

# Variabilidad genética de *MEDICAGO SATIVA* con el uso de mutágeno químico

*Genetic variability of MEDICAGO SATIVA with the use of chemical mutagen*

DOI: <https://doi.org/10.33262/rmc.v8i4.2956>



**Denny Rafael Córdova Cercado<sup>1</sup>**

Universidad Estatal de Manabí, Universidad Técnica de Babahoyo, Ecuador  
[dcordova@utb.edu.ec](mailto:dcordova@utb.edu.ec) [dcordova3446@utm.edu.ec](mailto:dcordova3446@utm.edu.ec)



**Cesar Omar Moreira Alcívar<sup>2</sup>**

Universidad Estatal de Manabí, Ecuador  
[cesar.moreira@utm.edu.ec](mailto:cesar.moreira@utm.edu.ec)



**Juan Carlos Gómez Villalva<sup>2\*</sup>**

Universidad Técnica de Babahoyo, Ecuador  
[jgomez@utb.edu.ec](mailto:jgomez@utb.edu.ec)

**DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA:** [jgomez@utb.edu.ec](mailto:jgomez@utb.edu.ec)

**Fecha de recepción:** 10/06/2023

**Fecha de aceptación:** 22/09/2023

## RESUMEN

La alfalfa (*Medicago sativa*) es una leguminosa forrajera clave para la industria ganadera. A pesar del alto contenido de proteínas, existen inconvenientes para su uso en las zonas de la costa ecuatoriana por su poca respuesta de adaptación a este clima. Para generar plantas mutantes de alfalfa se impregnó semillas de dos cultivares, granada mejorada y nacional con mutágeno químico Ethyl methane sulfonate (EMS). Se determinó la dosis media letal (DL<sub>50</sub>), se realizó el análisis probit con el software estadístico staff graphic con las variables morfológicas y mortalidad. La DL<sub>50</sub> se determinó en una concentración de 0.60 % y de 0.50 de EMS para la alfalfa nacional granada mejorada respectivamente.

Estos resultados demuestran el potencial del EMS para ser utilizados en semillas de *Medicago Sativa* con el objetivo de generar nuevas variantes genética de esta especie.

**Palabras claves:** Ethyl methane sulfonate, granada mejorada, alfalfa nacional.

### ABSTRACT

Alfalfa (*Medicago sativa*) is a key forage legume for the livestock industry. Despite the high protein content, there are drawbacks for its use in the Ecuadorian coastal areas due to its poor adaptation response to this climate. To generate mutant alfalfa plants, seeds of two cultivars, improved and national pomegranate, were impregnated with the chemical mutagen Ethyl methane sulfonate (EMS). The mean lethal dose (LD50) was determined, the probit analysis was performed with the staff graphic statistical software with the morphological variables and mortality. The LD50 was determined at a concentration of 0.60% and 0.50 EMS for improved national granada alfalfa respectively. These results demonstrate the potential of EMS to be used in *Medicago Sativa* seeds with the aim of generating new genetic variants of this species.

**Keywords:** Ethyl methane sulfonate, improved pomegranate, national alfalfa.

### INTRODUCCIÓN

Por el año de 1950, se lograron cultivares mejorados mediante mutagénesis. La FAO publicó en 1994 que se obtuvieron 1.800 cultivares mediante mutagénesis. A principios del siglo XX se aplicaron técnicas de mutagénesis para obtener individuos rápidamente mutantes y aumentar la variabilidad en las plantas (Rojas *et al.*, 2016). Actualmente, la mayoría de los cultivos explotados en el mundo provienen de cultivares mutados. Por ejemplo, el 70% del trigo (*Triticum aestivum* L.) sembrado en Italia provino de cultivos mutados (González, 2014).

Corrales *et al.* (2019) sugirieron que la inducción de mutaciones podría ser una opción viable para establecer mejora genética. Esto se debe a que la práctica es capaz de inducir mutabilidad con agentes mutagénicos.

El uso de agentes mutagénicos, como el metasulfonato de etilo (EMS), tiene un papel fundamental en la generación de variabilidad (Porch *et al.*, 2009). Uno de los mutágenos químicos más utilizados en los programas de mejoramiento genético es el EMS, que podría producir tolerancia relacionada con agentes fito y entomopatógenos. Esto se debe a que crea muchas mutaciones puntuales en casi todos los géneros estudiados. Además,

la periodicidad de las mutaciones inducidas es independiente del volumen del genoma (Greene *et al.*, 2003; Rojas *et al.*, 2016)

El etil metano sulfonato (EMS) es considerado el mutagénico químico alquilante más poderoso y más recomendado en el tratamiento de semillas, de fácil aplicación y control de los efectos posteriores. La base genética de las mutaciones provocadas por el EMS tiene que ver con que introduce un metilo en la guanina que ya no se aparea con la citosina provocando la transición GC— AT. Teniendo en cuenta que el EMS es un agente alquilante, este solo reacciona con sustancias polares, una de ellas es el agua (Chomon 1972)

Para el empleo de agentes mutagénicos, es necesario determinar la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>), la cual se usará como criterio para definir la dosis mutagénica óptima, que contribuyen al 50 % de letalidad, la determinación de DL<sub>50</sub> es necesaria para producir una alta frecuencia de mutaciones deseables (Hohmann *et al.*, 2005; Arisha *et al.*, 2014).

Corazon-Guivin, M. *et al.*, (2022) citando a Devi y Selvakumar, (2013) manifiestan que la concentración de EMS que produce un 50 % de letalidad (DL<sub>50</sub>) se usa como un indicador de alta frecuencia de mutación.

Clavijo y Cadena (2011), mencionan que la alfalfa (*Medicago sativa*) es una leguminosa que a nivel mundial se le ha reconocido sus beneficios nutritivos como alimento para animales y a su vez es una excelente mejoradora de suelos. Se sabe, que este es un cultivo que se utiliza en climas estacionales, por lo tanto, en las zonas de trópico es poca la información que se tiene sobre su posible uso.

En este contexto, el empleo de EMS en semillas de *Medicago sativa* representa una alternativa viable para aumentar la diversidad genética, generando variantes que permitan aumentar la base genética de esta especie. Sin embargo, la concentración óptima y tiempo de exposición al agente mutagénico en semillas de *Medicago sativa* no ha sido investigado hasta la actualidad. Al respecto, el presente estudio tuvo como objetivo determinar la concentración óptima de EMS en semillas de *Medicago sativa*., la cual reducirá la germinación y/o emergencia de las semillas hasta un 50% (DL<sub>50</sub>).

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación, relacionada con la siembra del material impregnado con EMS, se realizó en la Granja Experimental San Pablo de la Universidad Técnica de Babahoyo, ubicada en

el km. 7,5 de la vía Babahoyo-Montalvo. Las coordenadas geográficas en UTM fueron X: 1,7723946; Y: 79,7102593. La zona presenta un clima tropical húmedo, con una temperatura que oscila entre los 24 y 26 °C, con humedad relativa de 88%, precipitación promedio anual de 1 262 mm, a una altitud de 8 msnm y 990 horas de heliofania de promedio anual.

#### Material vegetal seleccionado

Para la investigación se impregno con EMS 300 gramos de cada una de las variedades de semillas, con un diseño completamente al azar (DCA), con cinco tratamientos incluido el testigo y tres repeticiones, las semillas utilizadas fueron la alfalfa (*Medicago sativa*) Nacional y alfalfa (*Medicago sativa*) Granada Mejorada, variedades comerciales provenientes de la zona de Riobamba en Ecuador.

La impregnación con EMS de las semillas de alfalfa, se realizó en el laboratorio de biotecnología de la Universidad Técnica de Babahoyo con dosis de 0, 0.25, 0.50, 0.75 y 1 % de ethil metano sulfonato.

#### Variables evaluadas

Se evaluó la altura de planta desde el suelo hasta la última inserción del nudo apical de la planta, se registró el diámetro del tallo a 2 cm del suelo utilizando un pie de rey, el número de ramas se contabilizaron el primer nudo desde el suelo hasta el último nudo antes del cogollo de la planta, por último, se contabilizo el número de hojas y ya que la alfalfa al ser de hojas trifoliadas, al número de ramas se las multiplico por tres para determinar la masa forrajera.

#### Procesamiento estadístico

Los datos correspondientes a altura de planta, diámetro de tallo, número de ramas, y número de hojas, fueron sometidos a un análisis de varianza utilizando el paquete estadístico InfoStat y para determinar la significancia estadística entre las medias de los tratamientos, se aplicó la prueba de LSD Fisher al 0,05 % de significancia. Para analizar la relación entre la dosis de impregnación y las variables altura de planta, diámetro de tallo, número de ramas, número de hojas y mortalidad se utilizó análisis de regresión con el modelo lineal probit, utilizando el paquete estadístico Statgraphics Centurión XVI. II. La  $DL_{50}$  se determinó entre las dosis establecidas de 0 a 1 g de EMS.

## RESULTADOS

Como podemos apreciar en la tabla 1, el análisis de la varianza en las variables altura de planta, diámetro del tallo y número de ramas, la impregnación con 0.50 % fue el que obtuvo mejores resultados encontrándose diferencia significativa entre los tratamientos ( $p$  valor  $>5\%$ ).

En cuanto a la variable número de hojas, también se encontró diferencia significativa ( $p$  valor  $>5\%$ ) entre los tratamientos, siendo el tratamiento sin impregnación del mutágeno químico el que alcanzó el mejor promedio con 33.2 hojas por planta.

**Tabla 1. Comportamiento agronómico de alfalfa nacional impregnada con EMS**

Indicador	Dosis EMS				
	0	0.25	0.50	0.75	1.0
Promedio de altura	18.47 <sup>a</sup>	16.97 <sup>ab</sup>	18.88 <sup>a</sup>	6.81 <sup>c</sup>	13.07 <sup>abc</sup>
Diámetro de tallo (cm)	0.16 <sup>a</sup>	0.17 <sup>a</sup>	0.22 <sup>a</sup>	0.14 <sup>a</sup>	0.10 <sup>a</sup>
Promedio de ramas	7.67 <sup>abc</sup>	8.0 <sup>ab</sup>	9.13 <sup>a</sup>	6.93 <sup>abcd</sup>	5.27 <sup>bcd</sup>
Promedio de hojas	33.2 <sup>a</sup>	24.0 <sup>abc</sup>	27.4 <sup>ab</sup>	20.8 <sup>bcd</sup>	15.8 <sup>cd</sup>

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

La tabla 2 nos muestra que en las variables altura de planta y diámetro del tallo el tratamiento que mejor resultado obtuvo fue la impregnación a 0.75%, encontrándose diferencia significativa entre los tratamientos ( $p$  valor  $>5\%$ ).

En cuanto a las variables número de ramas y número de hojas, también se encontraron diferencia significativa entre los tratamientos, siendo el testigo sin irradiar el que alcanzó los mejores promedios, con 6.53 ramas y 19.60 hojas por planta.

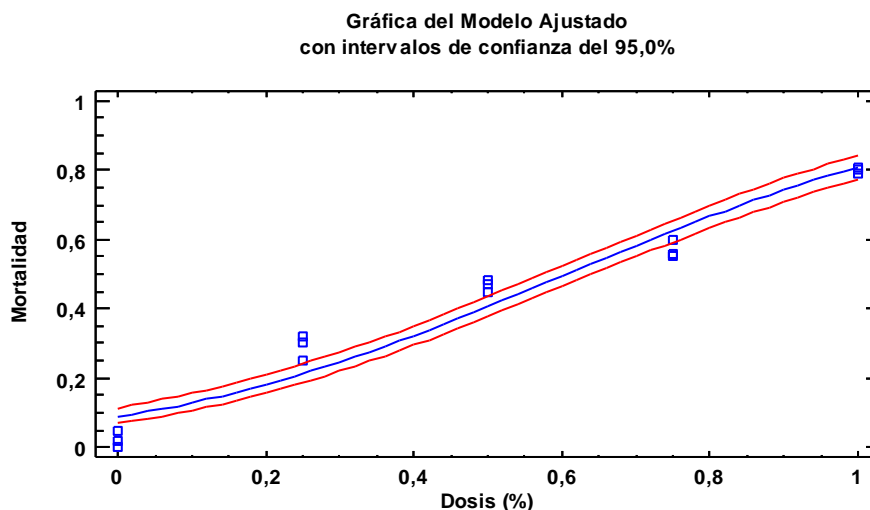
**Tabla 2. Comportamiento agronómico de alfalfa granada mejorada impregnada con EMS**

Indicador	Dosis EMS				
	0	0.25	0.50	0.75	1.0
Promedio de altura	14.93 <sup>ab</sup>	16.53 <sup>ab</sup>	18.70 <sup>a</sup>	19.70 <sup>a</sup>	10.63 <sup>bc</sup>
Diámetro de tallo (cm)	0.11 <sup>a</sup>	0.15 <sup>a</sup>	0.15 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>	0.17 <sup>a</sup>
Promedio de ramas	6.53 <sup>abcd</sup>	4.20 <sup>d</sup>	4.47 <sup>cd</sup>	4.80 <sup>bcd</sup>	5.93 <sup>abcd</sup>
Promedio de hojas	19.60 <sup>bcd</sup>	12.60 <sup>d</sup>	13.40 <sup>d</sup>	14.40 <sup>cd</sup>	17.80 <sup>bcd</sup>

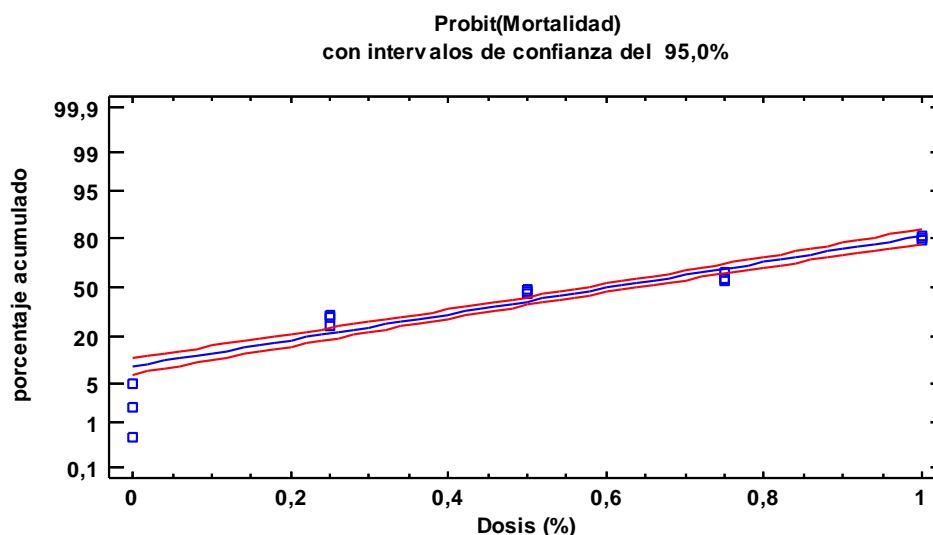
*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

En las gráficas 1 y 2 se observa que las dosis de EMS tienen un efecto sobre la mortalidad de semillas tratadas durante 1 día. Se observa que las dosis altas 0.75 y 1.00 provocan

mayor mortalidad de las semillas tratadas, respecto a las dosis bajas 0.25 y 0.50 que presentan menor mortalidad que la dosis 0.00 (control), es decir, las dosis bajas aumentan el porcentaje de germinación de las semillas tratadas.

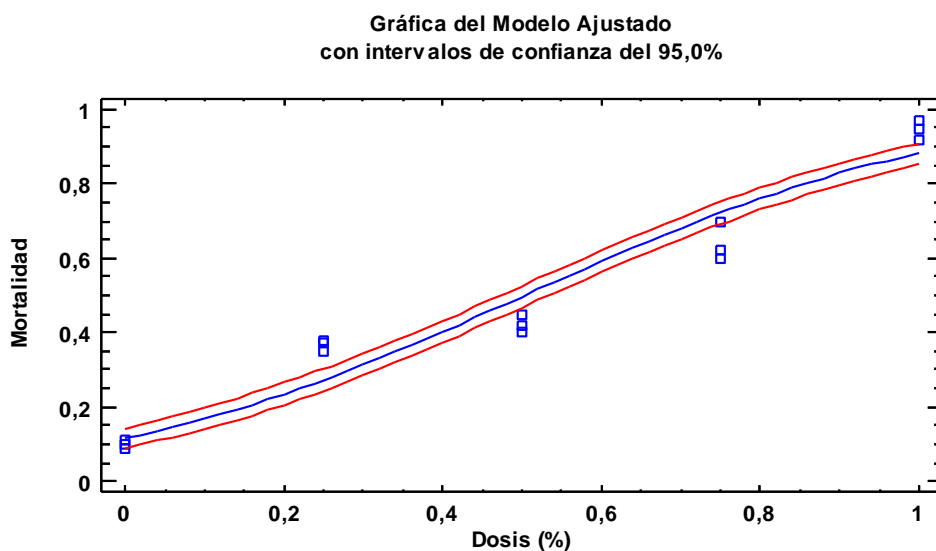


**Figura 1. Gráfica del modelo ajustado con intervalos de confianza del 95.0% de la mortalidad de semillas de *Medicago sativa* nacional tratadas con EMS.**

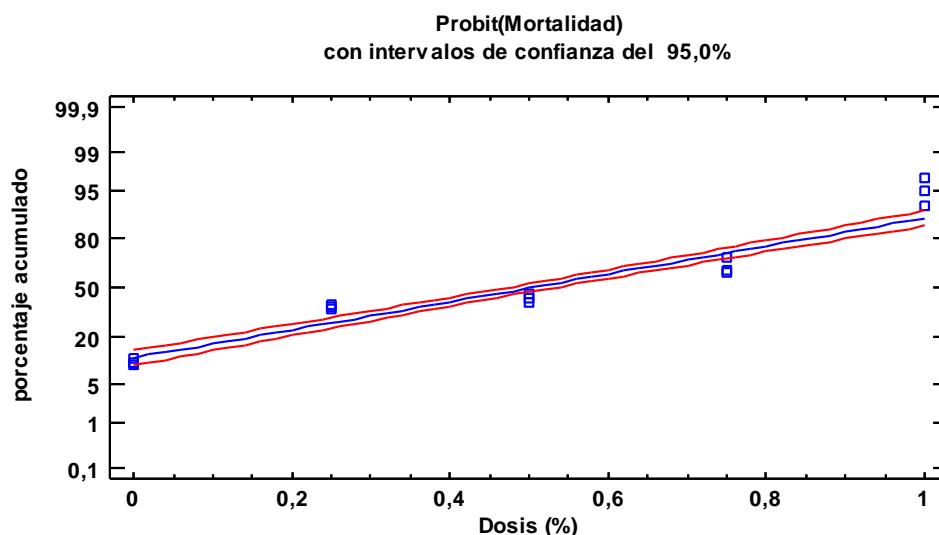


**Figura 2. Gráfica Probit con intervalos de confianza del 95.0% de la mortalidad de semillas de *Medicago sativa* nacional tratadas con EMS.**

En las gráficas 3 y 4 se observa que las dosis de EMS tienen un efecto sobre la mortalidad de semillas tratadas durante 1 día. Se observa que las dosis altas 0.75 y 1.00 provocan mayor mortalidad de las semillas tratadas, respecto a las dosis bajas 0.25 y 0.50 que presentan menor mortalidad que la dosis 0.00 (control), es decir, las dosis bajas aumentan el porcentaje de germinación de las semillas tratadas.



**Figura 3. Gráfica del modelo ajustado con intervalos de confianza del 95,0% de la mortalidad de semillas de *Medicago sativa* granada mejorada tratadas con**



**Figura 4. Gráfica Probit con intervalos de confianza del 95,0% de la mortalidad de semillas de *Medicago sativa* granada mejorada tratadas con EMS.**

La  $DL_{50}$  se determinó entre las dosis establecidas de 0 a 1% de EMS, en este análisis se obtuvo una correlación negativa y altamente significativa entre las dosis de EMS y las variables evaluadas. Lo que indica que el modelo resultó eficiente para determinar la  $DL_{50}$ . Sin embargo, la variable mortalidad con el análisis probit fue el que mejor se ajustó con un  $R^2$  90.28 con un promedio de 0.6075 % (p valor >5%) para la alfalfa nacional y un  $R^2$  91.23 con un promedio de 0.50 % (p valor >5%) para la alfalfa granada mejorada.

## DISCUSION

En trabajos realizados por Corazon-Guivin *et al.*, (2022) en donde evaluaron el uso del Ethyl Methanesulphonate (EMS) en semillas de *Plukenetia volubilis* L. (sacha inchi) para determinar la concentración óptima de EMS que redujera la germinación y/o emergencia de las semillas hasta un 50%, y evaluar las alteraciones morfológicas y fisiológicas en plántulas de *P. volubilis* durante la primera generación, los resultados mostraron que la dosis de 3% de EMS con 30 horas de exposición, redujo hasta un 50% la emergencia de plántulas, valor considerado como la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) para *P. volubilis*. Estos resultados difieren con los de nuestro estudio al establecer la  $DL_{50}$  por debajo del 1 % de EMS.

Joya-Dávila *et al.*, (2023) en el estudio sobre el mejoramiento genético del cafeto, tuvo como objetivo determinar los cambios en la morfología y producción de metabolitos secundarios en plantas de cafeto generadas a partir de líneas celulares tratadas con EMS, los callos de *Coffea arabica* cv., Borbón fueron expuestos a nueve concentraciones de EMS, en el determinaron que la supervivencia y crecimiento del callo disminuyó con el aumento de la concentración de EMS (dosis letal media: 148.8 mM). Resultados que contrastan con los obtenidos en el estudio sobre la impregnación de EMS en *Medicago sativa* en el que se determinó la  $DL_{50}$  en 0.60 % para esta especie.

Por otra parte, en trabajos realizados por Wijekoon *et al.*, (2020) en el que impregnaron diferentes variedades de semillas de *Medicago sativa*, obtuvieron como resultado que todas las variedades respondían a una  $DL_{50}$  entre 0.5 1 % de EMS, con un tiempo de remojo de 6 horas; resultados que difieren con los de las variedades nacional y granada mejorada del presente estudio en la que el tiempo de remojo con mejores resultados fue de 24 horas.



## CONCLUSIONES

Las dosis de 0.5 Y 0.6 % de EMS con un tiempo de exposición de 24 hrs., redujo hasta un 50% la emergencia de plántulas de *Medicago sativa*. Así mismo, registramos alteraciones fenotípicas en altura de planta, diámetro de tallo, número de ramas y número de hojas con el incremento de dosis del mutágeno químico; siendo el rango entre 0.5 y 0.6 % recomendables para generar poblaciones mutantes en *Medicago sativa*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arisha, M. H., Liang, B. K., Muhammad Shah, S. N., Gong, Z. H., & Li, D. W. (2014). Kill curve analysis and response of first generation *Capsicum annum* L. B12 cultivar to ethyl methane sulfonate. *Genetics and Molecular Research*, 13(4), 10049–10061. <https://doi.org/10.4238/2014.November.28.9>
- Chomon, J. (1972). inducción de mutaciones de color con metano sulfato de etilo en el frijol, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA, Turrialba, Costa Rica. <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/2387>
- Clavijo Villamizar, E., y Cadena Castro, P. C. (2011). Producción y calidad nutricional de la alfalfa (*Medicago sativa*) sembrada en dos ambientes diferentes y cosechada en distintos estadios fenológicos. Retrieved from. <https://ciencia.lasalle.edu.co/zootecnia/120>
- Corazon-Guivin, Mike; Arévalo Rojas, Manuel; Acosta Córdoba, Ronny; Chirinos Hinojosa, Danny; Valverde-Iparraguirre, Jorge; Ruiz-Sánchez, María Cerna-Mendoza, Agustín; Guerrero-Abad, Juan. (2022). Determinación de la DL50 de Metanosulfonato de Etilo (EMS) para la inducción de cambios morfológicos y fisiológicos en plántulas de *Plukenetia volubilis*. *Rev. agrotec. amaz.* 2(1): e209; ene-jun, 2022.e-ISSN: 2710-0510. <http://209.45.90.234/index.php/raa/article/view/209/392>
- Corrales-Lerma, R., Avendaño-Arrazate, C., Morales-Nieto, C., Santellano-Estrada, E., Villarreal-Guerrero, F., Melgoza-Castillo, A. Álvarez-Holguín, A. & Gómez-Simuta, Y. (2019). Radiación gamma para inducción de mutagénesis en pasto rosado (*Melinis repens* (Willd.) Zizka). *Acta Universitaria*, 29, 1-10. <https://doi.org/10.15174/au.2019.1847>

- Gómez, J., Aguirre, L., Gómez, L., Reyes, W., Rodríguez, J. & Arana, L. (2020). Dosis letal media para inducir mutaciones, con rayos gamma, en pasto janeiro (*Eriochloa polystachya* Kunth). *Revista de Producción Animal*, 32(1), 73-83. <https://revistas.reduc.edu.cu/index.php/rpa/article/view/e339>
- Gómez Villalva, J., Cobos Mora, F., Hasang Moran, E., Eguluz de la Barra, A., & Cortez Herrera, I. (2022). Mutagénesis inducida en pasto janeiro por metasulfonato de etilo y su efecto en el control del salivazo. *Revista De La Facultad De Agronomía De La Universidad Del Zulia*, 39 (3), e223938. Obtenido de <https://produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/38556>
- Gómez, J. C., Salinas Lozada, C., Tierra Cedeño, F., & Rodríguez Álava, J. (2020). Intervalos de corte de pasto Janeiro (*Eriochloa polystachya* Kunth) M2 irradiado con rayos gamma. *Journal of Science and Research*, 5(CININGEC), 122–134. Recuperado a partir de <https://revistas.utb.edu.ec/index.php/sr/article/view/1002>
- Gómez Villalva Juan Carlos, Hugo Javier Alvarado Álvarez, Fernando Javier Cobos Mora, Lenin Pedro Arana Vera. (2021). *Mejoramiento Genético en Pasto Janeiro (Eriochloa polystachya)*. Editado por: Universidad Técnica de Babahoyo. ISBN: 978-9942-8949-3-9 (eBook). Primera Edición, septiembre 2021. [https://www.researchgate.net/profile/Juan-Gomez-151/publication/367348172\\_adminMEJORAMIENTOGENETICOENPASTOJANEIRO\\_1/links/63ceb0e3d7e5841e0bf00f82/admin-MEJORAMIENTO-GENETICO-EN-PASTO-JANEIRO-1.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Juan-Gomez-151/publication/367348172_adminMEJORAMIENTOGENETICOENPASTOJANEIRO_1/links/63ceb0e3d7e5841e0bf00f82/admin-MEJORAMIENTO-GENETICO-EN-PASTO-JANEIRO-1.pdf)
- González, M. (2014). Desarrollo de una plataforma de tilling en melón (*Cucumis melo* L.). Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España. 282 p. <https://ddd.uab.cat/record/127025>.
- Greene, E., Codomo, C., Taylor, N., Henikoff, J., Till, B., Reynolds, S., Enns L., Burtner C., Johnson, J., Odden, A. & Steven, L. (2003). Spectrum of Chemically induced mutations from large-scale reverse genetic screening in *Arabidopsis*. *Genetics*, 164(2), 731–740. <https://doi.org/10.1093/genetics/164.2.731>
- Hohmann, U., Jacobs, G., Jung, C., (2005). An EMS mutagenesis protocol for sugar beet and isolation of non-bolting mutants. *Plant breeding*, 124, 317–321. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2005.01126.x>

Joya-Dávila José Gregorio, Federico Antonio Gutiérrez-Miceli, María Celina Luján-Hidalgo, Leslie Alondra Serrano-Gómez, Benigno Ruíz-Sesma. (2023). Cambios bioquímicos y morfométricos en *Coffea arabica* posterior a un tratamiento con metanosulfonato de etilo. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad de Sonora* ISSN: 1665-1456. 7º volumen 997, Número. DOI: 10.18633/biotecnia.v25i3.1969.

<https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/view/1969/896>

Porch, T., Blair, M., Lariguet, P., Galeano, C., Pankhurst, C. & Broughton, W. (2009). Generation of a Mutant Population for TILLING Common Bean Genotype BAT 93. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134(3), 348-355.

<https://doi.org/10.21273/JASHS.134.3.348>

Rojas, L., Collado, R., León, A., Rivero, L., Ocaña, B., Hernández, M., Veitía, N., Martirena, A., Torres, D. & García, L. (2016). Concentración óptima de metano sulfonato de etilo en *Phaseolus vulgaris* L. C.V. ‘DOR 364’ para inducir variaciones fenotípicas. *Bioteología Vegetal*, 16(3), 179-188.

<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/526>

Wijekoon, C. P., Singer, S. D., Weselake, R. J., Petrie, J. R., Singh, S., Jayawardhane, K. N., Shah, S., Chen, G., Eastmond, P. J., & Acharya, S. N. (2020). Enhancement of total lipid production in vegetative tissues of alfalfa and sainfoin using chemical mutagenesis. *Crop Science*, 60(6), 2990–3003. Portico.

<https://doi.org/10.1002/csc2.20027>