMS y MMS en plantas superiores, encontrando que el MMS es más efectivo como inductor de mutaciones usado a bajas dosis, pero al incrementarse ésta, la toxicidad se eleva impidiendo la expresión de los probables mutantes, esto da ventajas al EMS que es menos tóxico y en consecuencia más utilizado como inductor de mutaciones, Osterman-Golkov y col. (16), Heslet (7).

Los resultados obtenidos al trabajar con estas mismas sustancias mutagénicas en cebada de tallo ramificado (Hordeum vulgare), - están de acuerdo a lo mencionado por los autores anteriores. Para el caso de la tabla I la germinación fué menor en las semillas tratadas con MMS, excepto en la dosis de 0.2, que para las tratadas con EMS, - aunque esta diferencia no es muy grande debido al efecto protector que la baja temperatura del tratamiento produjo, estos resultados concuerdan con aquellos obtenidos por Rublue (20). Por otro lado se ve que los porcentajes de germinación fueron muy bajos, esto es una de las características fisiológicas que presenta el material biológico tratado con mutágenos, Gaul (6), así como la esterilidad que se -

observé en la generación M_1 . Los testigos mostraron también una baja germinación, lo cual probablemente fué causado por las heladas presentadas durante el desarrollo del cultivo de estas líneas de cebada, Riejas (comunicación personal), de donde fueron tomadas las muestras tratadas con los mutágenos, (aunque se seleccionaron granos aparentemente bien desarrollados), fenómeno que se presentó en el ciclo de verano 1979 - durante las épocas de madurez del grano e maduros. Por otro lado con respecto a los 2 grupos de dosis (tabla IV) como respuesta a los mutágenos aplicados, nos lleva a considerar que la germinación se vió estimulada significativamente por el uso de las 3 concentraciones de EMS (0.2, 0.4 y 0.6) y la de 0.2 de MMS. Dentro de este mismo grupo de dosis la concentración de MMS que presentó este efecto fué la más baja utilizada, es sea la de 0.2, lo cual concuerda con los resultados previamente reportados por Peña R. (17) para el MMS. Las dosis altas de MMS (0.4 y 0.6) afectan significativamente a la germinación junto con el grupo testigo (0.0). Este último quizá por las consideraciones expresadas anteriormente. Estas dos dosis de MMS utilizadas (0.4 y 0.6) presentaron este efecto debido a la alta toxicidad que presenta esta sustancia en las dosis utilizadas, Sumano (25), Rubiue (20).

Las dosis de EMS utilizadas no presentan diferencia significativa para la germinación debido en parte a la baja toxicidad del mutágeno y por el efecto amortiguador que presentan las bajas temperaturas. Las dosis de 0.4 y 0.6 de MMS no presentan diferencia para la germinación con respecto al testigo, y se ha visto que la DL_{50} para mortalidad de semillas a $20^{\circ}C$ se encuentra entre este rango, Sumano (25), además las bajas temperaturas favorecen la eficiencia de éste mutágeno, Rubiue (20). Las 3 dosis de EMS utilizadas no presentan diferencia en la germinación por lo que se sugiere el uso de concentraciones más elevadas de este mutágeno a temperaturas iguales o más bajas. Para el número de tallos y -

ramificaciones (tabla V y VI) se presentó también un efecto protector de la temperatura, ya que mostraron un efecto no significativo de los mutágenos. Por otro lado se observó que el número de tallos y ramificaciones disminuyó en relación al número citado por Riejas (19) en este mismo tipo de plantas pero sin tratar. Esta disminución en cuanto a número pudo ser debida a que todas las plantas se encontraban en el invernadero y al no tener las mismas condiciones que el campo (competencia y factores abióticos) no se desarrollaron favorablemente. En la tabla X - se puede observar que la germinación de las semillas de Cebada provenientes de la generación M_1 , no fueron afectadas significativamente por las dosis de los mutágenos estudiados para ninguna de las repeticiones. Este fue debido a que las semillas sembradas en la generación M_2 - no estuvieron en contacto con las sustancias mutagénicas y las alteraciones fisiológicas que se pudieran presentar están restringidas a la generación directamente tratada (M_1), Gaul (6). El análisis de varianza de la tabla XII indica una significancia al 5% de repeticiones y tratamientos para el número de tallos. En el caso de las repeticiones - se puede atribuir a las características del terreno, ya que este no era homogéneo en cada una de los bloques o repeticiones, otra de las posibles razones sería la respuesta que presentan cada una de las plantas - (variabilidad) cuando la generación de donde proceden presentó alguna alteración fisiológica por la intervención del agente extraño (microambiente). En el caso de los tratamientos se ve que afectan también al número de tallos, comparando los resultados de los tratamientos entre sí. Las medias del número de tallos que se muestran en la tabla XI se ven incrementadas en las concentraciones de 0.2, 0.4 y 0.6 de EMS en comparación al grupo testigo, lo cual también se verificó con la Prueba de Range múltiple de Duncan para esta variable, (tabla XIII). Con respecto a la tabla XIII, se sabe que el MMS es un mutágeno efectivo a bajas dosis (Arnasen y Minecha, 1), sin embargo para este carácter -

practicamente no hubo diferencia con el testigo. Por otro lado, la menor toxicidad y mayor efectividad como mutágeno del EMS se hace aparente en este carácter (número de tallos), donde todas las dosis analizadas (0.2, 0.4 y 0.6) dieron valores significativamente por arriba del testigo, por lo tanto éste mutágeno puede ser utilizado para aumentar esta variable.

En la tabla XV, el análisis de varianza para el número de ramificaciones en las plantas de la generación M_2 muestra significancia al 5% para repeticiones y para tratamientos. Para el caso de las repeticiones también se le puede atribuir tanto al terreno como a la variabilidad de las plantas y para el caso de los tratamientos, el efecto de los mutágenos es el mismo que para el número de tallos siendo más marcados en las concentraciones de EMS (tabla XIV). La prueba de Duncan realizada para esta variable muestra 3 grupos de dosis formados (tabla XVI) entre las medias de las ramificaciones ; Siendo el más eficiente para éste carácter el grupo formado por la concentración de 0.4 de EMS en comparación a los otros 2 grupos.

Para el peso del grano expresado en granos obtenido en la generación M_2 (tabla XVII) se ve que las dosis de mutágenos utilizadas afectan también significativamente a este parámetro (tabla XVIII), observándose una mayor productividad en plantas tratadas con EMS en comparación con las del MMS y grupo testigo. La prueba de Duncan para éste parámetro mostró 4 grupos de dosis formadas. El primer grupo incluye al testigo, 0.2, 0.4 y 0.6 de MMS más el 0.6 de EMS, los cuales no mostraron diferencia para este carácter, en tanto que las dosis de EMS sí mostraron un efecto sobre el peso del grano mayor que el testigo. Estos datos se corroboraron al aislar la progenie por planta de cada uno de los tratamientos (tabla XX).

CONCLUSIONES.

El MMS es un agente alquilante monofuncional que ha sido relativamente poco utilizado en la inducción de mutaciones en plantas superiores, debido esto a la elevada toxicidad que le caracteriza, la cual se refleja en el porcentaje de germinación obtenida de las semillas de Cebada de Talle Ramificado en la generación M_1 tratadas con 0.2, 0.4 y 0.6 % / P / Vol./hra. de este mutágeno a 10°C , variable que disminuyó notablemente en relación a los lotes tratados con EMS. Este mismo efecto fisiológico se presentó en la generación M_2 en los talles y ramificaciones de las plantas, ya que también el número se vio afectado significativamente. El EMS por ser un agente alquilante menos tóxico para el material biológico tratado, resultó ser más eficiente usado a las mismas concentraciones y temperatura que el MMS para las variables consideradas. En primer lugar la germinación en la generación M_1 se vio favorecida significativamente, e incluso estimulada en relación al valor presentado por el testigo. Estas mismas dosis marcaron su eficiencia en la generación M_2 aumentando considerablemente el número de talles y ramificaciones al igual que el peso del grano de las plantas, siéndole para estos 3 caracteres la concentración de 0.4 de EMS la que presentó un efecto mayor en cuanto al número de estas variables que las otras dos dosis usadas (0.2 y 0.4 de EMS). Para el carácter del número de espigas por tallo, se presentó en todas las concentraciones de MMS y EMS usadas. Por lo tanto el objetivo planteado de este trabajo de investigación fué resuelto en parte con la presencia de los probables mutantes encontrados al usar estas dos sustancias mutagénicas, esperando que por medio de hibridaciones e cruces entre éstos y plantas de Cebada de espigas más grandes, y por lo tanto, con granos de mayor contenido de reservas, se llegue a crear una nueva variedad de Cebada con todas estas características juntas en un futuro no lejano.

REFERENCIAS.

- 1.- Arnason, T.J. y Minecha, J.L. (1965) . Can. J. Genet. Cytol 7: 262-267.
- 2.- Blixt, S. (1972). Agri. Hort: Genética 30: 1-293.
- 3.- Briggs, R.W. y Constantia, M.J. (1977). En: Manual on Mutation Breeding 2a. ed. I.A.E.A. Tech. Rep. Ser. 119. Vienna : 7-20.
- 4.- Dobzhansky, T. (1973). Principios de Genética. Ed. Omega.
- 5.- Ehrenberg, L. (1971). En: Chemical Mutagens. Principles and - Methods for their Detection. Vol. 2. Ed. A. Hollaender. Plenum Press, N.Y. : 365-386.
- 6.- Gaul, H. (1977). En : Manual on Mutation Breeding 2a. ed. - I.A.E.A. Tech. Rep. Ser. 119. Vienna. : 87-105.
- 7.- Henlet, H. (1977). En : Manual on Mutation Breeding 2a. ed. - I.A.E.A. Tech. Rep. Ser. 119. Vienna : 51-58.
- 8.- Kanra, O.P. y Brunner, H. (1977). En : Manual on Mutation -- Breeding 2a. ed. I.A.E.A. Tech. Rep. Ser. 119. Vienna : 54-64.
- 9.- Kozak, G.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.
- 10.- Kozak, G.F. y Favret, A. (1972) En: The Dynamics of Meristem-Cell Populations. Merton W. Miller (Ed). Plenum Publishing - Corporation. N.Y. : 227-249.
- 11.- Kozak, G.F. y Mikkelsen, K. (1977) En: Manual on Mutation - Breeding 2a. ed. I.A.E.A. Tech. Rep. Ser. 119. Vienna : 125-137.
- 12.- Meares, M. y Rubino, A. (1979). Ciencia Parental. Mex. (16) 2 : 52-56.
- 13.- Minecha , J.L. y Arnason, T.J. (1962). Nature 196 : 499.
- 14.- Nilan, R.A. (1973) En: Genes, Enzymes and Populations. Srh. A.M. (Ed.). Plenum Publishing Corporation. N.Y. : 205-222.

- 15.- Nilan, R.A. y Vig, B.K. (1976) En: Chemical Mutagens. Principles and Methods for their Detection. A. Hollaender (Ed). 4:143-169.
- 16.- Osterman-Gelkar, y col. (1970). Radiat. Bot. 10 : 303-327.
- 17.- Peña Redríguez, M.E. (1979). Efecto del Metil Metanosulfonato Sobre la Duración del Ciclo Celular de los Meristemas Radiculares - de la Cebada (Hordeum vulgare var. común). Tesis de Licenciatura. Dpto. de Biología. Fac. de Ciencias. U.N.A.M. Méx.
- 18.- Rao, R.M. y Natarajan, I.A. (1967). Mutation Res. 2 : 132-148.
- 19.- Riejas, G.E. (1975) En: Agricultura Técnica en México. (10). 12 387- 392.
- 20.- Rubiue, I.A. (1981). Efectos Fisiológicos y Genéticos de los Agentes Alquilantes en Plantas Superiores. La Acción del MMS sobre - Algunas Gramíneas. Tesis Doctoral. Dpto. de Biología. Fac. Ciencias. U.N.A.M. México.
- 21.- Rubiue, I.A. (1981). La Potencialidad de los Mutágenos Químicos en la Inducción de Mutaciones Útiles en Agricultura. En Prensa.
- 22.- Sigurbjörnsson, B. (1971). Sci. Ann. (224), I : 86-91.
- 23.- Sigurbjörnsson, B. (1977). En: Manual on Mutation Breeding 2a. ed. I.A.E.A. Tech. Rep. Ser. 119. Vienna: 1-6.
- 24.- Sigurbjörnsson, B. y Mücke, A. (1974) En: Polyploidy and Induced-Mutations in Plant Breeding 2a. ed. I.A.E.A. Tech. Rep. Ser. 119 . Vienna: 303-345.
- 25.- Sumano, G.M. (1980). Determinación de la Curva Dosis-Respuesta y el Valor de Germinación de Semillas de Cebada (Hordeum vulgare - var. común) Tratadas con Metil Metanosulfonato. Tesis de Licenciatura. Dpto. de Biología. Fac. de Ciencias. U.N.A.M. México.
- 26.- Wheeler, G.P. (1977). Federation Proceeding. 26: 885-892.
- 27.- Wickham, M.I., Narayanan, K.R. y Kenzak, C.F. (1969) En: Induced Mutations in Plants. Proc. Symp. Pullman. I.A.E.A. Vienna : 153-167.