

INDUCCION DE MUTACIONES DE COLOR DE SEMILLA CON
METANOSULFONATO DE ETILO EN EL FRIJOL

(Phaseolus vulgaris L.)

Tesis de Grado de Magister Scientiae

Julio César Guerra Chomón



INSTITUTO INTERAMERICANO DE CIENCIAS AGRICOLAS DE LA OEA
Centro Tropical de Enseñanza e Investigación
Turrialba, Costa Rica
Febrero, 1972

INDUCCION DE MUTACIONES DE COLOR DE SEMILLA CON
METANOSULFONATO DE ETILO EN EL FRIJOL
(*Phaseolus vulgaris* L.)

Tesis

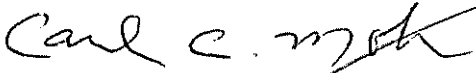
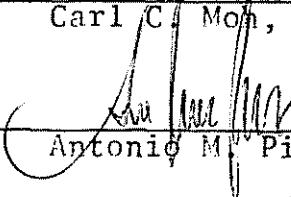
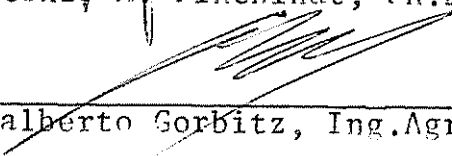
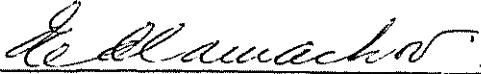
presentada al Consejo de la Escuela para Graduados
como requisito parcial para optar al grado de

Magister Scientiae

en el

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA

APROBADA:

 _____ Carl C. Moh, Ph.D.	Consejero
 _____ Antonio M. Pinchinat, Ph.D.	Comité
 _____ Adalberto Gorbitz, Ing.Agr.	Comité
 _____ Edilberto Camacho, M.S.	Comité

Febrero, 1972

A Angélica y Pamelita

A mis padres

AGRADECIMIENTO

El autor desea manifestar su agradecimiento a las siguientes personas e instituciones:

Al Dr. Carl C. Moh, Consejero Principal, por sus enseñanzas y orientación en el planeamiento y desarrollo de la presente tesis.

A los miembros del Comité Consejero: Dr. Antonio M. Pinchnat, Ing. Adalberto Gorbitz e Ing. Edilberto Camacho, por su asesoramiento y corrección del manuscrito.

Al Ing. Juan José Alán, Colaborador, por su ayuda y sugerencias.

Al Programa de Energía Nuclear (NEP), por la beca y facilidades dispensadas.

A la Unidad de Estadística y Computación, por el uso de sus facilidades.

A todos los profesores, personal auxiliar y compañeros de estudio que en una u otra forma contribuyeron a la realización de este trabajo.

BIOGRAFIA

El autor nació en Miraflores, Lima, Perú, el 10 de Octubre de 1944. Cursó sus estudios primarios y secundarios en el Colegio Champagnat de Miraflores.

Realizó sus estudios universitarios en la Facultad de Agronomía de la Universidad Agraria, La Molina, Lima, Perú, graduándose de Ingeniero Agrónomo en 1967.

En el año de 1967 se desempeñó como Profesor Auxiliar de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Iquitos, Perú.

De 1968 a Setiembre de 1970 trabajó como Fitomejorador del Programa de Frijol de la Misión Agrícola de la Universidad del Estado de Carolina del Norte - USAID, La Molina, Lima, Perú.

En Setiembre de 1970 ingresó a la Escuela para Graduados del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA, Turrialba, Costa Rica, para seguir estudios en Fitomejoramiento mediante una beca del Programa de Energía Nuclear, egresando en Febrero de 1972.

CONTENIDO

	página
1. INTRODUCCION	1
2. REVISION DE LITERATURA	
2.1 Generalidades sobre la inducción de mutaciones.	2
2.2 Efecto de los mutagénicos químicos sobre las plantas	2
2.3 Comparación de los efectos mutagénicos entre el EMS y las radiaciones.	3
2.4 Herencia del color de la semilla del frijol común.	4
2.5 EMS para inducir mutaciones de color en semillas de frijol común	5
3. MATERIALES Y METODOS	7
4. RESULTADOS	
4.1 Supervivencia de generación M ₁	9
4.2 Frecuencia de mutaciones.	9
4.3 Tamaño de las quimeras.	12
4.4 Frecuencia de mutaciones de color de hipocótilo y episperma de semilla	14
4.5 Características de los mutantes inducidos de color del episperma de semilla	14
4.6 Genética de los mutantes de color de episperma de semilla.	18
5. DISCUSION	
5.1 Supervivencia de la generación M ₁	22
5.2 Frecuencia de mutaciones.	22
5.3 Tamaño de las quimeras.	22
5.4 Frecuencia de mutaciones de color del hipocótilo y del episperma de semilla	23
5.5 Características de los mutantes inducidos de color del episperma de la semilla	24
5.6 Genética de los mutantes de color de episperma de semilla.	28
6. CONCLUSIONES	30
7. RESUMEN	31
7a. SUMMARY	33
8. LITERATURA CITADA	35

LISTA DE CUADROS

Cuadro no.		página
1	Supervivencia en la M_1 de las plantas de frijol común tratadas con EMS	10
2	Frecuencia de mutaciones inducidas por EMS sobre seis cultivares de frijol común	11
3	Tamaño de las quimeras inducidas por EMS en seis cultivares de frijol común	13
4	Frecuencia de mutaciones de color de hipocótilo y episperma de semilla en seis cultivares de frijol	15
5	Mutaciones de color de semilla obtenidas en relación con el total de mutantes y el color del hipocótilo	16
6	Descripción de los cambios de color en los mutantes	17
7	Peso de la semilla y número de granos por vaina de los mutantes de color de semilla obtenidos	19
8	Relación genética de segregación del color de hipocótilo de normal a mutante en los heterocigotos M_1	20
9	Color del episperma de semilla de los híbridos F_1 entre mutantes de semilla blanca y probadores genéticos	21

1. INTRODUCCION

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo básico en muchos países de América Latina, pues constituye una fuente importante de proteínas de bajo costo en la dieta de la población.

Muchos cultivares de frijol negro tienen alta capacidad de rendimiento y buena tolerancia a las enfermedades, pero son poco aprovechados por existir preferencia diferencial por el consumo de ciertos colores de grano, de país a país, y aún de zona a zona. Por lo tanto, el cambio del color de las semillas negras a otros colores de mayor demanda, puede dar origen a cultivares muy deseables.

El color de la semilla es un carácter de mucha importancia en el mejoramiento del frijol común. En investigaciones previas se ha encontrado que los factores genéticos que gobiernan el color del episperma de la semilla del frijol son características mutables.

El objeto del presente trabajo consistió en determinar, mediante el empleo de un mutagénico químico, la capacidad de mutación de los genes que condicionan el color del episperma de la semilla y la herencia de dicho carácter. Además se trató de seleccionar plantas de frijol con semillas de colores preferidos en determinadas regiones de América Latina, y que conserven las características favorables de los cultivares negros.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Generalidades sobre la inducción de mutaciones

En los últimos años ha habido numerosos trabajos sobre la inducción de mutaciones en plantas superiores; se han estudiado los mecanismos de acción de los diferentes agentes mutagénicos, y también se ha tratado de establecer métodos eficientes de inducción de mutaciones para su empleo en el mejoramiento de plantas (16, 32).

En la mayoría de los trabajos se ha obtenido una alta eficiencia mutagénica, adquiriendo mayor importancia el control del espectro de mutaciones (13).

En tratamientos con productos químicos alquilantes (16) no se ha encontrado explicación de las diferencias en el espectro de mutaciones, o en especificidad de locus. Sin embargo, en cebada ya se han obtenido respuestas específicas de loci a los agentes mutagénicos al lograrse rendimientos específicos de efectos fenotípicos deseables (9, 11).

Además, Gustafsson et al. (10) y Ehrenberg et al. (5) sugieren la existencia de un ámbito óptimo de mutaciones directamente utilizables en mejoramiento.

2.2 Efecto de los mutagénicos químicos sobre las plantas

Se ha encontrado que las radiaciones y los alcanosulfonatos de alquilo inducen diferentes espectros de mutaciones (21).

En experimentos con maíz se ha encontrado que el metanosulfonato de etilo (EMS*) produce mutaciones de punto, es decir,

* Siglas del nombre en el idioma inglés.

cambios en los aminoácidos que constituyen un gen (38).

Lawley y Brookes (20) sugieren que la acción mutagénica de los agentes alquilantes podría deberse a la capacidad de alquilación de la guanina en la posición N7. Al reforzarse la acidez del grupo -NH-CO- de la guanina alquilada durante la duplicación del ácido desoxi-ribonucléico (ADN), podría ocurrir cierta tendencia al apareamiento de guanina alquilada con timina en lugar de citosina. En la subsecuente duplicación del ADN la adenina-timina reemplazaría a la guanina alquilada-citosina.

El EMS es un mutagénico sumamente eficaz, que debe su acción al grupo etilo, el cual, por su capacidad de alquilación, elimina el nitrógeno de la guanina, determinando un cambio en la secuencia de bases (12, 39).

Al considerar la frecuencia y amplitud del espectro mutacional, Konzack et al. (16), atribuyen mayor importancia a la velocidad de penetración del EMS en las semillas que a la velocidad de la hidrólisis.

Swaminathan et al. (40) encontraron que el EMS induce una alta frecuencia de mutantes promisorios en caracteres agronómicos del trigo.

2.3 Comparación de los efectos mutagénicos entre el EMS y las radiaciones

Al efectuar comparaciones de los efectos mutagénicos producidos por diferentes dosis de radiaciones gamma y de mutagénicos químicos, se ha encontrado que el EMS es el agente mutagénico más potente (6). Wellensiek (41) al estudiar la frecuencia y el

espectro de mutaciones en arvejas, indica que el EMS ha dado los resultados más promisorios, siendo superior a las radiaciones gamma y X. Loveless y Howarth (21) confirman estos resultados al encontrar que el EMS tiene mayor eficiencia mutagénica que las radiaciones. En experimentos con *Vicia sativa* L. se concluyó que el EMS tiene mayor eficiencia mutagénica que los rayos X, por el gran número de plantas M_2 obtenidas, y el bajo ámbito de daños citológicos concomitantes (43). Así mismo se informa que en trigo el EMS provoca alta frecuencia de mutantes con caracteres agronómicos deseables (16). También se indica que en apariencia, no existen diferencias distintivas en la productividad de mutaciones inducidas, ya sea por medio de radiaciones ionizantes o de mutagénicos químicos (9).

Sigurbjörnsson (35) expresa que se han observado diferencias cualitativas sutiles entre el EMS y las radiaciones ionizantes, en relación a la clase de mutación inducida; no siendo claro si las diferencias son reales o causadas por factores fisiológicos regulables del material tratado.

2.4 Herencia del color de la semilla del frijol común

Los genes que determinan el color de los tegumentos seminales del frijol común han sido estudiados en forma extensa por Lamprecht (18, 19), Prakken (31, 33), Smith (36) y otros. Se han desarrollado esquemas genéticos que explican la transmisión del color (7, 17, 34, 37, 42). Para ello los genes se han agrupado en tres grupos según su acción: a) gen básico P, que en estado dominante no produce color por sí mismo, pero debe estar presente

para hacer posible la formación del pigmento; y en estado homocigoto recesivo dé lugar a la formación de semillas de color blanco; b) genes complementarios del gen básico, que se manifiestan al encontrarse junto al alelo dominante del grupo anterior; c) genes modificadores de los colores producidos por la acción combinada del gen básico y uno o más genes productores de color.

En el frijol común el color del hipocótilo puede ser verde, rosado o rojo (28, 29). Moh y Alán (25) han encontrado que existe correlación entre el color de la semilla y el color de las plántulas; de 271 cultivares estudiados, los de semilla negra produjeron hipocótilo, cotiledones y venas foliares de color rojo, los de semilla blanca produjeron color verde en los mismos órganos, y los de semilla parda o roja produjeron indistintamente color rojo o verde sobre dichas partes de la plántula.

2.5 EMS para inducir mutaciones de color en semillas de frijol común

Moh (22, 24) empleando EMS y radiaciones gamma en diferentes cultivares de frijol de semilla negra logró inducir mutaciones de color blanco, amarillo, pardo, pardo oscuro, y pardo gris. Luego de probar el material mutante, dedujo que el color blanco se debía al cambio del gen P de dominante a recesivo o a una delección del gen P; y que los otros colores mutantes se debieron probablemente a cambios en los factores complementarios o en los modificadores. En otro trabajo (1) se obtuvieron resultados semejantes al emplear mutagénicos para cambiar el color del episperma de la semilla de frijol.

Delgado de la Flor, Moh y Alán (2) han encontrado que las semillas en germinación son más sensitivas a los mutagénicos que las semillas en reposo o latencia, siendo 24 horas un período adecuado para embeber las semillas antes de tratarlas con EMS cuando se usan dosis relativamente bajas.

3. MATERIALES Y METODOS

Se emplearon el metanosulfonato de etilo (EMS), de fórmula bruta $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{C}_2\text{H}_5$, y los cultivares de frijol 'H-182-N', '51135-N-1', '51135-N-2' y '51052' de episperma negro e hipocótilo rojo y 'Chepe' y 'Col-1-63A', de episperma rojo e hipocótilo rojo.

Las semillas de un mes de cosechadas y contenido estable de humedad se colocaron en recipientes con agua, a la temperatura de 20C durante 24 horas. Luego se procedió a tratar las semillas en una solución de EMS a la concentración de 0,06 M, agitándolas en forma continua durante seis horas. Luego se las lavó con agua corriente.

La siembra se efectuó en el campo a una distancia de 50 cm entre surcos, y colocando una semilla cada 10 cm a lo largo del surco. Cada planta de la M_1 se cosechó en forma individual.

La semilla de la M_1 se sembró en el invernáculo en cajas con suelo previamente fumigado, colocándose una hilera por cada planta cosechada. A la semana de sembradas se anotaron los distintos tipos de mutaciones producidas en las plántulas M_2 , y se determinó sus frecuencias. Las plantas con hipocótilo verde y apariencia normal, así como las plantas de hipocótilo rojo que se encontraron en la misma línea, se transplantaron a macetas individuales para estudiar los mutantes de color de semilla producidos.

Para cada mutante obtenido se anotó en particular el color del hipocótilo, de las venas de la hoja primaria, del cotiledón, de la flor, de la vaina y del episperma de semilla; el tipo de

crecimiento; el ciclo de cultivo; el número de granos por vaina y el peso de la semilla.

En la M_3 se separaron las líneas heterocigóticas y en la M_4 se determinó la proporción de segregación con el fin de que la información procediera de un mayor número de plantas. Se emplearon la prueba de Chi-cuadrado para evaluar la hipótesis genética, y la prueba de t de Student para las comparaciones del número de granos por vainas y peso de semilla.

Además, se hicieron cruzamientos entre los mutantes inducidos y los probadores genéticos 'Lamprecht 214' y 'Smith 2151', para estudiar el color de la semilla F_1 .

4. RESULTADOS

4.1 Supervivencia de generación M₁

En el Cuadro 1 se pueden observar diferencias en el porcentaje de plantas sobrevivientes logradas en la generación M₁ de los diferentes cultivares estudiados. 'Chepe' y '51052' tuvieron baja supervivencia en relación a los demás cultivares.

Al compararse los porcentajes de plantas M₁ logradas en relación al testigo, dentro de cada cultivar, siendo el testigo considerado como 100, se observa que el cultivar 'Chepe' tiene bajo porcentaje de supervivencia en comparación con los demás.

4.2 Frecuencia de mutaciones (Cuadro 2)

Las mutaciones inducidas en frijol se han clasificado en dos categorías: clorofílicas y morfológicas. Las mutaciones clorofílicas comprenden cambios en el color de la hoja, tales como albino, amarillo, verde amarillento, verde claro, verde oscuro, variegado, helado, moteado, u otros; las mutaciones morfológicas incluyen cambios de forma, tamaño, patrón o hábito de crecimiento de un órgano o de la planta completa, por ejemplo, miniatura, enana, trepadora, hoja arrugada y especialmente cambio de color o de forma de la semilla (23).

La frecuencia de las mutaciones clorofílicas ha sido mayor que la frecuencia de mutaciones morfológicas en 'Col-1-63A' y menor en '51135-N-2'. En los otros cultivares, la frecuencia de mutaciones clorofílicas ha sido semejante a la frecuencia de mutaciones morfológicas.

Cuadro 1. Supervivencia en la M1 de las plantas de frijol común tratadas con EMS

Cultivar	Tratamiento	N° de semillas tratadas	No.	Plantas M1 logradas	
				%	% en relación al testigo
'Chepe'	testigo	100	43	43,0	100,0
	0,06 M	300	43	14,3	33,2
'Ccl-1-63A'	testigo	200	189	94,5	100,0
	0,06 M	200	156	78,0	82,5
'H-182-N'	testigo	200	164	82,0	100,0
	0,06 M	1000	582	58,2	71,0
'51135-N-1'	testigo	200	163	81,5	100,0
	0,06 M	1000	578	57,8	70,9
'51135-N-2'	testigo	200	171	85,5	100,0
	0,06 M	800	519	64,9	75,9
'51052'	testigo	200	78	39,0	100,0
	0,06 M	1000	305	30,5	78,2

Cuadro 2. Frecuencia de mutaciones inducidas por EMS sobre seis cultivares de frijol común

Cultivar	Tratamiento	No. de plantas sembradas	Mutaciones observadas al estado de plántula M2					
			Ciclotécnicas		Morfológicas		Total	
			No.	%	No.	%	No.	%
'Chopo'	testigo	43	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	0,06 M	43	17	39,5	17	39,5	34	79,1
'Col-1-63A'	testigo	189	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	0,06 M	156	12	26,9	17	10,9	59	37,8
'H-182-N'	testigo	164	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	0,06 M	582	217	37,3	204	35,0	421	72,3
'51135-N-1'	testigo	163	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	0,06 M	578	176	30,4	213	36,8	389	67,3
'51135-N-2'	testigo	171	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	0,06 M	519	139	26,8	201	38,7	340	65,5
'51052'	testigo	78	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	0,06 M	305	94	30,8	112	36,7	206	67,5

En el cultivar 'Col-1-63A' el total de mutaciones logradas fue bajo en relación a los demás cultivares. En los otros cultivares hubo una alta frecuencia de mutaciones en el estado de plántula.

4.3 Tamaño de las quimeras

Las diferentes partes del meristema en el embrión de la semilla pueden originar, potencialmente, cierta parte de la planta madura. Al aplicarse un mutagénico se espera que la planta M_1 porte una mutación inducida, desarrollada a partir de una célula meristemática en cierta parte de la yema apical, siendo las otras partes normales o diferencialmente mutadas. Si al crecer, la célula mutada logra competir con la célula normal, se formará una sección mutada o quimera.

El tamaño de la quimera puede usarse como índice para determinar si la célula mutada puede o no competir con las células normales durante el desarrollo de la planta. El tamaño de la quimera se determina en la M_2 y se expresa como la frecuencia de plántulas mutantes M_2 segregadas por plantas mutantes M_1 .

El Cuadro 3 muestra el tamaño de las quimeras inducidas por el tratamiento con EMS y su diferenciación en mutaciones clorofílicas y morfológicas en los seis cultivares de frijol común estudiados. El tamaño de las quimeras clorofílicas producidas fue semejante al de las quimeras morfológicas dentro de cada cultivar. Sin embargo, entre los cultivares se encontraron diferencias en el tamaño total de las quimeras. Las quimeras producidas en los cultivares 'Col-1-63A' y 'Chepe' fueron dos a tres veces mayores

Cuadro 3. Tamaño de las quimeras inducidas por EMS en seis cultivares de frijol común

Cultivar	Trata- miento	Frecuencia de plántulas mutantes M ₂ segregadas por plantas mutan- tes M ₁							
		Clorofílicas		Morfológicas		Total			
		Mutantes Total	%	Mutantes Total	%	Mutantes Total	%		
'Chepe'	testigo	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	0,06 M	46	10,4	53	15,1	99	12,4	795	12,4
'Cel-1-63A'	testigo	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	0,06 M	166	15,0	58	13,8	224	15,3	1464	15,3
'H-192-N'	testigo	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	0,06 M	511	6,2	415	5,8	926	6,0	15305	6,0
'51135-N-1'	testigo	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	0,06 M	507	5,4	521	5,5	1068	5,5	19574	5,5
'51135-N-2'	testigo	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	0,06 M	444	6,4	556	5,1	1000	5,6	17824	5,6
'51052'	testigo	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	0,06 M	380	5,7	376	4,9	756	5,2	14426	5,2

que en los cultivares 'H-182-N', '51135-N-1', '51135-N-2' y '51052'.

4.4 Frecuencia de mutaciones de color de hipocótilo y episperma de semilla

En el Cuadro 4 se anota el número de mutaciones de color de hipocótilo y de episperma de semilla que se obtuvieron.

La frecuencia de mutación del color del hipocótilo fue del order del 1,6 al 5,4 por ciento del total de las plantas logradas.

En el mismo cuadro se aprecia el grupo de coloración y el número de mutantes obtenidos en cada cultivar estudiado. Solo cuatro de los seis cultivares en estudio produjeron mutantes de color de episperma de semilla, variando el rendimiento de 0,4 a 1,4 plantas mutantes por cada 100 plantas logradas.

En el Cuadro 5 se observa que en cuatro de los seis cultivares tratados, se lograron de 0,6 a 2,1 por ciento de mutaciones de color de semilla por cada 100 mutaciones obtenidas en el estado de plántula en la M_2 ; y el 18,2 al 33,3 por ciento de los mutantes de color de hipocótilo tuvieron mutaciones de color de episperma de semilla.

4.5 Características de los mutantes inducidos de color del episperma de semilla

Como se puede observar en el Cuadro 6, todos los mutantes de color de semilla cambiaron de color del hipocótilo, de las venas de la hoja primaria y de las vainas, de rojo a verde. El cotiledón pasó de rojo a verde, en todas las plantas con episperma blanco, en tres de los mutantes de color de semilla denominados

Cuadro 4. Frecuencia de mutaciones de color de hipocótilo y episperma de semilla en seis cultivares de frijol

Cultivar	No. de plantas M ₁	Mutaciones obtenidas de color de hipocótilo		Mutaciones obtenidas de color de semilla	
		No.	%	No.	%
'Chepe'	43	1	2,3	--	0 0,0
'Col-1-63A'	156	3	1,9	Blanco	1 0,6
'H-182-1'	582	24	4,1	Blanco	3 0,5
				Bayo	4 0,7
				Mosaico	1 0,2
				Total	8 1,4
'51135-N-1'	578	31	5,4	Blanco	2 0,3
				Bayo	6 1,0
				Total	8 1,4
'51135-N-2'	519	11	2,1	Bayo	2 0,4
'51052'	305	5	1,6	--	0 0,0

* Semilla roja

** Semilla negra

Cuadro 5. Mutaciones de color de semilla obtenidas en relación con el total de mutantes y el color del hipocótilo

Cultivar	Número de mutaciones obtenidas		% de mutaciones de color de semilla		
	total	de color de hipocótilo	de color de semilla	en relación al total de mutantes	en relación al color del hipocótilo
'Chepe'	34	1	0	0,0	0,0
'Coi-1-63A'	59	3	1	1,7	33,3
'H-182-N'	421	24	8	1,9	33,3
'51135-N-1'	389	31	8	2,1	25,8
'51135-N-2'	340	11	2	0,6	18,2
'51052'	206	5	0	0,0	0,0

Bayo y en el mutante Mosaico 1. El color de las flores cambió de púrpura a blanco en todos los mutantes de semilla blanca, en gran parte de los mutantes pardos y en Mosaico 1.

Los matices de las semillas (9-10 por ciento de humedad) de los mutantes obtenidos se identificaron con base a las tablas del ISCC-NBS (14, 15).

Todos los mutantes obtenidos mantuvieron las características de crecimiento indeterminado, porte de la planta, morfología general y período vegetativo de los cultivares que les dieron origen.

Cuadro 6. Descripción de los cambios de color en los mutantes

Cultivar	C o l o r d e :							episperma de semilla
	hipocó- tilo	vena de hoja primaria	cotiledón	flor	vaina	vena	episperma de semilla	
'CoI-1-63A'	R	R	R	B	R	R	R	R muy subido B amarillento
Blanco 11	V	V	V	B	V	V		
'H-182-N'	R	R	R	Pu	P	N		
Blanco 7	V	V	V	R	V	B		
8	V	V	V	B	V	B		
9	V	V	V	B	V	B		
Bayo 29	V	V	R	R	V	Pa	Pa oscuro	
30	V	V	R	B	V	Pa	Pa grisáceo oscuro	
31	V	V	R	B	V	Pa	Pa amarillento claro	
32	V	V	R	R	V	Pa	Pa moderado	
Mosaico 1	V	V	V	R	V	N	N con mancha blanca	
'51135-N-1'	R	R	R	Pu	R	N		
Blanco 10	V	V	V	B	V	B		
12	V	V	V	B	V	B		
Bayo 34	V	V	R	B	V	Pa	Pa intenso	
35	V	V	R	B	V	Pa	Pa moderado	
36	V	V	R	Pu	V	Pa	Pa amarillento grisáceo	
37	V	V	R	Pu	V	Pa	Pa grisáceo oscuro	
38	V	V	R	B	V	Pa	Pa intenso	
39	V	V	V	B	V	Pa	Pa subido	
'51135-M-2'	R	R	R	Pu	R	N		
Bayo 40	V	V	V	B	V	Pa	Pa amarillento intenso	
Bayo 41	V	V	V	B	V	Pa	Pa grisáceo oscuro	

R = rojo; V = verde; B = blanco; Pa = pardo; Pu = púrpura; N = negro

El peso de la semilla de los mutantes obtenidos (9-10 por ciento de humedad) fue semejante al peso de la semilla de los cultivares que les dieron origen, con excepción del mutante Bayo 30 que mostró diferencias significativas con el cultivar 'H-182-N' (Cuadro 7). En el mismo cuadro se puede observar que no existen diferencias sensibles estadísticamente en el número de granos por vaina entre cada mutante y el cultivar de origen.

4.6 Genética de los mutantes de color de endosperma de semilla

Se ha visto que la segregación de mutantes obtenida en la M_2 corresponde al tamaño de la quimera. Por ello, la herencia del color del hipocótilo se puede estudiar en plantas heterocigóticas a partir de la M_3 . Para disponer de mayor número de plantas la herencia del color del hipocótilo se estudió en la generación M_4 para cada mutante en particular, encontrándose una relación de tres plantas normales de hipocótilo rojo a una planta mutante de hipocótilo verde, tal como se observa en el Cuadro 8. Sólo un mutante, Blanco 11, no alcanzó significación estadística en la Prueba de Chi-cuadrado, observándose que existe menor producción de homocigotos recesivos en relación al 25 por ciento esperado.

Los cruzamientos efectuados entre los mutantes de semilla blanca y los probadores genéticos 'Lamprecht 214' y 'Smith 2151' que poseen el factor de pigmentación P, pero que no expresan coloración por carecer de factores complementarios (Cuadro 9), dieron como resultado semillas F_1 de color negro en el caso de cruzamientos con mutantes procedentes de cultivares negros, y de color rojo en el caso de cruzamientos con mutantes procedentes de un cultivar rojo.

Cuadro 7. Peso de la semilla y número de granos por vaina de los mutantes de color de semilla obtenidos

Cultivar Mutante	Peso de 100 semillas (g)	Número de granos por vaina
'Col-1-63A'	30,1±0,3	2,92±0,22
Blanco 11	30,0±0,3	3,93±0,15
'H-182-N'	28,1±0,1	3,22±0,13
Blanco 7	29,0±0,2	3,09±0,34
8	25,3±0,2	3,70±0,37
9	27,5±0,1	3,24±0,17
Bayc 29	26,1±0,2	3,20±0,37
30	24,4±0,1*	3,19±0,26
31	29,0±0,1	2,99±0,14
32	26,0±0,0	2,96±0,25
Mosaico 1	28,1±0,4	4,16±0,18
'51135-N-1'	26,1±0,2	3,77±0,29
Blanco 10	24,2±0,1	3,50±0,17
12	23,0±0,2	3,61±0,24
Bayc 34	30,0±0,2	3,64±0,44
35	30,9±0,2	3,85±0,30
36	26,8±0,3	3,16±0,20
37	29,4±0,3	4,21±0,26
38	25,6±0,2	3,96±0,15
39	27,0±0,3	3,81±0,27
'51135-N-2'	20,0±0,2	3,42±0,38
Bayc 40	21,1±0,2	3,20±0,25
41	19,3±0,2	3,58±0,59

* Diferencia significativa en la Prueba de t al comparar el mutante con el cultivar de origen.

Cuadro 8. Relación genética de segregación del color de hipocótilo de normal a mutante en los heterocigotas M₄

Cultivar	Mutante	Número de plantas			χ ²	Rango de probabilidades*
		normales	mutantes	total		
'Col-1-63A'						
	Blanco 11	345	68	413	16,046	< 0,01
'H-182-N'						
	Blanco 7	76	23	99	0,164	0,50 - 0,70
	8	160	51	211	0,077	0,70 - 0,80
	9	148	50	198	0,006	0,90 - 0,95
	Bayo 29	74	26	100	0,053	0,80 - 0,90
	30	40	17	61	0,707	0,30 - 0,50
	31	103	34	137	0,002	0,95 - 0,99
	32	187	61	248	0,022	0,80 - 0,90
	Mosaico 1	77	34	111	1,876	0,10 - 0,20
'51135-N-1'						
	Blanco 10	60	26	86	1,255	0,20 - 0,30
	12	36	14	50	0,240	0,50 - 0,70
	Bayo 34	668	218	886	0,073	0,70 - 0,80
	35	313	104	417	0,000	> 0,99
	36	77	22	99	0,407	0,50 - 0,70
	37	571	199	770	0,292	0,50 - 0,70
	38	223	70	293	0,192	0,50 - 0,70
	39	223	77	300	0,071	0,70 - 0,80
'51135-N-2'						
	Bayo 40	31	9	40	0,133	0,70 - 0,80
	41	42	15	57	0,052	0,80 - 0,90

* Proporción 3:1

Cuadro 9. Color del episperma de semilla de los híbridos F₁ entre mutantes de semilla blanca y probadores genéticos*

Cruzamiento	No. de niantas F ₁ obtenidas	Color de semilla	
		F ₁	Cultivar original
'Lamprecht 214' x Blanco 11	14	Rojo ¹	Rojo ¹
'Lamprecht 214' x Blanco 7	2	Negro ²	Negro ²
'Lamprecht 214' x Blanco 9	2	Negro ²	Negro ²
'Lamprecht 214' x Blanco 10	3	Negro ²	Negro ²
'Smith 2151' x Blanco 7	2	Negro ²	Negro ²

* 'Lamprecht 214' y 'Smith 2151' portan el factor de pigmentación P en estado dominante pero no tienen factores complementarios, siendo por consiguiente de semilla blanca.

¹ Hipocótilo rojo, flor blanca, vaina roja

² Hipocótilo rojo, flor lila, vaina roja

5. DISCUSION

5.1 Supervivencia de la generación M₁

En general el bajo porcentaje de plantas logradas en los cultivares 'Chepe' y '51052' se debió a que estuvieron ubicados en la zona del campo más afectada por las lluvias.

La baja supervivencia de la M₁ del cultivar 'Chepe' en relación a su testigo, probablemente se debe a una mayor sensibilidad al EMS.

La sensibilidad de las plantas al mutagénico se debe probablemente a diferencias en la carga genética y al estado de división de las células, y puede estar influenciado por factores ambientales y químicos.

5.2 Frecuencia de mutaciones

La producción de mutantes clorofílicos fue semejante a la de morfológicos, aunque en el cultivar 'Col-1-63A' hubo mayor frecuencia de mutaciones clorofílicas y menor en '51135-N-2'.

En general el número de mutaciones obtenido en el estado de plántula en los cultivares empleados fue elevado, con excepción del cultivar 'Col-1-63A' que produjo un porcentaje bajo de mutantes, debido probablemente, a diferencias de sensibilidad al EMS de los diferentes cultivares.

5.3 Tamaño de las quimeras

En algunos de los cultivares el tamaño de las quimeras es superior, debido a la supuesta diferencia de sensibilidad al agente mutagénico. Esto indica que las células mutadas en los cultivares

'Chepe' y 'Col-1-63A' compitieron más favorablemente con las células normales que en los demás cultivares.

Los resultados obtenidos indican que existe paralelismo en la producción de quimeras clorofilicas y morfológicas.

5.4 Frecuencia de mutaciones de color del hipocótilo y del episperma de semilla

Se pueden observar diferencias en la frecuencia de mutaciones de color del hipocótilo y del episperma de la semilla entre los cultivares de frijol común empleados, siendo la frecuencia de las mutaciones producto de la posible sensibilidad diferencial de los cultivares al EMS.

Así mismo, los resultados dan una idea de la proporción de mutantes de color de semilla que se pueden obtener en relación con el total de plantas logradas en la M_1 , en relación con el número de mutaciones obtenidas en el estado de plántula y en relación con el número de mutaciones inducidas de color de hipocótilo.

La correlación existente entre el color del hipocótilo y el color del episperma de la semilla permite aislar los posibles mutantes a partir de plántulas que muestren cambio en el color del hipocótilo (24).

Se observa que el cambio de color del hipocótilo no significó, en todos los casos, un cambio de color de la semilla. Esto se debe a que no existe correlación perfecta entre estos factores (25).

En relación a la mutación simultánea de varios factores Gottschalk (8) describe tres posibilidades de ocurrencia: 1) efecto

pleyotrópico de un simple gen mutante, el cual es responsable del complejo de caracteres cambiados, 2) genes ligados cercanamente o vecinos y que han mutado y 3) pérdida de una pequeña porción de un cromosoma conteniendo varios genes.

En todos los mutantes de semilla blanca y en Mosaico 1 ocurrieron cambios de color del hipocótilo, de las venas de la hoja primaria, del cotiledón, de la flor y de la vaina. En los mutantes de semilla de color pardo ocurrieron cambios de color del hipocótilo, de las venas de la hoja primaria, de la vaina, y en algunos casos, del color del cotiledón o de la flor. Esto indicaría que se trata de la mutación de genes ligados cercanamente, aunque existiendo también efecto pleyotrópico al ocurrir la mutación del gen que determina la presencia o ausencia de color en la semilla.

5.5 Características de los mutantes inducidos de color del episperma de la semilla

Evidentemente, se trata de mutantes inducidos artificialmente y no de origen espontáneo, ya que en los testigos no hubo mutantes. Por otro lado, los mutantes obtenidos en la M_2 mantuvieron sin alteraciones las características cambiadas durante dos generaciones, y fueron exactamente iguales a los recobrados del material segregante en M_3 y M_4 .

El color de las semillas mutadas (Figs. 1 y 2) ha sido blanco, blanco amarillento, negro con mancha blanca en la mitad que contiene al micrópilo, y diferentes tonos e intensidades de pardo.

Pinchinat (30) y Denis (3) encontraron que el número de semillas por vaina y el peso de la semilla en frijol común eran componentes estables del rendimiento al considerar sus índices de

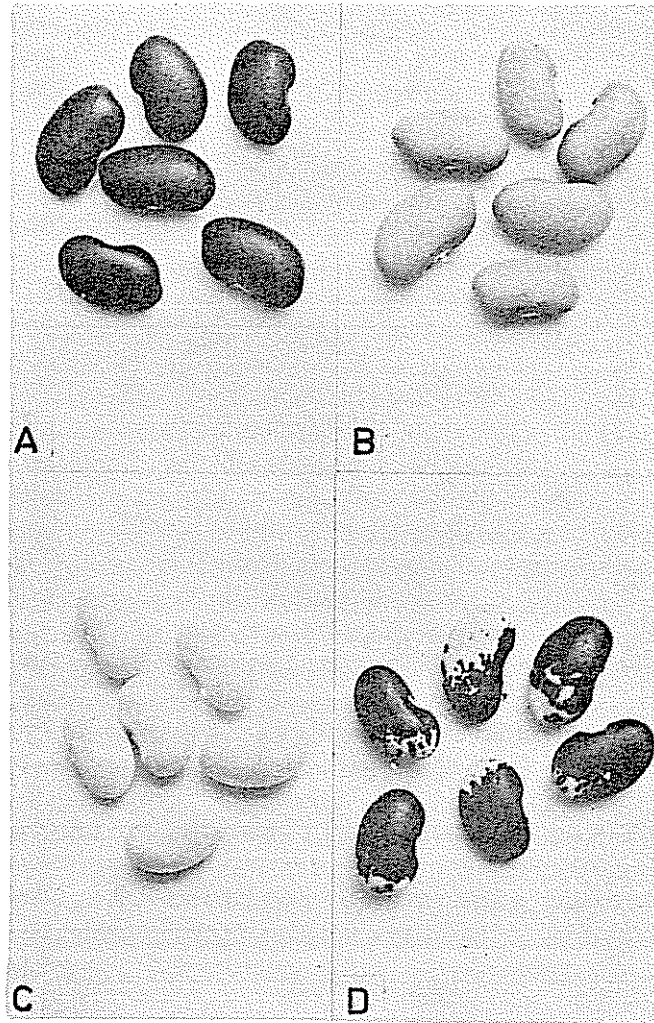


Fig.1 Mutantes de color de semilla inducidos por EMS en el cultivar 'H-182-N'. A. testigo; B. mutante pardo; C. blanco; D. mosaico.

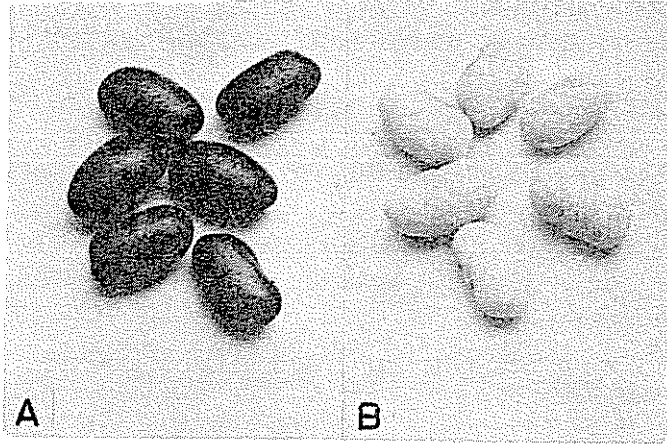


Fig.2 Mutante de color de semilla inducido por EMS en el cultivar 'Col-1-63A'. A. testigo; B. mutante blanco amarillento.

hereditabilidad. El rendimiento por planta y el número de vainas por planta son factores fácilmente influidos por el ambiente y de baja hereditabilidad (4). Por ello en el presente trabajo se han considerado sólo los componentes número de semillas por vaina y peso de la semilla. Estos factores en los mutantes obtenidos no fueron significativamente diferentes a los de los cultivares de origen. El peso de Bayo 30 fue significativamente más bajo que el del cultivar de origen, probablemente debido a causas microclimáticas.

El cambio del color de la semilla del frijol común aplicando EMS como mutagénico constituye un método rápido de mejoramiento, ya que sólo dos generaciones son necesarias para obtener dicho cambio. Los mutantes inducidos mantuvieron las características de los cultivares originales, cambiando tan sólo el color de la semilla y ciertas características de coloración de la planta. Dicho cambio por los métodos convencionales de mejoramiento hubiera requerido varias generaciones de retrocruzamientos y gran número de cruzamientos artificiales.

Para la inducción de mutaciones se hace necesario trabajar con gran número de plantas. Por eso, el empleo del mutagénico acompañado de un método rápido de selección, permitió trabajar en el invernadero con una gran población de plántulas; como ejemplo, en la generación M_2 se lograron 131.867 plántulas, que por estar agrupadas en 3.667 líneas y debiendo estar separadas para facilitar la identificación, hubieran ocupado un área neta calculada aproximadamente en dos hectáreas. El trabajo de selección en el campo hubiera demandado gran esfuerzo, y se habría logrado menor efectividad.

5.6 Genética de los mutantes de color de episnerma de semilla

Los resultados obtenidos en la segregación de la M_4 nos indican que las mutaciones inducidas son de carácter recesivo y transmitidas en forma mendeliana simple. Moh y Smith (27) trabajando en otras especies señalan que la mayoría de las mutaciones son recesivas y de carácter monohíbrido. Se puede suponer, de acuerdo a lo propuesto por esos autores y confirmado posteriormente por Moh y Nilan (26), que en el mutante Blanco 11 ha ocurrido una transmisión reducida del gameto mutante, ocasionando menor número de homocigotos recesivos que los esperados.

Los mutantes de semilla de color blanco pueden ocurrir por ausencia del factor dominante P o por ausencia de todos los factores complementarios de color. Esto último es improbable por haberse encontrado segregación de un solo factor para el color de semilla, ya que aunque los mutantes de color de hipocótilo no fueron en su totalidad mutantes de color de semilla, los mutantes de color de semilla en su totalidad son mutantes de color de hipocótilo; además los heterocigotos para color de hipocótilo, de color normal rojo, fueron heterocigotos para color de episnerma de semilla, de color normal negro o rojo según el caso.

Para probar la validez de esta suposición en relación con los mutantes de semilla blanca se hicieron cruzamientos de los mutantes con los probadores genéticos que poseen el gen P en estado dominante y no tienen factores complementarios. Los resultados obtenidos permiten deducir que los mutantes inducidos de semilla blanca se debían a la ausencia del factor dominante P.

Las mutaciones de color pardo se debieron probablemente al cambio de uno de los factores complementarios o modificadores de color. Desafortunadamente no se disponía de los marcadores genéticos para detectar los loci mutados de los factores complementarios o modificadores.

6. CONCLUSIONES

1. Se observaron diferencias en la supervivencia de la generación M_1 , en la producción total de mutantes y en el tamaño de las quimeras debido a la sensibilidad diferencial de los cultivares de frijol común al EMS.
2. Las mutaciones de color de semilla obtenidas son de carácter recesivo y gobernadas por un solo gen.
3. Los mutantes de semilla de color blanco se debieron al cambio del gen P, de dominante a recesivo.
4. El empleo del EMS como agente mutagénico es muy conveniente en el cambio de color de la semilla por su rapidez y eficiencia, ya que los mutantes se obtienen en la M_2 , y el cambio de color de las semillas de frijol ocurre sin que se afecten las demás características de los cultivares de origen.
5. Se obtuvieron mutantes de semilla blanca que podrían ser utilizados en los países de América Latina que tengan preferencia por dicho color.

7. RESUMEN

Ciertos cultivares de frijol común poseen características favorables de rendimiento y tolerancia a enfermedades, que no son aprovechadas por cuanto existe preferencia diferencial en el consumo de ciertos colores de grano.

Empleando mutagénicos se pueden inducir cambios de color del episperma de la semilla. Se trataron semillas en germinación de los cultivares 'H-182-N', '51135-N-1', '51135-N-2', '51052, de semilla negra e hipocótilo rojo; 'Chepe' y 'Col-1-63A', de semilla e hipocótilo rojos, con metanosulfonato de etilo (EMS) 0,06 durante seis horas. Los mutantes de color de semilla se seleccionaron en el estado de plántula en la M_2 , haciendo uso de la correlación existente entre el color del hipocótilo y el color de la semilla. La selección se efectuó en invernáculo empleando una gran población de plántulas.

Se encontraron diferencias en la sensibilidad al EMS entre los cultivares. Se indujeron mutaciones de color de semilla en sólo cuatro de los seis cultivares estudiados. Los mutantes obtenidos han sido de color blanco, blanco amarillento, pardo, pardo amarillento, pardo grisáceo y negro con mancha blanca. Los resultados dan una idea de la frecuencia de mutaciones de color de semilla que se pueden obtener con este método. Las mutaciones de color de semilla obtenidas son de carácter recesivo y monogénicas, transmitidas en forma mendeliana simple. Los mutantes de semilla de color blanco son consecuencia de la mutación del gen P, que

determina presencia o ausencia de coloración. Los genes que condicionan el color de la semilla, probablemente se encuentran ligados a los genes que gobiernan diferentes características de coloración de la planta, tales como el color del hipocótilo. El cambio del color de la semilla por medio de mutaciones es estable y se logra en sólo dos generaciones. Los mutantes obtenidos conservan sin alteración las demás características de los cultivares originales.

7a. SUMMARY

Certain bean cultivars possess favorable yield and disease tolerance characteristics. Frequently, advantage is not taken of these cultivars due to existing differential preference towards consuming certain seed-coat colors.

Changes in the seed-coat color can be induced through the use of mutagenic agents. Germinating seeds of the cultivars 'H-182-N', '51135-N-1', '51135-N-2', '51052' with black seed-coat and red hypocotyl; 'Chepe' and 'Col-1-63A' with red seed-coat and hypocotyl, were treated with ethyl methanesulfonate (EMS) 0,06 M for six hours. The seed-coat color mutants were selected in the M_2 generation at the seedling stage, making use of the existing correlation between the hypocotyl color and the seed-coat color. The selection was made in the greenhouse using a great number of seedlings.

Differences in sensibility towards EMS was found in the cultivars. Seed-coat color mutations were induced in four of the six cultivars studied. The seed-coat color of the mutants obtained were white, yellowish white, brown, yellowish brown, gray brown, and black with white spots. The results give an idea of the mutation frequency in seed-coat color that can be obtained with this method. The seed-coat color mutations obtained are recessive and monogenic in character and are transmitted in a simple mendelian way. The white seed-coat color mutants are due to the mutation of the gene P, which determines the presence or absence of color. The genes which condition the seed-coat color can

probably be found linked to the genes which govern the different color characteristics of the plant, such as hypocotyl color. The change in seed-coat color through mutations is a stable one, and can be accomplished in only two generations. The mutants obtained retain all the other characteristics of the original cultivars without any alteration.

8. LITERATURA CITADA

1. DELGADO DE LA FLOR, L. F. Frecuencia de mutaciones inducidas por radiaciones gamma y metanosulfonato de etilo en la semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 1970. 29 p. (mimeo)
2. _____, MOH, C. C. y ALAN, J. J. Frecuencia de mutaciones inducidas por el metanosulfonato de etilo en semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en diferentes estados de germinación. Turrialba 21:121-122. 1971.
3. DENIS, J. C. Estimación de la hereditabilidad del rendimiento y sus componentes primarios en el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.); correlaciones fenotípicas y genotípicas entre estos caracteres. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 1967. 46 p.
4. _____ y PINCHINAT, A. M. La hereditabilidad del rendimiento y de sus componentes primarios en el frijol común. In Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos Alimenticios, 15a Reunión Anual, San Salvador, El Salvador, Febrero 24-28, 1969. Frijol. Guatemala, IICA, Zona Norte, 1970. p. 21. (IICA Publicación Miscelánea no. 68).
5. EHRENBERG, L. et al. Variation in quantitative and biochemical characters in barley after mutagenic treatments. In Food and Agriculture Organization of the United Nations. The use of induced mutations in plant breeding. Oxford, Pergamon Press, 1965. pp. 477-490.
6. _____, GUSTAFSSON, Å. y LUNDQVIST, U. Viable mutants induced in barley by ionizing radiation and chemical mutagens. Hereditas 47:243-282. 1961.
7. FEENSTRA, W. J. Biochemical aspects of seed-coat colour inheritance in *Phaseolus vulgaris* L. Mededelingen van de Landbouwhogeschool Wageningen (Holanda) 60(2):1-553. 1960.
8. GOTTSCHALK, W. Simultaneous mutation of closely linked genes. A contribution to the interpretation of 'pleiotropic' gene action. In Research Co-ordination Meeting on the Use of Induced Mutations in Plant Breeding, Vienna, 1968. Mutation in Plant Breeding. Proceedings. Vienna, International Atomic Energy Agency, 1968. v.2, pp. 97-109. (Panel Proceedings Series).
9. GUSTAFSSON, Å. Productive mutations induced in barley by ionizing radiations and chemical mutagens. Hereditas 50:211-263. 1963.

10. GUSTAFSSON, Å., LUNDQVIST, U. y EKMAN, G. Yield analysis after repeated mutagenic treatment and selection in barley. In Research Co-ordination Meeting on the Use of Induced Mutations in Plant Breeding, Vienna, 1968. Mutations in Plant Breeding. Proceedings. Vienna, International Atomic Energy Agency, 1968. v.2, pp. 113-128. (Panel Proceedings Series).
11. HAGBERG, H., GUSTAFSSON, Å. y EHRENBERG, L. Sparsely contra densely ionizing radiations and the origin of erectoid mutations in barley. *Hereditas* 44:523-530. 1958.
12. HESLOT, H. The nature of mutations. In Food and Agriculture Organization. The use of induced mutations in plant breeding. Oxford, Pergamon Press, 1965. pp. 3-45.
13. KAWAI, T. Relative effectiveness of physical and chemical mutagens. In Symposium on the Nature, Induction and Utilization of Mutations in Plants. Pullman, Wash., July 14-18, 1969. Induced Mutations in Plants. Vienna, International Atomic Energy Agency, 1969. pp. 137-150. (Proceedings Series).
14. KELLY, K. L. y JUDD, D. B. The ISCC-NBS method of designating colors and a dictionary of color names. U. S. Department of Commerce. National Bureau of Standards. Circular 553. 1955. 158 p.
15. _____ y JUDD, D. B. ISCC-NBS color name charts illustrated with centroid colors. U. S. Department of Commerce. National Bureau of Standards. Supplement to NBS Circular 553. s.f. p. irr.
16. KONZACK, C. F. et al. Efficient chemical mutagenesis. In Food and Agriculture Organization, The use of induced mutations in plant breeding. Oxford, Pergamon Press, 1965. pp. 49-70.
17. KOOIMAN, H. N. Monograph on the genetics of *Phaseolus* (especially *Ph. vulgaris* and *Ph. multiflorus*). *Bibliographia Genetica* 8:295-413. 1931.
18. LAMPRECHT, H. Zur Genetik von *Phaseolus vulgaris*. XI. Eine Mutante mit einfachen Blättern und Ihre Vererbungsweise. *Hereditas* 20:238-250. 1935.
19. _____. The seven alleles of the gene R of *Phaseolus*. *Agri Hortique Genetica* 5(1-2):46-64. 1947.
20. LAWLEY, P. D. y BROOKES, P. Acidic dissociation of 7:9 dialkylguanines and its possible relation to mutagenic properties of alkylating agents. *Nature* 192:1081-1082. 1961.

21. LOVELESS, A. y HOWARTH, S. Mutation of bacteria at high levels of survival by ethyl methanesulfonate. *Nature* 184:1780-1782. 1959.
22. MOH, C. C. Seed-coat color changes induced by ethyl methane-sulfonate in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Mutation Research* 7:469-471. 1969.
23. _____. Mutagenic effect of cycasin in beans. *Mutation Research* 10:251-253. 1970.
24. _____. Mutation breeding in the seed-coat colors of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) *Euphytica* 20:119-125. 1971.
25. _____ y ALAN, J. J. Correlation between seed-coat color and the seedling characters in *Phaseolus vulgaris* L. *Turrialba* 21:173-175. 1971.
26. _____ y NILAN, R. A. Reduced gene transmission in radiation-induced mutant barley. *Journal of Heredity* 47:129-131. 1956.
27. _____ y SMITH, L. An analysis of seedling mutants (spontaneous, atomic bomb-radiation-, and X-ray-induced) in barley and durum wheat. *Genetics* 36:629-640. 1951.
28. NAKAYAMA, R. Genetical studies on kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). II. On the inheritance of hypocotyl color. *Bulletin of the Faculty of Agriculture. Hirosaki University (Japón)* 1(4):80-87. 1958.
29. _____. Genetical studies on kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). IV. On the inheritance of hypocotyl color. *Bulletin of the Faculty of Agriculture. Hirosaki University (Japón)* 2(5):6-13. 1959.
30. PINCHINAT, A. M. La variabilidad de los componentes de rendimiento del frijol. In Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos Alimenticios, 12a Reunión Anual, Managua, Nicaragua, Marzo 28-Abril 2, 1966. Memoria. Nicaragua, 1966. pp. 62-63.
31. PRAKKEN, R. Inheritance of colours and pod characters in *Phaseolus vulgaris* L. I. *Genetica* 16:177-296. 1942.
32. _____. Induced mutation. *Euphytica* 8:270-322. 1959.
33. _____. Inheritance of colours in *Phaseolus vulgaris* L. II. A critical review. *Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen (Holanda)* 70(23):1-38. 1970.

34. SHAW, J. K. y NORTON, J. B. The inheritance of seed coat color in garden beans. Massachusetts Agriculture Experiment Station. Bulletin no. 135. 1918. pp. 59-104.
35. SIGURBJÖRNSSON, B. Induced mutations in plants. Scientific American 224:86-93. 1971.
36. SMITH, F. L. A genetic analysis of red seed-coat color in *Phaseolus vulgaris* L. Hilgardia 12:553-621. 1939.
37. _____. Seed-coat genes in six commercial varieties of beans. Hilgardia 31:1-14. 1961.
38. SMITH, H. H. Radiation in the production of useful mutations. Botanical Review 24:1-24. 1958.
39. STRAUSS, B. S. Specificity of the mutagenic axiom on the alkylating agents. Nature 191:730-731. 1961.
40. SWAMINATHAN, M. S., CHOPRA, V. L. y BHASKARAN, S. Chromosome aberrations and the frequency and spectrum of mutations induced by ethyl methanesulfonate in barley and wheat. Indian Journal of Genetic and Plant Breeding 22:192-207. 1962.
41. WELLENSIEK, S. J. Comparison of the effects of EMS, neutrons, gamma-, and X-rays on peas. In Food and Agriculture Organization. The use of induced mutations in plant breeding. Oxford, Pergamon Press, 1965. pp. 227-235.
42. YARNELL, S. H. Cytogenetics of the vegetable crops. IV. Legumes. Botanical Review 31:247-330. 1965.
43. ZANNONE, L. Effect of mutagenic agents in *Vicia sativa* L. In Food and Agriculture Organization. The use of induced mutations in plant breeding. Oxford, Pergamon Press, 1965. pp. 205-213.