UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

UNIDAD DE POSGRADO

MAESTRÍA EN MANEJO FORESTAL SOSTENIBLE

Proyecto de Investigación previo a la obtención del Grado Académico de Magister en Manejo Forestal Sostenible

Tema:

"Aplicación de distintas dosis de etilmetanosulfonato (EMS) en semillas y plántulas de *Gmelina arborea* Roxb. (melina) en etapa de vivero"

Autora:

Ing. Priscila Katherine Bautista Zambrano

Director:

Dr. Camilo Mestanza Uquillas

Quevedo – Ecuador

2020

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El suscrito, Dr. Camilo Mestanza Uquillas, en calidad de Director de Proyecto de Investigación, previa la obtención del grado académico de Magíster en Manejo Forestal Sostenible.

CERTIFICA

Que la Ing. Priscila Katherine Bautista Zambrano autora del Proyecto de Investigación titulado: **"Aplicación de distintas dosis de etilmetanosulfonato (EMS) en semillas y plántulas de *Gmelina arborea* Roxb. (melina) en etapa de vivero"**, ha sido revisada en todos sus componentes por lo que se autoriza su presentación entre el tribunal respectivo.

Atentamente;

Dr. Camilo Mestanza Uquillas
DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo**, Priscila Katherine Bautista Zambrano,** declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

Atentamente;

Ing. Priscila Katherine Bautista Zambrano
Autora

DEDICATORIA

A Dios, por las fuerzas y determinación en mi vida para realizar mis metas y objetivos propuestos.

A mis padres, por darme las fuerzas y valentía en mi vida, motivándose cada día a superarme personal y profesionalmente.

A mi demás familia, que han sido un pilar de apoyo fundamental para lograr mi objetivo.

A mis hijos, por ser mi principal motivación para superar cualquier situación que se presente en mi día a día.

Priscila Katherine Bautista Zambrano

AGRADECIMIENTOS

Como autora de la presente investigación quiero dejar constancia de mi sincero agradecimiento a las personas que hicieron posible la culminación de la misma.

A mi Director del Proyecto de Investigación Dr. Camilo Mestanza Uquillas, por su enseñanza, apoyo y estimulación para la exitosa culminación de este trabajo de investigación.

A mis padres por ser las personas que me han apoyado para concluir mi vida profesional.

A mis amigos y compañeros que han formado parte de mi vida profesional a los que me encantaría agradecerles su amistad, apoyo ánimo y compañía en los buenos y malos momentos.

A los docentes de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, que forjaron mis conocimientos, enseñanzas y por apoyo para la culminación de este trabajo de investigación.

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, institución digna que me acogió como estudiante y forjo mis conocimientos.

Priscila Katherine Bautista Zambrano

PRÓLOGO

Las especies forestales al igual que todas aquellas especies de plantas o animales, de interés económico o aprovechamiento por parte de ser humano, requieren la exploración de técnicas de manejo o tecnologías que promuevan la sostenibilidad de las unidades de producción, ya sean estas en mejoramiento de especies ya explotadas, descubrimiento de nuevas especies o tecnologías de manejo de las mismas.

Con el desarrollo de las técnicas de mejoramiento vegetal, se ha buscado desarrollar semillas que den origen a plantas de mejores características tanto de adaptación, así como de rendimiento. Esto ha sugerido la aplicación de agentes mutagénicos para inducir mutagénesis, dentro de los cuales se tiene que el etilmetanosulfonato (EMS), tiene reportes de su aplicabilidad para la obtención de plantas mutantes con características deseadas, sin embargo, de igual manera hay deportes que los resultados dependen en gran medida del grado de letalidad que este exprese a través de la concentración de este mutágeno a la que se sometan las semillas antes de ser sembradas, así como del tiempo de tratamiento.

Al momento son pocas las investigaciones sobre la aplicación de etilmetanosulfonato en especies forestales, principalmente en Ecuador, dónde no se ha centrado esfuerzos en solventar y mitigar dicho desconocimiento. Siendo, la melina una especie de importancia económica para el aprovechamiento forestal, es importante asegurar su productividad mediante la adopción de técnicas que promuevan dicho indicador, ya que es evidente que

a la fecha no existe documentación alguna sobre inducción de mutagénesis de ningún tipo en el área de influencia de la provincia de Los Ríos.

La elección de una concentración de aplicación de etilmetanosulfonato , es de gran ayuda dentro de un programa de mejoramiento de especies forestales enfocadas en inducción de mutagénesis, ya que si se sobrepasa de la misma se puede llegar a tener una elevada merma de germinación de la semilla, así como una elevada tasa de mortalidad, por lo que el presente estudio toma como referencia dicha problemática, para identificar la dosificación que favorezca la respuesta de las plántulas obtenidas de semillas de melina tratadas con dicho mutágeno.

RESUMEN

La inducción de mutagénesis en semillas es unas de las alternativas de tratamiento para introducir variabilidad tanto en la germinación y por ende desarrollo de plántulas. Ante la ausencia de un protocolo de mutagénesis con etilmetanosulfonato establecido para esta especie, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de la aplicación de distintas dosis de etilmetanosulfonato (EMS) en semillas de melina (*Gmelina arborea*) sobre el crecimiento de las plántulas en etapa de vivero. La investigación se realizó en los invernaderos de la empresa Plantabal ubicada en el Km 4.5 de la vía Quevedo – Valencia, provincia de Los Ríos. Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos (T1: Testigo absoluto (Control - Agua), T2: 0.3% EMS, T3: 0.6% EMS y T4: 1.0% EMS) en cinco repeticiones. Los resultados demuestran que tanto la germinación de las semillas de melina sometidas mutaciones por etilmetanosulfonato, así como las plántulas provenientes de las mismas fueron restringidas por este agente mutágeno, evidenciándose que a medida que se incrementó la dosis descendiendo de 89.10% en ausencia del mutágeno hasta 53.86% al aplicarlo en dosificación de 1.0 %. Además, las concentraciones de etilmetanosulfonato aplicadas en semillas de melina no mostraron diferencias significativas en cuanto a la altura de plantas y diámetro del tallo, sin embargo, la concentración de 0.6 de etilmetanosulfonato produjo mayor crecimiento y engrose con 21.34 y 0.11 cm en un lapso de 30 días, respectivamente.

Palabras claves: inducción de mutaciones, etilmetanosulfonato, melina.

ABSTRACT

The induction of mutagenesis in seeds is one of the treatment alternatives to introduce variability in both germination and therefore seedling development. In the absence of a protocol for mutagenesis with ethyl methane sulphonate established for this species, this research aimed to evaluate the effect of the application of different doses of ethyl methane sulphonate (EMS) on melina seeds (*Gmelina arborea*) on growth of seedlings in nursery stage. The research was carried out in the greenhouses of the Plantabal company located at Km 4.5 of the Quevedo - Valencia road, province of Los Ríos. A completely randomized design was used with four treatments (T1: Absolute Witness (Control - Water), T2: 0.3% EMS, T3: 0.6% EMS and T4: 1.0% EMS) in five repetitions. The results show that both the germination of the melin seeds subjected to mutations by ethyl methane sulfate, as well as the seedlings from them were restricted by this mutagenic agent, evidencing that as the dose increased decreasing from 89.10% in the absence of mutagen up to 53.86% when applied in 1.0% dosage. In addition, the concentrations of ethyl methane sulfate applied in melina seeds did not show significant differences in plant height and stem diameter, however, the concentration of 0.6 of ethyl methane sulfate produced greater growth and thickening with 21.34 and 0.11 cm within 30 days, respectively.

Keywords: induction of mutations, ethyl methane sulfate, melina.

TABLA DE CONTENIDO

Portada i

Certificación de culminación del Proyecto de Investigación ii

Declaración de autoría y cesión de derechos iii

Dedicatoria iv

Agradecimientos v

Prólogo vi

Resumen viii

Abstract ix

Tabla de contenido x

Índice de tablas xiii

Índice de figuras xiii

Índice de anexos xiii

Introducción 1

CAPÍTULO I: MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN 4

1.1. Contextualización y ubicación de la problemática 5

1.2. Situación actual de la problemática 5

1.3. Problema de investigación 6

1.3.1. Problema general 6

1.3.2. Problemas derivados 6

1.4. Delimitación del problema 7

1.5. Objetivos 8

1.5.1. Objetivo general 8

1.5.2. Objetivos específicos 8

1.6. Justificación 8

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO 11

2.1. Fundamentación conceptual 12
2.1.1. Mejoramiento genético forestal 12
2.1.2. Mutagénesis 12
2.1.3. Mutágeno 13
2.1.4. Etilmetanosulfonato (EMS) 14
2.2. Fundamentación teórica 16
2.2.1. Generalidades de la mutagénesis 16
2.2.2. Tipos de mutágenos 17
2.2.3. Niveles de mutación 19
2.2.4. Mutagénesis por Etilmetanosulfonato (EMS) 20
2.2.5. Importancia de la melina 26
2.3. Fundamentación legal 28
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN 36
3.1. Tipo de investigación 37
3.2. Métodos de investigación 37
3.3. Construcción metodológica del objeto de investigación 38
3.3.1. Diseño experimental 38
3.3.2. Técnicas de investigación 38
3.3.3. Manejo del ensayo 38
3.3.4. Material genético 39
3.3.5. Tratamientos evaluados 39
3.4. Elaboración del marco teórico 39
3.5. Recolección de la información 40
3.5.1. Variables evaluadas 40
3.5.1.1. Porcentaje de germinación 40
3.5.1.2. Sobrevivencia 41

3.5.1.3. Altura de plantas 41
3.5.1.4. Diámetro del tallo 41
3.6. Procesamiento y análisis 42
3.7. Recursos humanos y materiales 42
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN 44
4.1. Resultados 45
4.1.1. Efecto del etilmetanosulfonato en la germinación de semillas de melina 45
4.1.2. Sobrevivencia de plántulas provenientes de semillas tratadas con distintas concentraciones de etilmetanosulfonato 46
4.1.3. Efecto de las diferentes concentraciones de EMS sobre la altura y diámetro del tallo de plántulas de melina 47
4.1.3.1. Altura de planta a los 30 días (cm) 47
4.1.3.2. Altura de planta a los 60 días (cm) 48
4.1.3.3. Diámetro del tallo a los 30 días (cm) 49
4.1.3.4. Diámetro del tallo a los 60 días (cm) 50
4.1.3.5. Crecimiento de las plantas (cm) 51
4.1.3.6. Engrose del tallo (cm) 51
4.1.3.7. Correlación entre la germinación y las concentraciones de etilmetanosulfonato 52
4.2. Discusión 54
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 57
5.1. Conclusiones 58
5.2. Recomendaciones 59
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 60
ANEXOS 65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Esquema del análisis de varianza utilizado en el ensayo 42
Tabla 2. Porcentaje de germinación de semillas..... 45
Tabla 3. Porcentaje de plántulas 46
Tabla 4. Altura de plantas a los 30 días (cm) 47
Tabla 5. Altura de plantas a los 60 días (cm) 48
Tabla 6. Diámetro del tallo a los 30 días (cm)..... 49
Tabla 7. Diámetro del tallo a los 60 días (cm)..... 50
Tabla 8. Crecimiento de plantas a los 60 días con respecto al día 30 (cm) 51
Tabla 9. Engrose del tallo de plantas a los 60 días con respecto al día 30 (cm)..... 52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Correlación entre las concentraciones de etilmetanosulfonato (EMS) y el porcentaje de germinación 53

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Certificado del URKUND para la prevención de coincidencia y/o plagio académico. 66
Anexo 2. Análisis de varianza del porcentaje de germinación 67
Anexo 3. Análisis de varianza del porcentaje de sobrevivencia 67
Anexo 4. Análisis de varianza de la altura de plantas a los 30 días 67
Anexo 5. Análisis de varianza de la altura de plantas a los 60 días 67
Anexo 6. Análisis de varianza del diámetro del tallo a los 30 días 68
Anexo 7. Análisis de varianza del diámetro del tallo a los 60 días 68

Anexo 8. Análisis de varianza del crecimiento de plántulas 68

Anexo 9. Análisis de varianza del engrose del tallo 68

INTRODUCCIÓN

La alta demanda de productos forestales sugiere la necesidad de crear plantaciones altamente productivas. Esto es posible solo si seleccionan correctamente las especies desde el punto de vista ecológico y económico, y se proyectan programas de mejora genética, que además de elevar los rendimientos y la resistencia a factores adversos, contribuya a la ampliación y conservación de la base genética de estas especies.

La melina a pesar de ser una especie exótica, posee a sus cualidades particulares como su versatilidad, rápido crecimiento, estética y veteado óptimos y mediana resistencia ha ingresado a países tropicales de la región como Ecuador y a otros a nivel del mundo, supliendo necesidades de madera en la industria, ebanistería y sectores de la construcción, entre otras. Es uno de los mejores árboles para pulpa y papel, sus hojas dan un forraje apreciado por el ganado, la corteza, raíces y frutos presentan propiedades medicinales, es una excelente especie melífera, que además de plantar en plantaciones extensivas, se puede plantar en avenidas y jardines como planta ornamental (Jiménez, 2016).

Con el desarrollo del mejoramiento genético forestal, han surgido múltiples técnicas que buscan la obtención de plantas con mejores características, destacándose tanto técnicas físicas como químicas, teniendo como finalidad la inducción de cambios en su morfología y fenología que provee mayor adaptabilidad, resistencias a estrés, así como incremento dentro de la productividad de las especies forestales. Dentro de estas técnicas se tiene a la inducción de mutagénesis como una alternativa viable, teniéndose reportes de su efectividad en la obtención de buenos resultados en especies tanto agrícolas como forestales, logrando obtenerse plantas con más vigor, siendo el etilmetanosulfonato uno

de los agentes mutagénicos que han evidenciado resultados alentadores para ampliar su uso en la mejora genética mediante este mutágeno.

Mediante la aplicación de etilmetanosulfonato a diferentes dosis sobre semillas, se busca explorar y a la vez identificar la respuesta de dichas dosis sobre diferentes aspectos ligados al crecimiento y desarrollo de plántulas, para de este modo contribuir a la inducción de mejoramiento de plantas de especies forestales, al iniciar con un tratamiento de la semilla, el cual es más adaptable y adoptable, ya que en esta etapa se puede lograr un tratamiento más fácil y homogéneo para la inducción de mutagénesis.

En cuanto a la aplicación de EMS en semillas de melina no existen antecedentes de resultados obtenidos en dicha especie, por lo que es importante su evaluación, ya que ayudaría notoriamente tanto a productores como técnicos y demás personas inmersas en el proceso de producción de dicha especie forestal que con el tiempo se ha convertido en una de gran importancia económica para el país.

El presente documento consta de diferentes capítulos que exponen sistemáticamente las bases conceptuales, metodología y resultados esperados de la investigación en cuestión.
En el CAPÍTULO I se presenta el marco contextual de la investigación, que da una vista generalizada y a la vez marca el punto de partida para la ejecución de la investigación a realizarse, exponiendo la situación problemática, objetivos y justificación.

Las fundamentaciones tanto conceptuales, teóricas y legales se presentan en los diferentes contenidos del CAPÍTULO II, que se divide en las tres fundamentaciones descritas.

La correspondiente metodología de la investigación seguida en el ensayo, se expone en el CAPÍTULO III, describiendo tipo de investigación, métodos, fuentes de información a consultarse, diseño de la investigación, tratamientos a evaluarse y las respectivas variables de respuesta.

Los Resultados y Discusión corresponden al CAPÍTULO IV, en el cual se detallan los resultados obtenidos en el proceso de investigación, con la respectiva discusión con fuentes bibliográficas que sustentan y corroboran los resultados obtenidos.

En el CAPÍTULO V se enlistan las principales conclusiones y recomendaciones del estudio, en base al análisis e interpretación de los resultados y principales hallazgos observados a lo largo del desarrollo del proceso investigativo.

Finalmente se adjuntan las correspondientes referencias bibliográficas y los anexos que sustentan la investigación.

CAPÍTULO I

MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Contextualización y ubicación de la problemática

En la zona de influencia del cantón Quevedo, existen varias empresas, y además personas que ven en la melina como una alternativa con alta viabilidad económico debido a sus principales características productivas y su precocidad en el aprovechamiento forestal de la misma, sin embargo, debido a las características del mercado donde se comercializa dicha madera o empresas que compran dichas plantaciones, se vuelve más necesario obtener plantas de alto vigor, que puedan representar una alta productividad, pero no se ha explorado alternativas que puedan solventar dicha necesidad.

La investigación se realizó en la empresa Plantabal ubicada en el Km 4.5 de la vía Quevedo – Valencia, provincia de Los Ríos.

1.2. Situación actual de la problemática

Es poco lo que se ha explorado en mutagénesis en especies forestales, específicamente en melina, y, siendo esta especie una de las de mayor interés para el aprovechamiento forestal, se torna imprescindible la conducción de investigaciones encaminadas a asegurar la sostenibilidad y productividad de esta especie, entre lo que se considera a la mutagénesis inducida con EMS como una posible alternativa, para aportar a dicho objetivos, sin embargo, no se han adentrado en aspectos específicos de la aplicación de este mutágeno sobre semillas de dicha especie.

Lo expresado anteriormente, se vuelve preocupante al evidenciar poca iniciativa por parte de personas o entidades involucradas en el aprovechamiento de melina, por lo que es de suma necesidad efectuar una investigación que parta de la identificación de la dosis idónea de EMS que produzca la mejor respuesta en términos de germinación, sobrevivencia, altura de plantas y grosor del tallo.

Además, el actual mejoramiento de la melina se basa exclusivamente en cruzas, jardines clonales y huertos semilleros. Esto ha generado una baja diversidad, generando lo que se conoce como efecto "cuello de botella", debido a que solo se han seleccionado pocos individuos como progenitores. La pérdida de diversidad en una especie, genera problemas en germinación, susceptibilidad a plagas y enfermedades, lo que finalmente desemboca en una baja producción y rentabilidad.

1.3. Problema de investigación

1.3.1. Problema general

¿Cuál el efecto de la aplicación de distintas dosis de etilmetanosulfonato (EMS) en semillas de *Gmelina arborea* (melina) y el crecimiento de las plántulas en etapa de vivero?

1.3.2. Problemas derivados

¿Cuál es el efecto del etilmetanosulfonato en la germinación de semillas de melina?

¿Qué porcentaje de sobrevivencia presentan las plántulas provenientes de semillas tratadas con distintas concentraciones de EMS?

¿Cuál es el efecto de las diferentes concentraciones de EMS sobre la altura y diámetro del tallo de plántulas de melina?

1.4. Delimitación del problema

Campo: Silvicultura

Área: Producción

Línea de investigación: Manejo silvicultural, protección de plantaciones y bosques

Aspectos: Aplicación de EMS en la inducción de mutaciones en semilla de melina.

Tiempo: enero a junio del 2020

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la aplicación de distintas dosis de etilmetanosulfonato (EMS) en semillas de melina (*Gmelina arborea*) y el crecimiento de las plántulas en etapa de vivero.

1.5.2. Objetivos específicos

- Analizar la respuesta de la germinación de semillas de melina sometidas a mutagénesis por EMS.

- Determinar el porcentaje de sobrevivencia de plántulas provenientes de semillas tratadas con distintas concentraciones de EMS.

- Determinar el efecto de las diferentes concentraciones de EMS sobre la altura y diámetro del tallo de plántulas de melina.

1.6. Justificación

La obtención de cultivares capaces de enfrentar las condiciones adversas mencionadas sin afectar su rendimiento, es un propósito fundamental de los programas de mejoramiento genético en especies tanto forestales como de cualquier importancia económica (Rojas *et al*., 2016).

El empleo de la mutagénesis inducida puede ser una vía para lograr inducir mutegénesis a fin de constituir un mejoramiento genético. El uso de agentes mutagénicos, como el metano sulfonato de etilo (EMS, por sus siglas en inglés), ha jugado un papel fundamental en este sentido (Porch *et al.*, 2009). El EMS es el agente mutagénico más utilizado en las plantas para desarrollar grandes poblaciones de mutantes, ya que crea un alto número de mutaciones puntuales, en casi todas las especies estudiadas. La frecuencia de mutaciones inducidas es independiente del tamaño del genoma (Greene *et al*., 2003). Pero, las poblaciones mutantes antes de ser desarrolladas, deben ser evaluadas con sus respectivos protocolos, para así poder delimitar la dosis más adecuada a emplear, la misma que puede variar de acuerdo a la especie en la cual se pretende lograr inducir dichas mutaciones.

Con la aplicación de etilmetanosulfonato se han evidenciado reportes de beneficios para las plántulas provenientes de semillas tratadas con dicho agente mutágeno, y considerando la importancia de la melina para el desarrollo del sector silvícola del país, que ha atraído inversiones de medianos y grandes productores, que buscan en dicha especie forestal una inversión viable, se torna razonable la conducción del presente estudio, al buscar aportar significativamente a la obtención de plantas de las mejores características posibles, que justifique la aplicación de etilmetanosulfonato sobre las semillas de la mencionada especie forestal.

Por lo expuesto anteriormente se justifica la importancia de la presente investigación ya que a través de este se plantea la necesidad de determinar la dosis de mejores resultados de vigor y viabilidad de semillas de melina, así como la medición de los efectos de diferentes dosis de etilmetanosulfonato sobre dichos parámetros, lo que servirá de

información de referencia para futuros estudios, sobre todo, para poder crear una población mutante a gran escala, así como para personas dedicadas a la producción de esta especie forestal.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Fundamentación conceptual

2.1.1. Mejoramiento genético forestal

Es el proceso de manejo de los recursos genéticos. A través de este proceso el monto o cantidad y la organización de la variabilidad genética de una población en particular es manejada por ciclos recurrentes de selección y mejora. Su finalidad es el aumento de la productividad. El mejoramiento genético forestal aplica los principios básicos de la genética al manejo de las especies forestales; dentro de sus objetivos fundamentales se encuentran el aumento de la productividad y la adaptabilidad de dichas especies, así como la conservación a largo plazo de la diversidad genética existente (Sotolongo & Cobas, 2013).

2.1.2. Mutagénesis

Se denomina mutagénesis a la producción intencionada de variabilidad genética a través de métodos físicos o químicos. La utilización de estos métodos provoca cambios al azar en el ADN, y en consecuencia, también en los genes y en el organismo. En plantas, la mutagénesis generalmente se aplica en las semillas, aunque en algunas especies como el maíz se ha aplicado en el polen (Kodym & Afza, 2003).

La mutagénesis puede ser dirigida o inducida. El primer término hace referencia a aquellas mutaciones precisas que se efectúan en un gen deseado. El segundo, se refiere a

la mutagénesis provocada por la acción de mutágenos químicos o físicos que causan cambios al azar y de una manera generalizada en todo el genoma (González, 2011).

La inducción de mutaciones es un método eficaz para lograr variaciones dentro de un tipo de cultivo, ya que ofrece la posibilidad de inducir características deseadas que no se pueden hallar en la naturaleza o se han perdido durante el proceso evolutivo. Las mutaciones inducidas se producen tratando partes de las plantas con mutágenos químicos o físicos. Esto favorece que se imiten, de hecho, las mutaciones espontáneas y se amplía artificialmente la diversidad genética (Polanco, 2014).

Las mutaciones son inducidas por mutágenos químicos o físicos (Gnanamurthy *et al.*, 2012; Kayalvizhi, Kannan, & Ganga, 2017). Mutágenos químicos tales como etilmetanosulfonato (EMS), azida de sodio (NaN_3), N-nitroso-N-metilurea (NMU) y colchicina han sido utilizados para desarrollar nuevos rasgos en los cultivos (Kozgar *et al*., 2011; Jagajanantham *et al*., 2013; Kashind y More, 2016). La azida sódica, un mutágeno químico se ha convertido en una herramienta importante para mejorar rasgos agronómicos de las plantas de cultivo. Se está utilizando para producir resistencia en varios cultivos susceptibles para mejorar su rendimiento y rasgos de calidad contra patógenos dañinos (Porta & Jiménez, 2018).

2.1.3. Mutágeno

Un mutágeno es un producto natural o elaborado por el hombre que puede alterar la estructura o la secuencia del ADN de un organismo vivo. Se puede clasificar dichos

agentes en función de cómo producen las lesiones ya sea mediante un mecanismo físico o químico (Castillo-Martínez *et al*., 2018). Por lo general la mutagénesis química produce mutaciones a distintos niveles, ya sea mutaciones sin sentido o mutaciones sustitutivas. En cambio, la mutagénesis mediante radiación ionizante acostumbra a producir deleciones cromosómicas. Por lo tanto, la selección del mutágeno debe basarse en la eficiencia y en la especificidad para inducir mutaciones y en la alta probabilidad de encontrar el tipo de mutación deseada. También es importante conocer el tipo de mutación que produce el mutágeno para poder seleccionar el método de detección más eficiente (Koornneef *et al*., 1982).

2.1.4. Etilmetanosulfonato (EMS)

El metano sulfonato de etilo es un compuesto químico con propiedades de mutágeno, teratógeno y carcinógeno que posee la fórmula química C3H8O3S. En español, es más correcto nombrarlo como metano sulfonato de etilo (MSE), y en inglés ethyl methane sulphonate (EMS), dado que es un éster del ácido metano sulfónico. En genética se emplea el EMS como agente mutágeno, especialmente en técnicas de genética inversa como el TILLING (lesiones inducidas, localizadas y dirigidas en el genoma). El efecto del EMS en la mutagénesis frecuentemente provoca gran cantidad de mutaciones recesivas a través del genoma (Rojas *et al*., 2016).

Una de las ventajas de la mutagénesis con EMS es que la frecuencia de las mutaciones es independiente del tamaño del genoma, además se pueden obtener una serie de mutaciones alélicas, exhibiendo una gama de fenotipos que pueden servir para los estudios de función

genómica. Otra ventaja del EMS es su alto nivel de saturación sin provocar daños colaterales excesivos en el ADN como pueden ser aneuploidia, fertilidad reducida y mortalidad. Dado estas ventajas, la mutagénesis química se mantiene como una herramienta importante en los programas de mejoramiento, e incluso compite con técnicas sofisticadas como la transgénesis (Soner & İlhan, 2007).

La eficiencia en el proceso de mutación depende en gran medida del tamaño adecuado de la población obtenida. Así pues, para cada especie hay que establecer protocolos con una concentración de mutágeno y tiempo de tratamiento adecuados. Teniendo en cuenta que la aplicación de altas concentraciones de este mutágeno puede afectar la tasa de germinación de las semillas tratadas y la fertilidad de las plantas producidas. Por otro lado, concentraciones bajas implicarán pocas mutaciones y la necesidad de generar poblaciones de mayor tamaño (Rojas *et al*., 2016).

Rojas *et al.* (2016), en su estudio observó que el metano sulfonato de etilo afectó la germinación, crecimiento y desarrollo de las plantas de fréjol. El porcentaje de plantas germinadas y el área foliar jugaron un papel importante en la determinación de la concentración óptima del agente mutagénico. Se caracterizó la morfología y la fenología de las plantas provenientes de las semillas tratadas con metano sulfonato de etilo y se demostró la influencia del EMS en el retardo de las etapas fenológicas del cultivo del fréjol. El metano sulfonato de etilo influyó sobre los componentes del rendimiento y la supervivencia total de las plantas provenientes de semillas tratadas.

2.2. Fundamentación teórica

2.2.1. Generalidades de la mutagénesis

Las variaciones genéticas presentes en la naturaleza no han sido originadas por mutaciones espontáneas, sino más bien por la recombinación de genotipos en poblaciones y por su acción recíproca constante con las fuerzas del medio ambiente (Novak & Brunner, 1992).

A principios del siglo XX se comenzaron a aplicar técnicas de mutagénesis para incrementar la variabilidad en plantas y acelerar la obtención de individuos mutantes. Es a partir de 1950 que se lograron cultivares mejorados a través de este procedimiento. La FAO en 1994, publicó una lista con más de 1800 cultivares obtenidos por mutagénesis. La mayoría de los cultivos explotados en el mundo provienen de cruzamientos de cultivares mutados, por ejemplo, el 70% del trigo (*Triticum aestivum* L.) sembrado en Italia provenía de cultivos mutados (González, 2014). Sin embargo, no es posible extrapolar los resultados obtenidos en investigaciones previas con el empleo del EMS, ya que la concentración óptima para la inducción de mutagénesis varía en dependencia de la especie y dentro de esta con el cultivar (Till *et al.*, 2007).

La aplicación de mutágenos implica evaluar los efectos biológicos producidos en una determinada célula o tejido, por lo que se deben considerar factores como el tipo de mutágeno, la dosis de radiación empleada, y el tamaño y procedencia de los explantes y su radiosensibilidad (Taner & Kunter, 2004). Debido a que la respuesta a un determinado

mutágeno se mide principalmente en función del porcentaje de sobrevivencia y la tasa de regeneración y/o multiplicación del material irradiado, es necesario determinar la dosis de radiación que permite la sobrevivencia de los materiales y posteriormente seleccionar entre estos el mayor número de mutantes con características deseables (Pardo, 2015).

Ahloowalia y Maluszynski (2001) realizaron ensayos de radiosensibilidad con el fin de establecer el rango de radiación que puede ser aplicado a un determinado cultivo. Dentro de los mutágenos físicos, las radiaciones gamma son las más utilizadas para generar variabilidad en los cultivos agrícolas, así como para reducir las pérdidas postcosecha, eliminar la brotación precoz, minimizar la contaminación, controlar enfermedades y plagas, extender la vida útil de los cultivos, entre otros (Piri *et al.*, 2011).

2.2.2. Tipos de mutágenos

- **Mutágenos químicos:** son compuestos químicos capaces de alterar las estructuras del ADN de forma brusca, como por ejemplo el ácido nitroso (agente desaminizante), brominas y algunos de sus compuestos.

- **Mutágenos físicos:** son radiaciones que pueden alterar la secuencia y estructura del ADN, por ejemplo, la radiación ultravioleta que origina dímeros de pirimidina (generalmente de timina), y la radiación gamma y la alfa que son ionizantes. También se considerar agentes físicos los ultrasonidos, con 400000 vibraciones por segundo, que han inducido mutaciones en algunas plantas superiores, y centrifugación, que también producen variaciones cromosómicas estructurales.

- **Mutágenos biológicos:** son aquellos organismos "vivos" que pueden alterar las secuencias del material genético de su hospedador; como, por ejemplo; virus, bacterias y hongos. Son ejemplo los transposones (fragmentos autónomos de ADN).

Los mutágenos físicos pueden dividirse en dos categorías, en radiaciones no ionizantes e ionizantes (Madigan *et al*., 2009). Las radiaciones ionizantes más utilizadas en la inducción de cambios de caracteres de los cultivos, incluyen rayos X, rayos gamma γ, rayos β, neutrones y haces de iones de alta energía (Suprasanna *et al*., 2015; Akshatha *et al*., 2013), debido a sus características y alto poder de penetración, que pueden provocar cambios en moléculas, como el ácido desoxi-rribonucleico (ADN) (Minisi *et al*., 2013).

Dentro de las radiaciones ionizantes, los rayos gamma son las más utilizadas para generar variabilidad en los cultivos agrícolas (Piri *et al*., 2011; Akshatha *et al*., 2014). En este campo, los rayos gamma son considerados un tipo de radiación ionizante usualmente obtenidos por radioisótopos, como el cobalto 60 (Co-60) y el cesio 137 (Ce-137). Entonces, la utilidad de cualquier agente mutagénico depende de su capacidad para inducir una alta frecuencia de cambios deseables en comparación con los indeseables. Por lo tanto, a menudo es necesario evaluar la eficacia y efectividad de los mutágenos para un uso eficiente y efectivo (Usharani & Kumar, 2015). Sin embargo, no basta seleccionar el tipo de radiación a usar; deben tomarse en cuenta otros factores como radiosensibilidad, intervalo de dosis y forma de aplicación, para lograr los objetivos planteados (Udensi *et al*., 2012). Para determinar el intervalo de dosis que permita inducir los cambios deseados, debe de tomarse en cuenta que cada organismo presenta una particular sensibilidad a la radiación (radiosensibilidad). La dificultad está en que a medida que aumenta la dosis de

radiación, se incrementa el deterioro de la planta y disminuye la frecuencia de mutaciones económicamente útiles (Salomón *et al*., 2015; Monica & Seetharaman, 2016).

Caro *et al*. (2012) aplicaron dosis de 50, 100, 200 y 300 Gy de rayos gamma en yemas vegetativas de *P. peruviana* L., y obtuvieron mayor porcentaje de viabilidad, enraizamiento de microtallos, cantidad de hojas por explante, longitud de tallos, porcentaje de endurecimiento y de cromosomas rezagados en la célula con la dosis de 100 y 200 Gy. También, Antúnez *et al*. (2017) al estudiar el efecto de los rayos gamma 60Co sobre características de germinación de la semilla y vigor de plantas de P. peruviana, reportaron que la radiación no afectó el porcentaje de germinación, ni el número de hojas, pero las plántulas de semillas irradiadas emergieron 8 d antes que el testigo. Las plantas de semillas irradiadas con 125, 150, 200 y 225 Gy presentaron la mayor altura y diámetro de tallo. Las mayores longitudes de la raíz observaron en las plantas testigo. La mayor longitud de entrenudo se tuvo con 125, 150, 175 y 200 Gy.

2.2.3. Niveles de mutación

Es una clasificación de las mutaciones basada en la cantidad de material hereditario afectado por la mutación:

- **Mutación Génica:** mutación que afecta a un solo gen.

- **Mutación Cromosómica:** mutación que afecta a un segmento cromosómico que incluye varios genes.

- **Mutación Genómica:** mutación que afecta a cromosomas completos (por exceso o por defecto) o a juegos cromosómicos completos.

- **Mutación Espontánea:** producida de forma natural en los individuos. Como errores en la replicación, lesiones o daños fortuitos en el ADN, entre otras.

- **Mutación Inducida:** se produce como consecuencia de la exposición a agentes mutagénicos químicos o físicos.

2.2.4. Mutagénesis por etilmetanosulfonato (EMS)

El etilmetanosulfonato (EMS) es el mutágeno más utilizado en plantas para el desarrollo de grandes poblaciones mutantes principalmente porque crea grandes cantidades de mutaciones puntuales en casi todas las especies estudiadas, pero también porque la frecuencia de mutación parece ser independiente del tamaño del genoma (McCallum *et al*., 2000; Greene *et al*., 2003; Henikoff & Comai, 2003). Por lo tanto, la saturación del genoma con mutantes se puede lograr con poblaciones relativamente pequeñas. Sin embargo, los intentos en algunas especies como el arroz (*Oryza sativa*) se han visto confundidos por las bajas frecuencias de mutación y las altas tasas de letalidad a concentraciones mutagénicas más altas (Till *et al*., 2007).

La evaluación del uso de etilmetanosulfonato (EMS) para la generación de una población mutante para lesiones locales inducidas dirigidas en genomas (TILLING) en fréjol común. TILLING es un poderoso enfoque de genética inversa que utiliza una gran

población mutante para la identificación de mutantes en lugares de interés. Con base en la supervivencia, el desarrollo y el rendimiento de la semilla tratada, se encontró que el EMS de 40 mM era una concentración apropiada para la generación de una población mutante en el genotipo común de fréjol BAT 93. Concentraciones más altas de EMS resultaron en tasas de supervivencia de menos del 10% y concentraciones más bajas dieron como resultado la generación de menos mutantes. Según los resultados de TILLING de otras especies, se estima que una población de 5000 líneas es suficiente para la saturación del genoma común del fréjol. Las frecuencias de mutaciones fenotípicas y el aislamiento de mutaciones dirigidas en la población mutante BAT 93 indican que la mutagénesis fue efectiva (Porch *et al*., 2009).

Por otra parte, Singh & Vaishali (2016), en un estudio sobre la caracterización del trigo (*Triticum aestivum*) para mantener el rasgo verde, recogieron 10 variedades de trigo para desarrollar el genotipo verde permanentemente al tratarlas con 0.5% de EMS durante 60 minutos. Las diversas características morfológicas y fisiológicas tales como: altura de la planta, área de la hoja, número de macollos/plantas productivas, semillas por espiga, peso de 1000 granos, contenido de agua relacionado (RWC), contenido de clorofila, etc. se registraron bajo condiciones controladas y de tratamiento. Excepcionalmente, las variedades K 7410 y RAJ 3765 mostraron un mejor valor de todos los caracteres morfo-fisiológicos entre las diez variedades de trigo en control y tratamiento, como 1000 peso de grano 58.50 a 60.89 gy 56.89 a 58.07 g, etc. Tales mutantes de estas dos variedades puede considerarse como mutantes verdes y puede funcionar mejor en condiciones de estrés abiótico como sequía, alta temperatura

Zaky *et al*. (2014), llevaron a cabo un estudio para determinar los efectos de los tratamientos con metanosulfonato de etilo (EMS) sobre la germinación de semillas y la diversidad genética de las plántulas de *Neolamarckia cadamba* y *Leucaena leucocephala* inducidas por EMS utilizando marcadores ISSR. También se determinaron los efectos de la duración del remojo en agua de 100 °C sobre la germinación de semillas de *N. cadamba* y *L. leucocephala* mediante el uso de los siguientes tratamientos: (1) sin tratar (control); (2) remojo en agua a 100 ° C durante 20 segundos seguido de remojo en agua durante 24 horas y 48 horas, respectivamente a temperatura ambiente.

Los resultados mostraron obtenidos por Zaky *et al*. (2014), reflejaron que el remojo en agua a 100 °C durante 20 segundos y posteriormente en agua a temperatura ambiente durante 48 horas tuvo la semilla más alta tasa de germinación, mayor germinación acumulativa (CGP) y acortó el período de latencia completa (CDP) sobre la duración de remojo de 24 horas o semillas sin tratar antes de plantar. Se utilizaron un total de 120 semillas para cada tratamiento y tres dosis diferentes de EMS (0.1%, 0.3% y 0.6%) en los estudios de mutagénesis inducida por EMS de *N. cadamba* y *L. leucocephala*. Los resultados mostraron que el porcentaje de germinación, la capacidad de supervivencia y la altura de las plántulas disminuyeron, mientras que la letalidad aumentó con el aumento de las dosis de EMS. Entre las plántulas de *N. cadamba* y L. *leucocephala* investigadas, el 0,6% de las muestras tratadas con EMS exhibieron el mayor nivel de variabilidad en comparación con el 0,1% de las muestras tratadas con EMS como se reveló mediante el uso de marcadores ISSR. Esto indica que el tratamiento con 0.6% de EMS es mucho más beneficioso en comparación con otros tratamientos de EMS.

Rojas *et al*. (2016), condujeron una investigación con el propósito de determinar la concentración óptima de metano sulfonato de etilo, para inducir variaciones fenotípicas en *Phaseolus vulgaris* L. cv. 'DOR 364'. Para ello se trataron las semillas con diferentes concentraciones de metano sulfonato de etilo (0, 20, 30, 40, 50, 60 mM) y se sembraron en bolsas de polietileno que contenían 4 kg de sustrato. Las evaluaciones se realizaron en variables involucradas en la germinación, crecimiento, desarrollo foliar, morfología de las plantas, así como componentes del rendimiento.

Los resultados obtenidos por Rojas *et al*. (2016), demuestran que el metano sulfonato de etilo influyó sobre las diferentes etapas de desarrollo del cultivo que fueron analizadas. Basados en la germinación, desarrollo y crecimiento de las plantas, la supervivencia total, los componentes del rendimiento y la frecuencia de variaciones fenotípicas, de las variables evaluadas, 30 mM de EMS es la concentración óptima para establecer una población de plantas en el cultivar de fréjol 'DOR 364' de posibles mutantes. A esta concentración se observó el mayor número de variaciones fenotípicas y una supervivencia de 41.6%.

La detección de cambios morfológicos es un aspecto importante a tener en cuenta para la determinación de la concentración óptima de un agente mutagénico. Aunque estos cambios son solo observables a nivel de fenotipo, a través de ello se puede estimar la frecuencia de mutaciones (Porch *et al.*, 2009).

La eficacia mutagénica de los rayos gamma y EMS han sido comparadas en *Catharanthus roseus*, teniendo como principal hallazgo que la frecuencia de mutación es mayor en EMS

que en rayos gamma. Además, se ha evidenciado que la eficacia y la eficiencia mutagénicas aumentaron con la disminución de la dosis o concentración. Esto es corroborado por resultados obtenidos que sugieren que la germinación fue menor al incrementarse la dosis de EMS en el mencionado cultivo, generando además tallos enanos, y mayor porcentaje de plantas muertas (Mangaiyarkarasi, Girija, & Gnanamurthy, 2014).

Al ser un agente alquilante que es altamente tóxico y carcinógeno debido a sus propiedades mutagénicas, se debe tener en cuenta una serie de medidas para su manipulación ya que es fundamental para la salud humana. Es necesario tener en cuenta que una manipulación del mutágeno con miedo excesivo puede ser peligrosa pues esto supera al comportamiento racional y el riesgo de accidentes puede aumentar (León, 2016).

León (2016), menciona que se deben tener en cuenta ciertas medidas de seguridad al trabajar con etilmetanosulfonato, entre las cuales menciona las siguientes:

- Es obligatorio el uso de guantes mientras estemos manipulando el mutágeno químico, los guantes de látex deben usarse dobles pues estos no son totalmente impermeables. Aun cuando trabajemos detrás de una superficie transparente, ya sea en una campana extractora de gases o en una cabina protegida se deben usar gafas o cubiertas protectoras para los ojos.

- Los guantes no protegen totalmente (aun usándolos doble) contra el reactivo mutágeno y las diluciones que se deriven de este, por lo que nunca deben estar en contacto directo con ellos. Se deben cambiar con frecuencia e ir almacenándolos en una bolsa señalada para su posterior incineración o descontaminación.

- Los frascos que contienen el agente alquilante (EMS) o diluciones de este se deben abrir siempre dentro de la campana extractora de gases, que ya debe estar funcionando, para evitar la inhalación de los vapores tóxicos.

- El volumen de EMS que se vaya a usar debe ser tomado cuidadosamente para no contaminar la micropipeta, para mayor seguridad esta debe ser descontaminada una vez finalizado el trabajo. Es necesario señalar que el volumen requerido se haya calculado anteriormente para evitar demoras.

- La superficie donde se vaya a trabajar con el mutágeno se debe cubrir con papel de filtro fijado con cinta adhesiva de modo que al finalizar se pueda recoger y en él vaya cualquier derramamiento del reactivo o soluciones preparadas con este, posteriormente se introduce el papel de filtro en la bolsa de los desechos señalada.

- Una vez preparada las diluciones estas deben ser vertidas cuidadosamente en el frasco donde se encuentra el material vegetal para evitar salpicaduras, Una vez añadida la disolución del mutágeno el frasco debes ser tapado con parafilm. Es importante señalar que siempre es más seguro en el caso de semillas, colocarlas primero en el

frasco y después añadir el mutágeno, de lo contrario hay más probabilidades de producirse salpicaduras.

- Una vez concluido el tratamiento con la disolución del mutágeno, se bebe decantar el remanente o eliminar con una pipeta. Inmediatamente se debe lavar el material vegetal con agua destilada para eliminar los remanentes del mutágeno.

- El contacto directo con el material mutagenizado debe ser evitado, incluso cuando se usan guantes. Para la siembra se aconseja el uso de algún utensilio como pinzas.

2.2.5. Importancia de la melina

La Melina a pesar de ser una especie exótica y debido a sus cualidades particulares como su versatilidad, rápido crecimiento, estética y veteado óptimos y mediana resistencia ha ingresado a países tropicales de la región como Ecuador y a otros a nivel del mundo, supliendo necesidades de madera en la industria, ebanistería y sectores de la construcción, entre otras. Es uno de los mejores árboles para pulpa y papel, sus hojas dan un forraje apreciado por el ganado, la corteza, raíces y frutos presentan propiedades medicinales, es una excelente especie melífera, que además de plantar en plantaciones extensivas, se puede plantar en avenidas y jardines como planta ornamental (Jiménez, 2016).

Al ser de ciclo largo, requiere de la producción de plántulas de excelente calidad, por lo cual unas buenas prácticas agrícolas y de manejo en la etapa de vivero garantizarán un adecuado desarrollo en campo (Guillermo, 2017).

La melina es una madera apreciada por el consumidor mayorista y minorista para los trabajos de ebanistería, piso, puertas, ventanas y construcciones en general, su mayor valor está en el duramen, la madera de albura y alto contenido de silicato, lo cual la hace extremadamente resistente (Coy *et al*., 2018). Su demanda va en aumento en cuanto a maderas destinadas a vivienda y mobiliario, entre las cuales la teca es una de las más apreciadas. Esta madera es muy útil en la construcción de muelles, tablados para subir a los barcos, pasamanos, paneles y toda clase de motivos; en la construcción de vagones de ferrocarril, puentes y traviesas; y para la construcción de casas, como madera exterior e interior. Razón por la cual es considerada atractiva para el consumidor (Marconi & Manosalva, 2018)

A inicios de los años 90, se iniciaron programas de mejoramiento genético con melina en Costa Rica y Guatemala, donde se establecieron los primeros huertos semilleros en la región. En los últimos años se retomaron los programas y la estrategia cambió hacia silvicultura clonal. El desarrollo de tecnologías de propagación *in vitro* han permitido grandes progresos (Espitia, Murillo, & Castillo, 2016).

En programas de mejoramiento genético con melina en la India, se reporta que los árboles plus superaron en un 40% (altura total), 106% (altura comercial), 66% (DAP) a la población original. En el pacífico sur de Costa Rica, la selección de árboles plus de melina registraron un diferencial de selección sobre la población base, de 19,8; 54, y 54,4, para el DAP, volumen y calidad del fuste, respectivamente (Espitia, Murillo, & Castillo, 2016). Balcorta y Vargas (2004) reportaron en melina evaluada en México, valores de diferencial de selección de 40% para altura total y 40% para volumen comercial respectivamente.

2.3. Fundamentación legal

CAPITULO I: Del Patrimonio Forestal del Estado

Art. 1.- Constituyen patrimonio forestal del Estado, las tierras forestales que de conformidad con la Ley son de su propiedad, los bosques naturales que existan en ellas, los cultivados por su cuenta y la flora y fauna silvestre.

Formarán también dicho patrimonio, las tierras forestales y los bosques que en el futuro ingresen a su dominio, a cualquier título, incluyendo aquellas que legalmente reviertan al Estado.

Los manglares, aún aquellos existentes en propiedades particulares, se consideran bienes del Estado y están fuera del comercio, no son susceptibles de posesión o cualquier otra medio de apropiación y solamente podrán ser explotados mediante concesión otorgada, de conformidad con esta Ley y su Reglamento.

Nota: Artículo reformado por Ley No. 91, publicada en Registro Oficial 495 de 7 de Agosto de 1990.

Art. 2.- No podrá adquirirse el dominio ni ningún otro derecho real por prescripción sobre las tierras que forman el patrimonio forestal del Estado, ni podrán ser objeto de disposición por parte del Instituto Ecuatoriano de Reforma Agraria y Colonización.

Art. 3.- El Ministerio de Agricultura y Ganadería previo los estudios técnicos correspondientes determinará los límites del patrimonio forestal del Estado con sujeción a lo dispuesto en la presente Ley. Los límites de este patrimonio se darán a conocer al país mediante mapas y otros medios de divulgación.

Art. 4.- La administración del patrimonio forestal del Estado estará a cargo del Ministerio de Agricultura y Ganadería, a cuyo efecto, en el respectivo Reglamento se darán las normas para la ordenación, conservación, manejo y aprovechamiento de los recursos forestales y los demás que se estime necesarios.

CAPITULO II: De los Bosques y Vegetación Protectores

Art. 5.- Se consideran bosques y vegetación protectores aquellas formaciones vegetales, naturales o cultivadas, que cumplan con uno o más de los siguientes requisitos:

a) Tener como función principal la conservación del suelo y la vida silvestre;

b) Estar situados en áreas que permitan controlar fenómenos pluviales torrenciales o la preservación de cuencas hidrográficas, especialmente en las zonas de escasa precipitación pluvial;

c) Ocupar cejas de montaña o áreas contiguas a las fuentes, corrientes o depósitos de agua;

d) Constituir cortinas rompevientos o de protección del equilibrio del medio ambiente;

e) Hallarse en áreas de investigación hidrológico - forestal;

f) Estar localizados en zonas estratégicas para la defensa nacional; y,

g) Constituir factor de defensa de los recursos naturales y de obras de infraestructura de interés público.

Art. 6.- Sin perjuicio de las resoluciones anteriores a esta Ley, el Ministerio de Agricultura y Ganadería determinará mediante acuerdo, las áreas de bosques y vegetación protectores y dictará las normas para su ordenamiento y manejo. Para hacerlo, contará con la participación del INERHI.

Tal determinación podrá comprender no solo tierras pertenecientes al patrimonio forestal del Estado, sino también propiedades de dominio particular.

Art. 7.- Los bosques y vegetación protectores serán manejados a efecto de su conservación, en los términos y con las limitaciones que establezcan los Reglamentos.

CAPITULO IV: De las Plantaciones Forestales

Art. 12.- Declarase obligatorio y de interés público la forestación y reforestación de las tierras de aptitud forestal, tanto públicas como privadas, y prohíbese su utilización en otros fines.

Para el efecto, el Ministerio de Agricultura y Ganadería, formulará y se someterá a un plan nacional de forestación y reforestación, cuya ejecución la realizará en colaboración y coordinación con otras entidades del sector público, con las privadas que tengan interés y con los propietarios que dispongan de tierras forestales.

La expresada planificación se someterá al mapa de uso actual y potencial de los suelos, cuyo avance se pondrá obligatoriamente en conocimiento público cada año.

Art. 13.- La forestación y reforestación previstas en el presente capítulo, deberán someterse al siguiente orden de prioridades:

a) En cuencas de alimentación de manantiales, corrientes y fuentes que abastezcan de agua;

b) En áreas que requieran de protección o reposición de la cubierta vegetal, especialmente en las de escasa precipitación fluvial; y,

c) En general, en las demás tierras de aptitud forestal o que por otras razones de defensa agropecuaria u obras de infraestructura deban ser consideradas como tales.

Art. 14.- Para la forestación y reforestación en tierras del Estado, el Ministerio de Agricultura y Ganadería procederá mediante cualquiera de las siguientes modalidades:

a) Por la administración directa o mediante convenios con organismos de desarrollo u otras entidades o empresas del sector público;
b) Mediante la participación social que se determine en el respectivo Reglamento;

c) Por contrato con personas naturales o jurídicas forestadoras, con experiencia en esta clase de trabajo;

d) Por medio de la conscripción militar;

e) Mediante convenio con inversionistas que deseen aportar capitales y tecnología; y,

f) Con la participación de estudiantes.

Art. 15.- En tierras de propiedad privada el Ministerio de Agricultura y Ganadería podrá realizar forestación o reforestación por cuenta del propietario, en los términos y condiciones que contractualmente se establezcan.

Art. 16.- El Ministerio de Agricultura y Ganadería apoyará a las cooperativas, comunas y demás organizaciones constituídas por agricultores directos y promoverá la constitución de nuevos organismos, con el propósito de emprender programas de forestación, reforestación, aprovechamiento e industrialización de recursos forestales.

El Banco Nacional de Fomento y demás instituciones bancarias que manejen recursos públicos, concederán prioritariamente crédito para el financiamiento de tales actividades.

Art. 17.- El Ministerio de Educación Pública y el Ministerio de Defensa Nacional, en coordinación con el de Agricultura y Ganadería, reglamentarán la participación de los estudiantes y del personal que cumpla el Servicio Militar Obligatorio en las Fuerzas Armadas, en su orden, en la ejecución de programas oficiales de forestación y reforestación.

Art. 18.- El Estado promoverá y apoyará la constitución de empresas de economía mixta o privadas, cuyo objeto sea la forestación o reforestación e impulsará y racionalizará el aprovechamiento de los recursos forestales, bajo la supervisión y control del Ministerio de Agricultura y Ganadería.

Art. 19.- El Ministerio de Agricultura y Ganadería, los organismos de desarrollo y otras entidades públicas y vinculadas al sector, establecerá y mantendrán viveros forestales con el fin de suministrar las plantas que se requieran para la forestación o reforestación y proporcionarán asistencia técnica, con sujeción a los planes y controles respectivos. Igualmente, las personas naturales o jurídicas del sector privado, podrán establecer,

explotar y administrar sus propios viveros, bajo la supervisión y control técnico del Ministerio de Agricultura y Ganadería.

CAPITULO VII: De la Investigación y Capacitación Forestales

Art. 49.- El Ministerio de Agricultura y Ganadería promoverá, realizará y coordinará la investigación relativa a la conservación, administración, uso y desarrollo de los recursos forestales y de las áreas naturales del patrimonio forestal.

Art. 50.- Para el cumplimiento de las actividades previstas en el artículo anterior, al Ministerio de Agricultura y Ganadería le corresponde:

a) Crear centros de investigación sobre especies forestales nativas y exóticas, de fauna y flora silvestres;

b) Suscribir convenios relativos a la investigación, capacitación y educación forestales;

c) Ejecutar programas de capacitación y adiestramiento en conservación, administración y desarrollo de recursos forestales y áreas naturales de patrimonio del Estado;

d) Establecer en coordinación con el Ministerio de Educación Pública y otras entidades del sector público, programas de educación y divulgación relativas a los aspectos mencionados en el literal anterior;

e) Organizar cursos de capacitación forestal y de conservación, conjuntamente con el Servicio Ecuatoriano de Capacitación Profesional - SECAP - y otras entidades y dependencias del sector público o privado; y,

f) Las demás que le asignen esta Ley y los Reglamentos.

Art. 51.- El Ministerio de Agricultura y Ganadería divulgará los resultados de la investigación forestal.

Art. 52.- Créase bajo la dependencia del Ministerio de Agricultura y Ganadería, el Programa de Semillas Forestales, como órgano técnico administrativo encargado de la promoción y formación de viveros y huertos semilleros; del acopio, conservación y suministro de semillas certificadas a precios de costo; y, las demás actividades que le fije el Reglamento.

Iguales actividades podrá cumplir la empresa privada bajo control ministerial.

CAPÍTULO III:

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Tipo de investigación

La investigación realizada fue de tipo experimental, en la cual se midió el efecto de diferentes dosificaciones de etilmetanosulfonato (EMS) a fin de inducir mutaciones en las semillas y posteriormente cuantificar los efectos sobre diferentes aspectos de crecimiento de las plántulas.

3.2. Métodos de investigación

En la investigación se hizo uso de los siguientes métodos:

- **Método inductivo:** Este método se empleó en la determinación de las variables de respuesta en base a los objetivos de la investigación.

- **Método deductivo:** para el establecimiento de los efectos específicos de diferentes dosis de EMS sobre las semillas de melina, así como la determinación de la dosificación de mejor respuesta en términos de vigor y viabilidad.

- **Método analítico:** en el análisis de los datos obtenidos para la posterior generación de resultados encaminados al cumplimiento de los objetivos planteados.

3.3. Construcción metodológica del objeto de investigación

3.3.1. Diseño experimental

El ensayo se llevó a cabo bajo un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos en cinco repeticiones. Por cada tratamiento se utilizaron 200 semillas, es decir un total de 800 semillas por repetición.

3.3.2. Técnicas de investigación

Se utilizó la observación directa como técnica de investigación para el alcance de los objetivos planteados, mediante la identificación y evaluación de variables de respuesta.

3.3.3. Manejo del ensayo

El ensayo se llevó a cabo en las instalaciones de la empresa Plantabal, la misma que cuenta con la infraestructura necesaria para realizar el mismo. Antes de someter las semillas a los tratamientos de mutagénesis se procedió primero a homogenizar las semillas, para lo cual se colocaron todas las semillas en un recipiente con agua pura, para eliminar aquellas semillas vanas.

3.3.4. Material genético

Se emplearon semillas de melina provenientes de la empresa Plantabal, ubicada en el Km 4.5 de la vía Quevedo – Valencia.

3.3.5. Tratamientos evaluados

Se estudió el efecto de tres concentraciones de etilmetanosulfonato y un testigo, tal como se describe a continuación:

T_1: Testigo absoluto (control - agua)

T_2: 0.3% EMS

T_3: 0.6% EMS

T_4: 1.0% EMS

3.4. Elaboración del marco teórico

Para la elaboración del marco teórico (conceptual y fundamentación teórica) se recurrió a información de libros, revistas, folletos, boletines divulgativos, manuales técnicos, documentos en línea y demás fuentes bibliográficas, en base al tema de estudio, que permitieron ampliar el conocimiento y entendimiento del tema de estudio, para la generación de resultados.

3.5. Recolección de la información

Para la recolección de la información, se recurrió a fuentes primarias y secundarias, siendo las fuentes primarias, aquellos datos obtenidos del ensayo, de decir obtenidos mediante la observación directa, y las fuentes secundarias, aquella información de diferentes fuentes bibliográficas como: libros, revistas, manuales técnicos, boletines divulgativos, documentos en línea, entre otros.

3.5.1. Variables evaluadas

3.5.1.1. Porcentaje de germinación

A los 15 días después de la siembra se procedió a evaluar el número de plantas germinadas por cada tratamiento, y para establecer el porcentaje en cada tratamiento se empleará la siguiente fórmula:

$$PG = NSG/NSS \times 100$$

Dónde:

PG: Porcentaje de germinación

NSG: Número de semillas germinadas

NSS: Número de semillas sembradas

3.5.1.2. Sobrevivencia

A los 60 días después de la siembra se procedió a evaluar el número de plantas vivas por cada tratamiento, y para establecer la sobrevivencia en cada tratamiento se empleará la siguiente fórmula:

$$PS=NPV/NPT \times 100$$

Dónde:

PS: Porcentaje de sobrevivencia

NPV: Número de plantas vivas

NPT: Número de plantas totales

3.5.1.3. Altura de plantas

A los 30 y 60 días después de la siembra se procedió a evaluar la altura de plantas, empleando una regla graduada en centímetros. Se consideró la altura desde la superficie del suelo hasta el ápice terminal de la planta.

3.5.1.4. Diámetro del tallo

A los 30 y 60 días después de la siembra se evaluó el diámetro del tallo, empleando un calibrador digital. Se midió a la altura de 1 cm del suelo, y posteriormente se promedió y expresó la medida en centímetros.

3.6. Procesamiento y análisis

Las variables en estudio se sometieron al correspondiente análisis de varianza, y la comparación de medias de los tratamientos se realizó mediante a la prueba de Tukey al 95% de probabilidad. El correspondiente análisis estadístico se lo efectuó utilizando Infostat versión 2017.

El esquema del análisis de varianza utilizado en el ensayo se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 1. Esquema del análisis de varianza utilizado en el ensayo

Fuente de variación	Grados de libertad
Tratamientos	3
Error	16
Total	19

3.7. Recursos humanos y materiales

- Balanza
- Bandejas germinadoras
- Borrador
- Calibrador digital
- Carpetas
- Computadora
- Esferos
- Hojas de papel bond
- Impresora

- Lápiz
- Libreta para el registro de datos
- Marcadores
- Memoria USB
- Regla

CAPÍTULO IV:

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Efecto del etilmetanosulfonato en la germinación de semillas de melina

En la Tabla 2 se presentan los promedios correspondientes al porcentaje de germinación de las semillas de melina sometidas a la aplicación de diferentes dosis de etilmetanosulfonato (EMS).

Se observaron diferencias significativas de las tres concentraciones del agente mutagénico en relación al testigo (control), sin embargo, con la concentración de 1.0% de EMS se evidenció una respuesta negativa sobre la germinación de las semillas, registrándose un 53.86%. El valor más alto de germinación se registró en el testigo (control)

Tabla 2. Porcentaje de germinación de semillas de melina (*Gmelina arborea*) a los 30 días (cm) en respuesta a la aplicación de distintas dosis de Etilmetanosulfonato (EMS)

Tratamientos	**Porcentaje de germinación (%)***
T_1: Testigo absoluto	89.10 a
T_2: 0.3% EMS	86.65 b
T_3: 0.6% EMS	85.79 b
T_4: 1.0% EMS	53.86 c
Promedio	78.85
Coeficiente de variación (%)	1.08

* Promedios con la misma letra no difieren estadísticamente según la prueba de Tukey ($p>0.05$)

4.1.2. Sobrevivencia de plántulas provenientes de semillas tratadas con distintas concentraciones de etilmetanosulfonato

El porcentaje de plantas sobrevivientes al ensayo, con la aplicación de diferentes dosificaciones de etilmetanosulfonato (EMS)se presenta en la Tabla 3. Se observó una tendencia similar que, en la germinación de la semilla, evidenciándose que con el incremento de las concentraciones de etilmetanosulfonato fue disminuyendo la sobrevivencia de las plántulas provenientes de semillas tratadas. Se observó mayor porcentaje de sobrevivencia en el testigo (control). Cuando la concentración superó el 0.6% de etilmetanosulfonato la disminución de la sobrevivencia disminuyó drásticamente, llegando a 53.86%. Las concentraciones de 0.3 y 0.6% no difirieron entre sí.

Tabla 3. Porcentaje de sobrevivencia de plántulas de melina (*Gmelina arborea*) en respuesta a la aplicación de distintas dosis de etilmetanosulfonato (EMS)

Tratamientos	**Porcentaje de sobrevivencia (%)***
T_1: Testigo absoluto	89.10 a
T_2: 0.3% EMS	86.65 b
T_3: 0.6% EMS	85.79 b
T_4: 1.0% EMS	53.86 c
Promedio	78.85
Coeficiente de variación (%)	1.08

* Promedios con la misma letra no difieren estadísticamente según la prueba de Tukey ($p>0.05$)

4.1.3. Efecto de las diferentes concentraciones de EMS sobre la altura y diámetro del tallo de plántulas de melina

4.1.3.1. *Altura de planta a los 30 días (cm)*

En la Tabla 4 se muestran los valores correspondientes a la altura de planta a los 30 días (cm) por efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de etilmetanosulfonato (EMS) a las semillas de melina. Las concentraciones y testigo (control), no exhibieron diferencias significativas entre sí, mostrando valores entre 19.95 y 23.92 cm. La altura promedio más baja se obtuvo en la concentración de 1.0 % de etilmetanosulfonato (EMS), mientras que la más alta correspondió al testigo (control).

Tabla 4. Altura de plantas de melina (*Gmelina arborea*) a los 30 días (cm) en respuesta a la aplicación de distintas dosis de Etilmetanosulfonato (EMS)

Tratamientos	**Altura de plantas a los 30 días (cm)***
T_1: Testigo absoluto	23.92 a
T_2: 0.3% EMS	22.83 a
T_3: 0.6% EMS	23.01 a
T_4: 1.0% EMS	19.95 a
Promedio	22.43
Coeficiente de variación (%)	11.15

* Promedios con la misma letra no difieren estadísticamente según la prueba de Tukey ($p>0.05$)

4.1.3.2. *Altura de planta a los 60 días (cm)*

La altura de plantas a los 60 días de edad de las plantas provenientes de semillas sometidas a mutagénesis inducida por etilmetanosulfonato (EMS) se presenta en la Tabla 5. La inexistencia de diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, permite identificar que, a la edad de 60 días de las plántulas de melina,

Las plantas provenientes de semillas sometidas a la inducción de mutagénesis con un concentración de 0.6 de etilmetanosulfonato produjeron plantas de mayor altura a los 60 días con un valor de 44.35 cm, sin embargo este valor no presentó diferencia significativas con los demás tratamientos, por lo que se determinó una igualdad estadística con los otros tratamientos que registraron valores entre 39.45 y 41.80 cm, siendo el valor más bajo en plantas obtenidas de semillas tratadas con una concentración de 1.0 % de etilmetanosulfonato (EMS).

Tabla 5. Altura de plantas de melina (*Gmelina arborea*) a los 60 días (cm) en respuesta a la aplicación de distintas dosis de Etilmetanosulfonato (EMS)

Tratamientos	**Altura de plantas a los 60 días (cm)***
T_1: Testigo absoluto	40.50 a
T_2: 0.3% EMS	41.80 a
T_3: 0.6% EMS	44.35 a
T_4: 1.0% EMS	39.45 a
Promedio	41.53
Coeficiente de variación (%)	10.16

* Promedios con la misma letra no difieren estadísticamente según la prueba de Tukey ($p>0.05$)

4.1.3.3. *Diámetro del tallo a los 30 días (cm)*

En la Tabla 6, se presentan los promedios del diámetro del tallo de plantas provenientes de semillas sometidas a mutagénesis por etilmetanosulfonato. La ausencia de diferencias significativas entre los promedios de los tratamientos, da indicios de la inexistencia de influencia del tratamiento con el mutágeno en estudio sobre el diámetro del tallo de plántulas a los 30 días de edad del cultivo.

Los tratamientos registraron promedios de diámetro del tallo de 0.17 a 0.19 cm, siendo el valor más alto del testigo, y el más bajo a la concentración del 1.0% de etilmetanosulfonato.

Tabla 6. Diámetro del tallo de plantas de melina (*Gmelina arborea*) a los 30 días (cm) en respuesta a la aplicación de distintas dosis de Etilmetanosulfonato (EMS)

Tratamientos	**Diámetro del tallo a los 30 días (cm)***
T_1: Testigo absoluto	0.19 a
T_2: 0.3% EMS	0.20 a
T_3: 0.6% EMS	0.18 a
T_4: 1.0% EMS	0.17 a
Promedio	0.18
Coeficiente de variación (%)	9.76

* Promedios con la misma letra no difieren estadísticamente según la prueba de Tukey ($p>0.05$)

4.1.3.4. *Diámetro del tallo a los 60 días (cm)*

El diámetro del tallo a los 60 días de edad de las plantas provenientes de semillas sometidas a mutagénesis inducida por etilmetanosulfonato se presenta en la Tabla 7. No se registraron diferencias significativas entre las medias de los tratamientos en estudio, lo que permite puntualizar que, a la edad de 60 días de las plántulas de melina, los tratamientos fueron iguales.

Los tratamientos presentaron valores entre 0.25 y 0.27 cm de diámetro del tallo. El valor más bajo se obtuvo en el tratamiento con 1.0% de etilmetanosulfonato para la inducción de mutagénesis, correspondiendo el valor más alto al testigo (control).

Tabla 7. Diámetro del tallo de plantas de melina (*Gmelina arborea*) a los 60 días (cm) en respuesta a la aplicación de distintas dosis de Etilmetanosulfonato (EMS)

Tratamientos	**Diámetro del tallo a los 60 días (cm)***
T_1: Testigo absoluto	0.27 a
T_2: 0.3% EMS	0.25 a
T_3: 0.6% EMS	0.29 a
T_4: 1.0% EMS	0.25 a
Promedio	0.26
Coeficiente de variación (%)	10.89

* Promedios con la misma letra no difieren estadísticamente según la prueba de Tukey ($p>0.05$)

4.1.3.5. *Crecimiento de las plantas (cm)*

Los valores presentados en la Tabla 8, corresponden al crecimiento del día 60 con respecto al día 30, de plantas cuyas semillas se trataron previo a la siembra con etilmetanosulfonato. A pesar de no evidenciarse diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, la concentración de 0.6 % de etilmetanosulfonato a semillas de melina, produjo mayor crecimiento de plantas con 21.34 cm desde el día 30 al 60 de edad de las plantas.

Tabla 8. Crecimiento de plantas de melina (*Gmelina arborea*) a los 60 días con respecto al día 30 (cm) en respuesta a la aplicación de distintas dosis de Etilmetanosulfonato (EMS)

Tratamientos	**Crecimiento de plántulas (cm)***
T_1: Testigo absoluto	16.59 a
T_2: 0.3% EMS	18.98 a
T_3: 0.6% EMS	21.34 a
T_4: 1.0% EMS	19.50 a
Promedio	19.10
Coeficiente de variación (%)	26.22

* Promedios con la misma letra no difieren estadísticamente según la prueba de Tukey ($p>0.05$)

4.1.3.6. *Engrose del tallo (cm)*

El engrose del tallo entre el día 30 y el día 60 de después de la siembra plantas originadas a partir de semillas tratadas con etilmetanosulfonato (EMS), se presenta en la Tabla 9.

El engrose registrado en los tratamientos en estudio, entre el día 30 y 60 de edad de las plántulas de melina fluctuó entre 0.05 y 0.11, evidenciándose ausencia de diferencias significativas entre éstos. El mayor engrose del tallo se obtuvo en plantas provenientes de semillas sometidas a mutagénesis inducida por concentración de 0.6 % de etilmetanosulfonato (EMS) con 0.11 cm de incremento en el grosor del tallo desde el día 30 al día 60 de edad de las plantas. El valor más bajo correspondió al tratamiento de 0.3 % de etilmetanosulfonato (EMS).

Tabla 9. Engrose del tallo de plantas de melina (*Gmelina arborea*) a los 60 días con respecto al día 30 (cm) en respuesta a la aplicación de distintas dosis de Etilmetanosulfonato (EMS)

Tratamientos	**Engrose de tallo (cm)***
T_1: Testigo absoluto	0.08 a
T_2: 0.3% EMS	0.05 a
T_3: 0.6% EMS	0.11 a
T_4: 1.0% EMS	0.08 a
Promedio	0.08
Coeficiente de variación (%)	44.83

* Promedios con la misma letra no difieren estadísticamente según la prueba de Tukey (p>0.05)

4.1.3.7. *Correlación entre la germinación y las concentraciones de etilmetanosulfonato*

El análisis de correlación entre las concentraciones de etilmetanosulfonato (EMS) y el porcentaje de germinación presentado en la Figura 1, demuestra la existencia de una

correlación inversa entre ambas variables. Esto sugiere que el incremento de la concentración de etilmetanosulfonato (EMS) aplicado a las semillas previo a su siembra, incluye negativamente sobre la germinación de estas, obteniéndose un coeficiente de correlación de -0.86, lo que demuestra que este valor significativo corrobora dicho argumento.

Adicionalmente, cabe indicar que pese a registrarse igual porcentaje de sobrevivencia, se tiene indicios que la influencia de este mutágeno sobre la sobrevivencia de plántulas es similar.

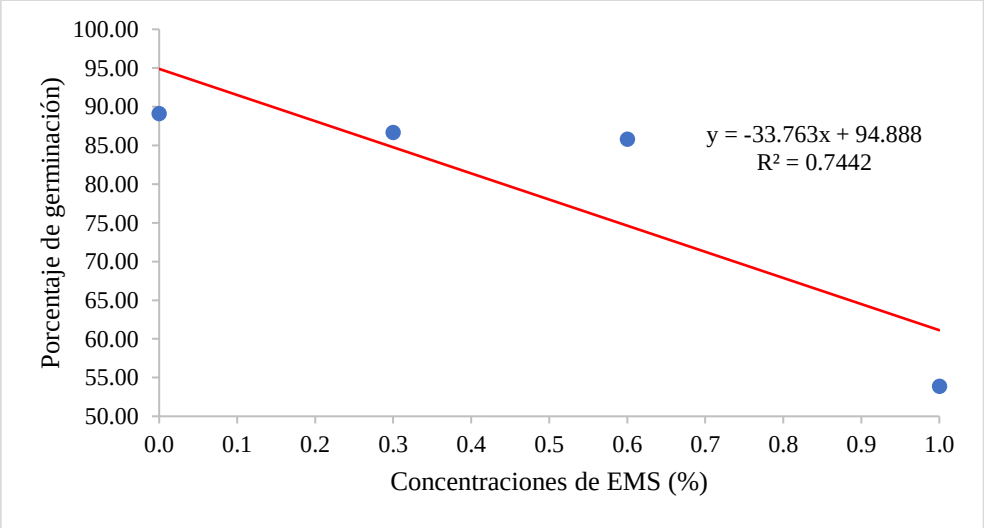


Figura 1. Correlación entre las concentraciones de etilmetanosulfonato (EMS) y el porcentaje de germinación

4.2. Discusión

La germinación presentó un efecto negativo al someter las semillas a las diferentes concentraciones de etilmetanosulfonato (EMS), de tal manera que a medida que la concentración se incrementa, el poder germinativo de las semillas disminuye. Esto reflejó que la germinación disminuye un 2.45% de germinación al tratar las semillas con 0.3% de EMS, llegando a disminuirse hasta en 35.24% con una concentración de 1.0% de EMS, esto concuerda con los resultados obtenido por Rojas *et al*. (2016), quienes indujeron variaciones fenotípicas en *Phaseolus vulgaris* L. cv. 'DOR 364' observaron que, con el incremento de la concentración de EMS, disminuyó el porcentaje de germinación de las semillas tratadas. Esta tendencia se observó tanto en evaluaciones de los 7 como a los 14 días de dicho estudio, de tal manera que cuando la concentración de EMS aplicada fue del 20 hasta el 60%, el número de semillas germinadas disminuyó en un 81.30 hasta 99.19% a los 7 días, y de 36.29 a 96.77% a los 14 días, respectivamente.

En lo referente a la sobrevivencia de las plántulas provenientes de semillas sometidas a las dosificaciones de etilmetanosulfonato, se observó una tendencia similar a la observada en la germinación, presentando valores iguales, es decir, todas las plantas emergidas de dichas semillas siguieron vivas a lo largo del ensayo. Esto sugiere una influencia negativa de la dosificación de EMS sobre la sobrevivencia de plántulas, pero a la vez puede observarse que las plantas obtenidas con inducción de mutaciones pueden resistir las condiciones en las que se desarrollaron puesto que no se evidenció mortalidad a lo largo del ensayo, con las plantas germinadas. Por otra parte, Porch *et al*. (2009), en fréjol común BAT 93, observaron que cconcentraciones más altas de EMS resultaron en tasas de

supervivencia de menos del 10% y concentraciones más bajas dieron como resultado la generación de menos mutantes. Estos autores puntualizaron que, en base a la supervivencia general, el desarrollo y el rendimiento de la semilla tratada, se encontró que el EMS de 40 mM es una concentración apropiada para la generación de una población mutante en dicho genotipo.

Los resultados obtenidos por Zaky *et al.* (2014), mostraron que el porcentaje de germinación, la capacidad de supervivencia y la altura de las plántulas disminuyeron con el aumento de las dosis de EMS en plántulas de *N. cadamba* y *L. leucocephala*. Sin embargo, en el presente estudio, se observó ausencias de diferencias significativas en las evaluaciones de altura de plantas y diámetro del tallo a los 30 y 60 días. Pero se debe tomar en consideración que el engrose del tallo (0.11 cm) y crecimiento (21.34 cm) en un lapso de 30 días, fue mayor en la concentración de 0.6% de EMS, lo que supone un incremento significativo dentro de las plantaciones, permitiendo obtener un mayor volumen de madera aprovechable, si dicha tendencia de desarrollo fue continua en campo definitivo. Evidentemente, estos resultados de la dosificación idónea concuerdan con los de Zaky *et al.* (2014), que con una concentración del 0.6% con EMS exhibieron mayor nivel de variabilidad en comparación con el 0.1%.

Singh y Vaishali (2016), en 8 de los 10 materiales genéticos evaluados al someter semillas de trigo a una concentración de 0.5% de EMS por 60 minutos, obtuvieron plantas de mayor altura al aplicar EMS, que superaron entre 2.00 y 7.17 cm, a los respectivos testigos sin aplación del mencionado mutágeno, evidenciándo además que la inducción de

mutaciones disminuyó los componentes del rendimiento de dicho cultivo, y se redujo las dimensiones de las hojas.

Existen reportes de influencia negativa de mutágenos en diferentes especies de plantas, por ejemplo, tallos enanos en *Catharanthus roseus* (*Mangaiyarkarasi et al*., 2014), mientras que en cultivares de fréjol irradiados con rayos Gamma se ha observado presencia de hojas albinas y cloróticas (*Alvarado-Martínez et al*., 2014). Sin embargo, se ha demostrado que TILLING es efectivo en leguminosas como *Glycine max* (*Cooper et al*., 2008), *Lotus japonicus* (Perry *et al.*, 2003) y *Medicago trucatula* (Javot *et al.*, 2007).

En teca se observó un resultado similar a los presentados en la presente investigación, sin embargo, la concentración de mejor respuesta fue la de 0.3 % de etilmetanosulfonato, observándose a también un comportamiento inversamente proporcional entre las concentraciones del mutágeno y la germinación y sobrevivencia, de tal manera que la mencionada concentración produjo una germinación y sobrevivencia de 68%. Esta dosificación también permitió obtener plantas de mayor diámetro a los 30 días (0.19 cm), y de mayor altura a los 30 y 60 días (5.98 y 17.13 cm, respectivamente) (Fuentes, 2019). Esto a su vez sugiere que la diferencia en la eficiencia de las dosis sobre la inducción de mutaciones registradas en las diferentes especies en las que se ha probado el etilmetanosulfonato con resultados positivos, refleja y fortale el criterio de que los protocolos de establecimiento de mutagénesis son específicos para cada especie, por sus características intrínsecas propias de cada una de éstas.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- La germinación de las semillas de melina, sometidas mutaciones por etilmetanosulfonato se vio restringida por este agente mutágeno, evidenciándose que el testigo produjo mayor porcentaje de germinación con 89.10% de semillas germinadas.

- La sobrevivencia de las plántulas de semillas provenientes de inducción de mutagénesis por etilmetanosulfonato disminuyó a medida que se incrementó la dosis de dicho agente mutágeno descendiendo de 89.10% en ausencia del mutágeno hasta 53.86% al aplicarlo en dosificación de 1.0 %.

- Las concentraciones de etilmetanosulfonato aplicadas en semillas de melina no mostraron diferencias significativas en cuanto a la altura de plantas y diámetro del tallo, sin embargo, la concentración de 0.6 de etilmetanosulfonato produjo mayor crecimiento y engrose del tallo con 21.34 y 0.11 cm, respectivamente, en un lapso de 30 días (del día 30 al 60 de edad de las plántulas).

5.2. Recomendaciones

- Someter las semillas de melina a una concentración al 0.6 % de etilmetanosulfonato (EMS) para inducir mutaciones en las plántulas obtenidas a fin de obtener un incremento tanto en el crecimiento como en el engrose se tallos que en campo definitivo representan un mayor costo de árboles para aprovechamiento forestal.

- Hacer un seguimiento de plántulas de semillas sometidas a mutaciones por etilmetanosulfonato (EMS) en campo definitivo para evaluar su desarrollo y productividad potencial en una plantación definitiva.

- Replicar el presente estudio con adición de fitohormonas para potenciar la obtención de plántulas de mejores características y evaluar su resistencia posterior al trasplante en campo abierto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahloowalia, B., & Maluszynski, M. (2001). Induced mutation: A new paradigm in plant breeding. Euphytica 118: 167-173 pp.

Akshatha, K., & Chandrashekar, R. (2014). Gamma sensitivity of forest plants of Western Ghats. Journal of Environmental Radioactivity 132: 100-107.

Akshatha, K., Chandrashekar, R., Somashekarappa, H., & Souframanien, J. (2013). Effect of gamma irradiation on germination, growth, and biochemical parameters of *Terminalia arjuna* Roxb. Radiation Protection and Environment 36(1): 38-44.

Antúnez, O., Cruz, C., Sandoval, M., Santacruz, A., Mendoza, L., De la Cruz, E., & Peña, A. (2017). Variabilidad inducida en caracteres fisiológicos de *Physalis peruviana* L. mediante rayos gamma 60co aplicados a la semilla. Fitotecnia Mexicana 40(2): 211-218.

Caro, D., Estupiñán, S., Rache, L., & Pacheco, J. (2012). Efecto de rayos gamma sobre yemas vegetativas de *Physalis peruviana* L. Acta Agronómica 61: 305-314.

Castillo-Martínez, C., García-Campusano, F., Vallejo-Reyna, M., Reyes-Martínez, I., & De la Cruz-Torres, E. (2018). Mutagenesis of in vitro material from *Pseudotsuga menziesii* and obtaining mutant lines. Agroproductividad 11(12): 33-39.

Cooper, J., Till, B., Laport, R., Darlow, M., Kleffner, J., Jamai, A., . . . Henikoff, S. (2008). Tilling to detect induced mutations in soybean. BMC Plant Biology 8(9): 1-10.

Fuentes, V. (2019). Efecto de la concentración de etil metano sulfonato (EMS) en el comportamiento agronómico de plántulas de teca (*Tectona grandis* L.f.) en etapa de vivero, año 2019. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Quevedo-Ecuador. 60 p.

Gnanamurthy, S., Mariyammal, S., Dhanavel, D., & Bharathi, T. (2012). Effect of gamma rays on yield and yield components characters R3 generation in cowpea *Vigna unguiculata* Walp. International Journal of Research in Plant Science 2(2): 39-42.

González, M. (2011). Desarrollo de una plataforma de Tilling en melón (*Cucumis melo* L.). Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona-España. 264 p.

Greene, E., Codomo, C., Taylor, N., Henikoff, J., Till, B., Reynolds, S., . . . Henikoff, S. (2003). Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in Arabidopsis. Genetics 164(2): 731–740 pp.

Henikoff, S., & Comai, L. (2003). Single-nucleotide mutations for plant functional genomics. Annual Review of Plant Biology 54: 375-401.

Jagajanantham, N., Dhanavel, D., Gnanamurthy, S., & Pavadai, P. (2013). Induced on chemical mutagens in Bhendi *Abelmoschus esculentus* L. Moench. International Journal of Current Science 5: 133-137.

Jiménez, L. (2016). El cultivo de la melina (*Gmelina arborea* Roxb.) en el trópico. Primera Edición. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Sangolquí-Ecuador. 125 p.

Kashid, N., & More, S. (2016). A study of effect of induced mutation on flowering of plant in M2 & M3 generations in chickpea *Cicer arietinum* L. Tropical Plant Research 3(1): 182-185.

Kayalvizhi, K., Kannan, M., & Ganga, M. (2017). Effect of physical and chemical mutagens on morphological characters in M1V2 generation of tuberose *Polianthes tuberosa* L. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 6(4): 2492-2499.

Kodym, A., & Afza, R. (2003). Physical and chemical mutagénesis. Methods MolBiol 236:189-204 pp.

Kozgar, M., Goyal, S., & Khan, S. (2011). EMS induced mutational variability in *Vigna radiata* and *Vigna mungo*. Research Journal of Botany 6(1): 31-37 .

León, A. (2016). Determinación de la concentración óptima de Metano Sulfonato de Etilo en *Phaseolus vulgaris* L. cultivar DOR 364 . Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara-Cuba. 53 p.

Madigan, P., Bodemann, O., Brady, C., Dewar, J., Keller, J., Leitges, M., . . . Cox, D. (2009). Regulation of Rnd3 localization and function by protein kinase C α-mediated phosphor-rylation. Biochemical Journal 424(1): 153-161.

Mangaiyarkarasi, R., Girija, M., & Gnanamurthy, S. (2014). Mutagenic effectiveness and efficiency of gamma rays and ethyl methane sulphonate in *Catharanthus roseus*. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 3(5): 881-889.

McCallum, C., Comai, L., Greene, E., & Henikoff, S. (2000). Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. Plant Phisiology 123(2): 439-442.

Minisi, A., El-mahrouk, M., Rida, F., & Nasr, M. (2013). Effects of gamma radiation on germination, growth characteristics and morphological variations of *Moluccella laevis* L. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences 13(5): 696-704.

Monica, S., & Seetharaman, N. (2016). Effect of gamma irradiation and ethyl methane sulphonate (EMS) in early generation of Garden bean *Lablab purpureus* L. Sweet var. typicus. International Journal of Advanced Scientific and Technical Research 6(3): 398-410.

Montiel, D. (2013). Nuevas técnicas de mejoramiento genético en plantas. Obtenido de https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/Herramientas-ensenanza-investigacion/Seminarios/Docs/ODM.pdf

Novak, F., & Brunner, H. (1992). Fitotecnia: Tecnología de mutación inducidad para el mejoramiento de los cultivos. Boletín del OIEA 4: 25-33 pp.

Pardo, A. (2015). Mutagénesis inducida en microbulbos de *Allium sativum* L. . Acta Agronómica 64(3): 254-259 pp.

Perry, J., Wang, T., Welham, T., Gardner, S., Pike, J., Yoshida, S., & Parniske, M. (2003). A TILLING reverse genetics tool and a web-accessible collection of mutants of the legume *Lotus japonicus*. Plant Physiology 131(3): 866-871.

Piri, I., Babayan, M., Tavassoli, A., & Javahen, M. (2011). The use of gamma irradiation in agriculture. African Journal of Microbiology Research 5(32): 5806-5811 pp.

Polanco, M. (2014). Mejoramiento genético mediante inducción de mutaciones. Obtenido de http://studylib.es/doc/4941977/mejoramiento-gen%C3%A9tico-mediante-inducci%C3%B3n-de-mutaciones

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. American Society for Horticultural Science 134(3): 348–355 pp.

Porta, R., & Jiménez, J. (2018). Efectos de agentes mutagénicos en la germinación de semillas de aguaymanto. Scientia Agropecuaria 9(2): 231-238.

Rojas, L., Collado, R., León, A., Rivero, L., Ocaña, B., Hernández, M., . . . García, L. (2016). Concentración óptima de metano sulfonato de etilo en *Phaseolus vulgaris* L. cv. 'DOR 364' para inducir variaciones fenotípicas. Biotecnología Vegetal 16(3): 179-188 pp.

Salomón, J., González, M., Castillo, J., & Varela, M. (2015). Efecto de los rayos gamma sobre la germinación de la semilla botánica de papa *Solanum tuberosum* L. Cultivos Tropicales 38(1): 89-91.

Sierra, M. (2004). Manual para productores de melina *Gmelina arborea* en Costa Rica . SIREFOR. Cartago-Costa Rica. 314 p.

Singh, N., & Vaishali, V. (2016). Characterization of wheat (*Triticum aestivum*) for stay green trait. Journal of Applied and Natural Science 8 (1) : 107 - 111.

Soner, S., & İlhan, Ç. (2007). TILLING (Targetting Induced Local Lesions in Genomes) Technology for Plant Functional Genomics. Journal of Applied Biological Sciences 1: 77-80 pp.

Sotolongo, R. G., & Cobas, M. (2013). Mejoramiento Genético Forestal. FAO. Roma-Italia. 52 p.

Suprasanna, P., Mirajkar, S., & Bhagwat, S. (2015). Induced Mutations and Crop Improvement. In: Bahadur B.; Venkat Rajam M.; Sahijram L.; Krishnamurthy K. (eds) Plant Biology and Biotechnology. India. 593 – 617.

Taner, Y., & Kunter, B. (2004). Determining effective radiation mutagen dose for garlic (Allium sativum L.). Bahçe 33: 95-99 pp.

Till, B., Cooper, J., Tai, T., Colowit, P., Greene, E., Henikoff, S., & Comai, L. (2007). Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. BMC Plant Biology 7(9): 1-12.

Udensi, O., Arong, G., Obu, J., Ikpeme, E., & Ojobe, T. (2012). Radio-sensitivity of some selected landraces of pulses to gamma irradiation: indices for use as improvement and preservation techniques. American Journal of Experimental Agriculture 2(3): 320-335.

Usharani, K., & Kumar, C. (2015). Mutagenic efficiency and effectiveness of gamma rays and EMS and their combination in inducing chlorophyll mutations in M2 generation of Urdbean *Vigna mungo* L. Electronic Journal of Plant Breeding 6(1): 210-217.

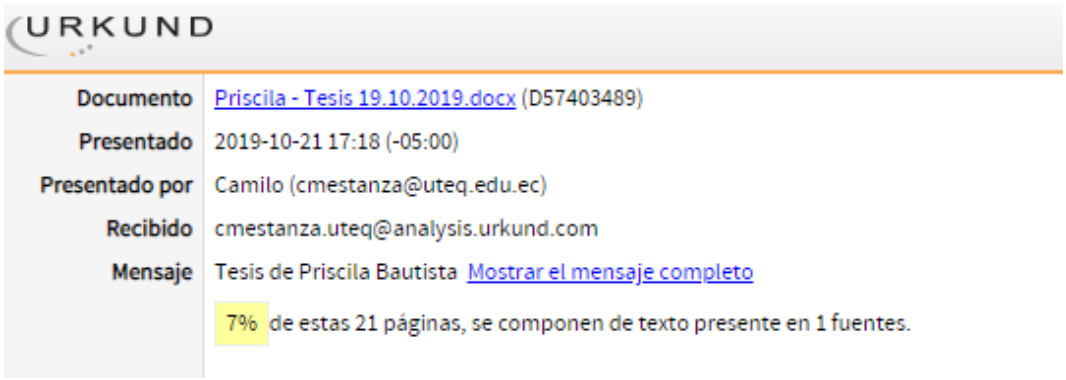
Zaky, M., Wei-Seng, H., Shek-Ling, P., & Badruddin, F. (2014). EMS-induced mutagenesis and DNA polymorphism assessment through ISSR markers in *Neolamarckia cadamba* (kelampayan) and *Leucaena leucocephala* (petai belalang) . European Journal of Experimental Biology 4(4):156-163 .

ANEXOS

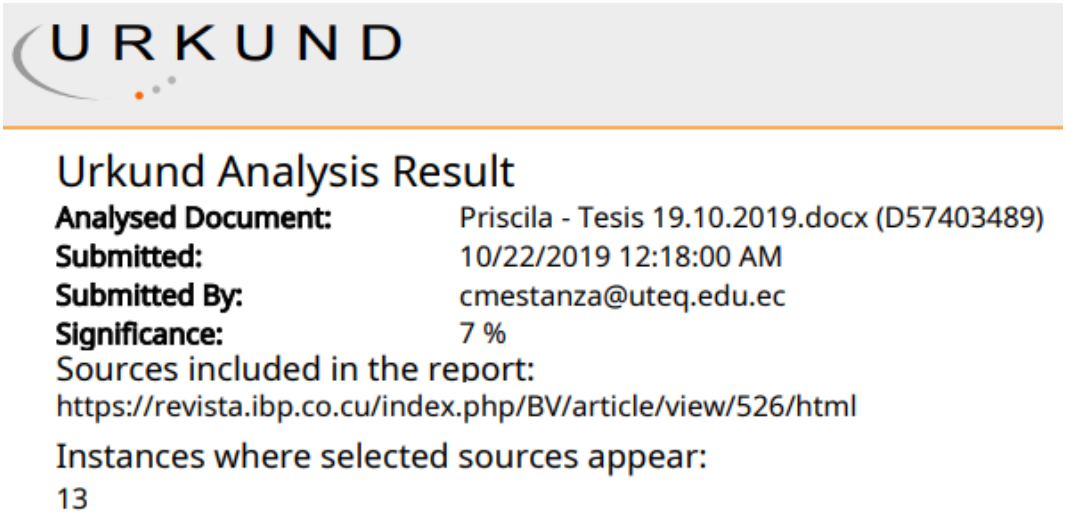
Anexo 1. Certificado del URKUND para la prevención de coincidencia y/o plagio académico.

REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO

El suscrito, Dr. Camilo Mestanza Uquillas, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, en calidad de Director del Proyecto de Investigación titulado **"Aplicación de distintas dosis de etilmetanosulfonato (EMS) en semillas y plántulas de *Gmelina arborea* Roxb. (melina) en etapa de vivero"**, previo a la obtención del grado académico de Magister en Manejo Forestal Sostenible, perteneciente a la Ing. Priscila Katherine Bautista Zambrano, CERTIFICA: el cumplimiento de los parámetros establecidos por el SENESCYT, y se evidencia el reporte de la herramienta de prevención de coincidencia y/o plagio académico (URKUND) con un porcentaje de coincidencia del 7 %.


URKUND

Documento	Priscila - Tesis 19.10.2019.docx (D57403489)
Presentado	2019-10-21 17:18 (-05:00)
Presentado por	Camilo (cmestanza@uteq.edu.ec)
Recibido	cmestanza.uteq@analysis.urkund.com
Mensaje	Tesis de Priscila Bautista Mostrar el mensaje completo
	7% de estas 21 páginas, se componen de texto presente en 1 fuentes.


URKUND

Urkund Analysis Result

Analysed Document: Priscila - Tesis 19.10.2019.docx (D57403489)
Submitted: 10/22/2019 12:18:00 AM
Submitted By: cmestanza@uteq.edu.ec
Significance: 7 %

Sources included in the report:
https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/526/html

Instances where selected sources appear:
13

Dr. Camilo Mestanza Uquillas
Director de Proyecto de Investigación

Anexo 2. Análisis de varianza del porcentaje de germinación

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F.	p-valor	
Tratamientos	3	4193.5107	1397.8369	1935.2179	<0.0001	**
error	16	11.5570	0.7223			
Tota	19					

**: Alta significancia estadística

Anexo 3. Análisis de varianza del porcentaje de sobrevivencia

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F.	p-valor	
Tratamientos	3	4193.5107	1397.8369	1935.2179	<0.0001	**
error	16	11.5570	0.7223			
Tota	19					

**: Alta significancia estadística

Anexo 4. Análisis de varianza de la altura de plantas a los 30 días

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F.	p-valor	
Tratamientos	3	44.1714	14.7238	2.3549	0.1104	N.S.
error	16	100.0372	6.2523			
Tota	19	144.2086				

N.S.: No significativo

Anexo 5. Análisis de varianza de la altura de plantas a los 60 días

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F.	p-valor	
Tratamientos	3	67.0625	22.3542	1.2570	0.3224	N.S.
error	16	284.5500	17.7844			
Tota	19	351.6125				

N.S.: No significativo

Anexo 6. Análisis de varianza del diámetro del tallo a los 30 días

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F.	p-valor	
Tratamientos	3	0.0029	0.0010	2.9059	0.0669	N.S.
error	16	0.0052	0.0003			
Tota	19	0.0081				

N.S.: No significativo

Anexo 7. Análisis de varianza del diámetro del tallo a los 60 días

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F.	p-valor	
Tratamientos	3	0.0052	0.0017	2.0741	0.1440	N.S.
error	16	0.0133	0.0008			
Tota	19	0.0185				

N.S.: No significativo

Anexo 8. Análisis de varianza del crecimiento de plántulas del día 30 al 60 de estudio

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F.	p-valor	
Tratamientos	3	57.6267	19.2089	0.7656	0.5298	N.S.
error	16	401.4604	25.0913			
Tota	19	459.0871				

N.S.: No significativo

Anexo 9. Análisis de varianza del engrose del tallo del día 30 al 60 de estudio

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F.	p-valor	
Tratamientos	3	0.0079	0.0026	2.0102	0.1531	N.S.
error	16	0.0208	0.0013			
Tota	19	0.0287				

N.S.: No significativo