



**INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE  
INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS  
ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA**

**FECHA DE PRESENTACIÓN:** Agosto 2008

**ESTACIÓN EXPERIMENTAL:** Santa Catalina

**DEPARTAMENTO:** Departamento de Biotecnología (DNB) y Programa Nacional de Raíces y Tubérculos

**PROYECTO:** **Mejoramiento por Mutaciones en Agricultura**

**ACTIVIDAD:** **Generación de mutantes de papa de la variedad "Superchola" con resistencia al tizón tardío (*Phytophthora infestans*) mediante radiaciones ionizantes gamma.**

**AUTOR:** Villavicencio Sotomayor María Fernanda

**COAUTORES:** Ing. Jacqueline Benítez (DNB)  
Dr. Eduardo Morillo (DNB)  
Ing. Jorge Rivadeneira (Programa Nacional de Raíces y Tubérculos)  
Ing. Xavier Cuesta (Programa Nacional de Raíces y Tubérculos)

**COLABORADORES:** Ing. Marcelo Gallegos (Escuela Politécnica Nacional)

**FECHA DE INICIO:** Agosto 2008

**FECHA DE TERMINACIÓN :** Agosto 2009

**PRESUPUESTO:** 12922 USD

**FINANCIAMIENTO:**

INIAP	24,0	%
I.A.E.A	33,4	%
EPN	15,5	%
TESISTA	27,1	%

## 1. ANTECEDENTES

La papa es uno de los cultivos de mayor importancia en la sierra del Ecuador y es la principal fuente de ingresos de los pequeños agricultores. De los principales cultivos transitorios, se ubica en el quinto lugar en superficie de siembra después de arroz, maíz duro, maíz suave y soya. De acuerdo a los resultados del III Censo Nacional Agropecuario, realizado entre octubre de 1999 y septiembre del 2000, el cultivo de papa alcanza una producción de 240 mil toneladas métricas, destinándose al comercio el 83%. Entre los años 2000-2006, la producción creció en el orden del 69% y durante el año 2006, la superficie cosechada originó un volumen de producción de 404.276 TM (III Censo Nacional Agropecuario, Citado por Pumisacho y Sherwood, 2002). La producción se distribuye a lo largo de la Región Interandina, mayormente en las provincias de Carchi, Chimborazo, Tungurahua, Pichincha, Cañar y Cotopaxi (Herrera *et. al.*, 1999).

En el Ecuador el principal problema fitosanitario es el tizón tardío, causado por el hongo *Phytophthora infestans* que puede causar pérdidas del 28-100% dependiendo de la variedad de papa sembrada y del periodo de infección de la planta. La mayoría de variedades de papa cultivadas en el país son susceptibles a esta enfermedad por ejemplo Chola, Superchola e I-Gabriela (Cuesta X. *et. al.*, 1998).

Los incrementos de agresividad del patógeno han provocado una extensiva búsqueda de medidas de control (Jaramillo, 2003). El método generalmente utilizado para controlar el tizón tardío es la aplicación periódica de fungicidas, llegando en algunos casos hasta 15-20 fumigaciones durante el ciclo (Cuesta y Andrade, 2000). El control del tizón tardío representa un costo entre el 8 y el 20% del valor comercial de la producción de papa (Crissman, Citado por Cruz *et. al.*, 2006). El control químico resulta un método poco conveniente, debido al alto costo de los fungicidas y a los riesgos para la salud asociados con su uso, además del impacto ambiental, por lo que la obtención de variedades resistentes aparece como la mejor opción para controlar esta enfermedad (Cuesta, *et. al.*, 2005). Especialmente en las variedades de mayor demanda en el mercado ecuatoriano, como lo es la variedad "Superchola" que de cuya producción obtenida en campo entre el 60 y 70% se orienta al mercado (Guerrero, 2005); sin embargo la principal causa por la cual disminuye la productividad del sembrío es la susceptibilidad al tizón tardío.

Actualmente la aplicación de mutagénesis, en combinación con cultivo de tejidos y métodos moleculares, permite disponer de una estrategia para la obtención de variedades resistentes. Específicamente, la utilización de la irradiación y la selección de mutantes pueden ser adoptadas *in vitro* como metodología para obtener un genotipo con características favorables. (Donini y Mannino, 1990; Broertjes y Van Harten, 1978; Van Harten *et al.*, 1972).

La inducción de mutaciones a través de radiaciones hacia el mejoramiento esta recibiendo creciente atención en todo el mundo, desde que en 1983 una norma mundial para los alimentos irradiados fue aprobada por la Comisión del *Codex Alimentarius*, órgano conjunto de la organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), (Grupo Consultivo Internacional Sobre Irradiación de Alimentos, GCIIA, 2002).

Douglas, G., (1982), Sonnino, A., (1986) (Citado en IAEA: "Nuclear Techniques and *in vitro* culture for plant improvement"; 1986), Murrillo, R. y Mendoza, V, (1998), entre otros han realizado estudios en Irlanda, Italia y Bolivia, respectivamente, utilizando diversas técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* que mediante los efectos de las radiaciones ionizantes han inducido a la mutación en variedades de papa como: Desirée, Bola luk'y, Luk'y Kheto buscando aumentar azúcares o resistencia a enfermedades. Los resultados de dichas

investigaciones dan una pauta del comportamiento de los órganos y tejidos de papa irradiados a varias dosis. De lo cual podemos rescatar que en un rango de radiaciones ionizantes Gamma entre 22-30 Grays (Gy) son observables y caracterizables los cambios morfológicos.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

La necesidad de mejorar variedades cultivadas de papa así como materiales para obtener progenitores constituye el trabajo diario de los fitomejoradores. Así en la búsqueda de mejorar o cambiar un carácter en variedades de interés comercial sin alterar el resto del genotipo, el uso de mutagénesis *in vitro* mediante radiaciones ionizantes gamma conjuntamente con las técnicas de cultivo de tejidos constituye un método físico alternativo de mejora genética que se está retomando y afianzando en algunos países, por lo que buscamos implementarlo en la variedad de papa "Superchola" para resolver el problema específico de susceptibilidad al tizón tardío (*Phytophthora infestans*). La variedad "Superchola" además de ser de importancia local e institucional cuenta con una amplia demanda en el mercado nacional por lo que generar mutantes con características de resistencia a esta enfermedad contribuirá a resolver problemas en cuanto a la calidad del producto, costos de producción y salud del agricultor.

## **3. OBJETIVOS:**

### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Generar mutantes de papa de la variedad "Superchola" con resistencia al tizón tardío (*Phytophthora infestans*) mediante radiaciones ionizantes gamma.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Establecer la dosis letal media y dosis óptima de radiación ionizante gamma para la variedad de papa "Superchola".
- Determinar las diferencias morfológicas de los mutantes con relación a la variedad original "Superchola", para seleccionar grupos de mutantes sólidos *in vitro*.
- Evaluar la resistencia a *Phytophthora infestans* de los mutantes sólidos, *in vitro*.

## **4. HIPÓTESIS:**

Ho: La radiación ionizante gamma como metodología de mutagénesis no induce a la obtención de mutantes resistentes a *Phytophthora infestans* en la variedad "Superchola".

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Materiales**

#### **5.1.1 Material vegetal**

Plántulas cultivadas "*in vitro*" de papa (*Solanum tuberosum*) variedad "Superchola" obtenidas del laboratorio.

## 5.1.2 Reactivos, equipos e instalaciones

### ➤ Reactivos

Pantotenato de Calcio  
Sucrosa  
Agar  
GA<sub>3</sub> (ácido giberélico)  
Medio Murashige y Skoog (M&S)  
Alcohol

### ➤ Equipos e instalaciones

Irradiador de rayos Gamma fuente Cobalto 60 (Co60)  
Cámara de flujo laminar  
Cuarto de Cultivo

### ➤ Materiales e insumos

Tubos de ensayo  
Gradillas  
Cajas petri  
Pinzas y bisturí  
Cajas de magenta  
Agua desionizada  
Agar  
Empaque plástico adherente  
Inóculo de *Phytophthora infestans*: Raza Compleja 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11

## 5.2 Metodología

### 5.2.1 Características del sitio experimental

#### 5.2.1.1 INIAP

##### a. Ubicación

La presente investigación se llevará a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, INIAP.

##### b. Ubicación política y geográfica:

Provincia:	Pichincha
Cantón:	Mejía
Parroquia:	Cutuglagua
Lugar:	Estación Experimental Santa Catalina-INIAP
Longitud:	79°32'00'' W
Latitud:	00°22'00'' S
Altitud:	3058 m

Temperatura promedio anual: 11.3 °C  
Precipitación promedio anual: 1140.6 mm  
Humedad relativa: 84.3 %

**c. Características del laboratorio (cuarto de cultivo)**

Temperatura promedio 20° C ± 2  
Humedad relativa 70 – 80 %  
Fotoperiodo 14 horas luz  
Intensidad luminosa 10000 – <1000 lux

**5.2.1.2 ESCUELA POLITECNICA NACIONAL**

**a. Ubicación**

La parte de dosimetría y radiaciones ionizantes gamma de los explantes de planta de papa variedad "Superchola" se llevará a cabo en el Departamento de Ciencias Nucleares de la Escuela Politécnica Nacional, ubicado en las calles Ladrón de Guevara y Patria.

**b. Ubicación política y geográfica:**

Provincia: Pichincha  
Cantón: Quito  
Parroquia: La Vicentina  
Lugar: Departamento de Ciencias Nucleares  
Longitud: 78°29'21.63" O  
Latitud: 0°12'37.96" S  
Altitud: 2850 m

**c. Características de la Fuente de Colbalto 60 (Co60)**

Temperatura Promedio: 16 °C  
Potencia de la Fuente: 4200 Curies (Ci)  
Años de vida Útil: 20 años

## 5.2.2 FASES DE EXPERIMENTACIÓN

Esta investigación constará de tres fases. La primera es: Determinación de la dosis Letal Media (LD<sub>50</sub>) y dosis óptima. La dosis óptima es el punto bajo la LD<sub>50</sub> en el cual la población de las unidades experimentales en cada dosis haya sobrevivido en un 70% con respecto a los explantes no irradiados, donde la sobrevivencia es del 100%. Posteriormente la segunda fase consistirá en: Micropropagación de las plantas de variedad "Superchola" generadas a partir de explantes irradiados con dosis óptima de rayos ionizantes gamma y selección de mutantes sólidos. Finalmente la tercera fase que consiste en: Evaluación de la resistencia de los mutantes sólidos a *Phytophthora infestans*, *in vitro*. Cada una de las fases de la experimentación se detallan a continuación.

### 5.2.2.1 Primera Fase: Determinación de la dosis Letal Media (LD<sub>50</sub>) y Dosis Óptima.

#### a. Factores En Estudio

d= dosis

**Cuadro N°1:** Dosis de radiaciones ionizantes gamma.

DOSIS	UNIDADES (Grays)
d <sub>1</sub> (control)	0
d <sub>2</sub>	20
d <sub>3</sub>	40
d <sub>4</sub>	60
d <sub>5</sub>	80
d <sub>6</sub>	100

O= Origen del explante de planta de papa variedad "Superchola"

O<sub>1</sub>= Yema apical

O<sub>2</sub>= Yema axilar

#### b. Tratamientos

**Cuadro N° 2:** Dosis de radiaciones ionizantes gamma vs origen del explante de planta de papa variedad "Superchola".

CÓDIGO	TRATAMIENTO
d <sub>1</sub> O <sub>1</sub>	Radiación de yemas apicales con 0 Grays de la variedad "Superchola".
d <sub>2</sub> O <sub>1</sub>	Radiación de yemas apicales con 20 Grays de la variedad "Superchola".
d <sub>3</sub> O <sub>1</sub>	Radiación de yemas apicales con 40 Grays de la variedad "Superchola".
d <sub>4</sub> O <sub>1</sub>	Radiación de yemas apicales con 60 Grays de la variedad "Superchola".
d <sub>5</sub> O <sub>1</sub>	Radiación de yemas apicales con 80 Grays de la variedad "Superchola".

	"Superchola".
d <sub>6</sub> O <sub>1</sub>	Radiación de yemas apicales con 100 Grays de la variedad "Superchola".
d <sub>1</sub> O <sub>2</sub>	Radiación de yemas axilares con 0 Grays de la variedad "Superchola".
d <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Radiación de yemas axilares con 20 Grays de la variedad "Superchola".
d <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	Radiación de yemas axilares con 40 Grays de la variedad "Superchola".
d <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Radiación de yemas apicales con 60 Grays de la variedad "Superchola".
d <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	Radiación de yemas axilares con 80 Grays de la variedad "Superchola".
d <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	Radiación de yemas axilares con 100 Grays de la variedad "Superchola".

### ***c. Unidad experimental***

La unidad experimental consistirá en una caja *Petri* por dosis y tipo de yema con 25 explantes de planta de papa variedad "Superchola", en agua desionizada estéril.

### ***d. Variables y métodos de evaluación***

#### ***- Porcentaje de mortalidad (%)***

Se evaluará el porcentaje de mortalidad de los explantes MV<sub>0</sub> (provenientes de yemas apicales y axilares) a los 40 días después del tratamiento con diferentes dosis de rayos Gamma fuente Cobalto 60 (Co<sub>60</sub>) y se comparará con el porcentaje de mortalidad de los explantes no irradiados de la misma edad. La relación porcentual permitirá definir la dosis letal media entre observaciones. Se tomará como explante muerto cuando al tiempo de la evaluación no haya crecido.

#### ***- Altura de la planta (cm)***

Se medirá y evaluará la altura de la planta generada a partir de las yemas axilares y apicales (MV<sub>0</sub>) a los 40 días después de que los explantes irradiados con rayos ionizantes gamma en fuente de Cobalto-60 fueran subcultivados en el medio Murashige&Skoog (M&S) para enraizamiento. Se comparará con la altura de las plantas generadas a partir de los explantes no irradiados de la misma edad y entre explantes con diferentes dosis. La altura será medida con la ayuda de una regla milimetrada colocada desde la base del tallo que es el punto donde termina el medio de cultivo hasta el ápice de la planta. Se realizará una relación porcentual de la altura entre observaciones.

#### ***- Número de nudos***

Se evaluará la formación de nudos generados a partir de las yemas apicales y axilares subcultivadas (MV<sub>0</sub>), a los 40 días después de que los explantes irradiados fueran subcultivados en el medio M&S para enraizamiento y desarrollo en las cajas de magenta. Se contarán todos los nudos de la plántula por debajo de la yema

apical. Se comparará el número de nudos entre explantes irradiados con no irradiados y entre explantes con diferentes dosis. Se realizará una relación porcentual de los nudos formados.

#### **- Distancia entre nudos (mm)**

Se medirá y evaluará la distancia entre los nudos generados a partir de las yemas apicales y axilares subcultivadas (MV<sub>0</sub>) a los 40 días después de que los explantes irradiados fueran subcultivados en el medio M&S para enraizamiento. Se medirá la distancia desde el ápice de la planta hasta la base del nudo más cercano y así sucesivamente hasta la base del tallo con ayuda de una regla milimetrada. Se comparará el promedio de la distancia entre nudos de explantes irradiados con no irradiados. Se realizará una relación porcentual de la distancia entre nudos.

### **e. Manejo específico del experimento**

#### **- Preparación de material vegetal para la irradiación**

El material vegetal consiste en plántulas de papa (*Solanum tuberosum*) cultivadas *in vitro* sanas y vigorosas de 40-50 días de edad. Se llevarán las plántulas a una cámara de flujo laminar donde se realizarán los cortes de las yemas apicales y axilares lo más rápido posible.

Las yemas laterales se tomarán de los dos primeros pares de hojas de la parte superior de la plántula justo bajo las hojas del ápice, ya que la distribución de mutaciones somáticas se observa más frecuentemente en las hojas basales y en las yemas axilares de brotes jóvenes (Donini y Mannino, 1990). Se utilizarán 1 caja *Petri* con 25 explantes por dosis y por origen del explante. Las cajas *Petri* serán desechables estériles sin medio de cultivo, tan solo se colocarán gotas de agua desionizada estéril sobre los explantes para evitar que estos se sequen.

#### **- Radiación del material vegetal**

Con los explantes de plantas de papa variedad "superchola" colocados en cajas *Petri* se procederá a la radiación ionizante gamma con las diferentes dosis (0, 20, 40, 60, 80, 100 Grays) utilizando un radiador con fuente de Cobalto-60 (Co60) perteneciente al Departamento de Ciencias Nucleares de la Escuela Politécnica Nacional. Se irradiará una caja *Petri* con 25 explantes por cada dosis y por origen del explante.

Las muestras serán colocadas dentro de la cámara de radiación en las coordenadas: Oeste y Sur – Oeste a cero centímetros del suelo con una distancia de 30 cm del castillo de ápices de cobalto para que la dosificación alcance el 100%, el intervalo de tiempo que deben mantener las unidades experimentales en contacto con la fuente es el siguiente:

**Cuadro N°3: Tiempo de dosificación**

<b>DOSIS (Grays)</b>	<b>TIEMPO (Min)</b>
0	0
20	2.35
40	4.71
60	7.06
80	9.41
100	11.76



### **- Subcultivo del material vegetal irradiado**

Inmediatamente después de que los explantes sean irradiados, estos serán trasladados a un medio básico para el desarrollo de papa (Anexo 1). El medio se encontrará en tubos de ensayo con un volumen de 4.5 ml. Los tubos serán colocados en el cuarto de cultivo con las características especificadas anteriormente. Estos explantes irradiados serán evaluados para la determinación de la dosis letal media ( $LD_{50}$ ) y la dosis óptima de irradiación para la variedad "Superchola" al final de los 40 días de su desarrollo.

### **- Test de Sensibilidad a la Radiación: Dosis Letal Media ( $LD_{50}$ )**

Se realizará una regresión lineal: dosis vs sobrevivencia que permitirá determinar la dosis letal media ( $LD_{50}$ ) que corresponde a la dosis a la cual hayan sobrevivido el 50% de los explantes irradiados subcultivados en un medio básico (Anexo 1).

Así se determinará la respuesta de los explantes a las distintas dosis de radiación. La dosis óptima de radiación se determinará en un punto bajo la  $LD_{50}$  en el cual la población de las unidades experimentales en cada dosis haya sobrevivido en un 70% con respecto a los explantes no irradiados, donde la sobrevivencia es del 100%.

La selección de la dosis también se realizará de acuerdo a la correlación de tres variables más como son: Altura de la planta, número de nudos y distancia entre nudos en cada unidad experimental.

### **5.2.2.2 Segunda Fase: Micropropagación de las plantas de papa variedad "Superchola" generadas a partir de los explantes irradiados con dosis óptima de Rayos Ionizantes Gamma, Selección de Mutantes Sólidos y Deformaciones.**

En esta fase los explantes de las plantas de papa variedad "Superchola" serán sometidos a radiaciones ionizantes gamma con la dosis óptima y sembrados en medio de cultivo M&S, estos constituyen la generación mutante  $MV_0$ . La generación  $MV_0$  consta de 500 explantes provenientes de yemas apicales y 500 explantes provenientes de yemas axilares.

Una vez que las yemas adventicias desarrollen y generen yemas laterales, serán cortadas y sembradas en un nuevo medio constituyendo la generación mutante  $MV_1$ . De cada uno de los explantes provenientes de yemas axilares y apicales de la generación  $MV_0$  se cortarán alrededor de 3 yemas adventicias por lo tanto en la generación  $MV_1$  se contará con 1500 individuos generados a partir de las yemas laterales y 1500 individuos generados a partir de yemas apicales.

Se realizará a partir de la generación  $MV_1$  dos micropropagaciones hasta tener la generación mutante  $MV_3$  con alrededor de 13500 individuos provenientes de yemas laterales y 13500 individuos provenientes de yemas apicales.

La población testigo será el 10% del total de explantes irradiados con dosis óptima proveniente de yemas laterales y apicales, respectivamente, es decir se iniciará con 50 explantes testigos provenientes de yemas laterales y 50 explantes testigos provenientes de yemas apicales.

**CUADRO N° 4.** Nomenclatura de las generaciones mutantes para la variedad "Superchola":

<b>Fuente</b>	<b>Variedad Superchola</b>
Cortes de yemas apicales y axilares	MV <sub>0</sub>
Cortes de yemas apicales y axilares provenientes de generación MV <sub>0</sub>	MV <sub>1</sub>
Cortes de Yemas apicales y axilares provenientes generación MV <sub>1</sub>	MV <sub>2</sub>
Cortes de yemas apicales y axilares provenientes generación MV <sub>2</sub>	MV <sub>3</sub>

**a. Análisis estadístico**

Se llevará a cabo el cálculo de los promedios de los resultados de la evaluación de las variables en estudio en esta fase, las cuales se detallan a continuación. Se seleccionará a los mutantes sólidos de acuerdo a sus características morfológicas.

Se evaluará además el porcentaje de deformaciones aparecidas.

**b. Variables y métodos de evaluación: Generación MV<sub>3</sub>**

**- Altura de la plántula. (cm)**

Se medirá y evaluará la altura de la plántula generada a partir de las yemas adventicias subcultivadas y se comparará con la altura de las plántulas generadas de los explantes no irradiadas a los 45 días después de que las yemas adventicias fueran traspasadas o subcultivadas en el medio Murashige & Skoog (M&S) para enraizamiento y desarrollo en las cajas de magenta. Se realizará una relación porcentual de la altura entre observaciones. La altura será medida con la ayuda de una regla milimetrada colocada desde la base del tallo que es el punto donde termina el medio de cultivo.

**- Frecuencia de mutaciones.**

Al final del ciclo de micropropagación (45 días), de la generación MV<sub>3</sub> se evaluará la frecuencia de mutantes, así mismo se determinará la frecuencia de deformaciones.

**- Porcentaje de mutantes aparentemente sólidos**

Al final del ciclo de micropropagación (45 días), de la generación MV<sub>3</sub> se evaluará el porcentaje de mutantes aparentemente sólidos. Se considerará como un mutante aparentemente sólido a aquella plántula no deforme con presencia de características morfológicas antiguas o ganadas al final del ciclo.

### ***c. Manejo específico del experimento***

#### **- Irradiación del material vegetal**

Se irradiarán 10 cajas *Petri* con 50 explantes procedentes de cortes de yemas laterales y 10 cajas *Petri* con 50 explantes procedentes de cortes de yemas apicales. Las 20 cajas *Petri* se irradiarán con la dosis óptima.

#### **- Subcultivo del material vegetal irradiado**

Una vez que los explantes hayan sido irradiados serán trasladados al medio básico para el desarrollo de papa (Anexo 1). El medio estará en tubos de ensayo con un volumen de 4.5 ml., y serán colocados en el cuarto de cultivo con las características especificadas en la página 5. Estos explantes constituyen la generación mutante  $MV_0$ .

#### **- Preparación del medio de cultivo para desarrollo y micropropagación de plantas**

El medio utilizado para la brotación de yemas adventicias está basado en el Manual de Capacitación del CIP, 1997 (anexo 1).

Para la preparación de 1 l de medio M&S básico para el enraizamiento y desarrollo se utilizará una balanza analítica pesando en cantidades exactas 20 g de azúcar, 4.3 g de medio M&S, estos serán diluidos en agua destilada, aforando a 1 l de solución. Se adicionará 5 g de agar y serán diluidos completamente por 10 min en el horno microondas.

El medio será autoclavado a 15 psi de presión durante 20 min. a una temperatura de 121°C. El medio será dispersado en cajas de magenta estériles bajo condiciones de asepsia en la cámara de flujo laminar, se sellarán las cajas con empaque plástico adherente y se mantendrá en refrigeración a 4°C hasta el momento de la siembra.

#### **- Micropropagación de mutantes y quimeras**

La generación  $MV_0$  luego de los 45 días serán llevados a una cámara de flujo laminar donde se realizará la primera micropropagación que corresponde a la generación mutante  $MV_1$ . De igual manera se hará el seguimiento de su crecimiento durante de 45 días y se realizará la segunda micropropagación (generación mutante  $MV_2$ ). El proceso se repite hasta tener la generación mutante  $MV_3$ .

#### **- Selección de deformes**

Los mutantes de la generación  $MV_3$  serán evaluados para la selección de mutantes aparentemente sólidos. Excluyendo a las deformaciones tomando parámetros de clasificación a los tallos y hojas.

### **5.2.2.3 Tercera Fase: Evaluación de la resistencia de los mutantes a *Phytophthora infestans*, in vitro.**

#### **a. Unidad experimental**

La unidad experimental es un frasco de vidrio con cinco cortes de yemas laterales uninodales provenientes de mutantes sólidos seleccionados en la segunda fase.

La población testigo será el 10% de la población de mutantes sólidos seleccionada para la inoculación y la unidad experimental consistirá en un frasco de vidrio con cinco cortes de yemas laterales uninodales provenientes de plantas de papa variedad "Superchola" no irradiadas con dosis óptima.

#### **b. Análisis estadístico**

Se llevará a cabo el cálculo de los promedios de los mutantes sólidos de acuerdo al porcentaje de sobrevivencia después de la inoculación con el hongo.

#### **c. Variables y métodos de evaluación**

##### **- Porcentaje de interacciones compatibles e incompatibles del inoculo de *Phytophthora infestans* con mutantes sólidos (%)**

Se evaluará el porcentaje de las interacciones compatibles e incompatibles dependiendo del nivel de susceptibilidad del mutante sólido y de la agresividad del inóculo de *Phytophthora infestans* y comparando con el porcentaje de las interacciones de plantas no irradiadas con dosis óptima e inoculadas con *Phytophthora infestans*.

Las interacciones serán calificadas de acuerdo a la siguiente escala (Huang, S.; *et al*, 2005):

Interacciones compatibles:

Interacción Clase 1: Lesión extendida con esporulación masiva.

Interacción Clase 2: Lesión extendida con poca o sin esporulación.

Las interacciones incompatibles serán calificadas como:

Interacción Clase 5: Sin síntomas o necrosis localizada.

Interacción Clase 4: Rastros de necrosis.

Interacción Clase 3: Entre interacciones compatibles e incompatibles. Se observa en la misma unidad experimental hojas con esporulación y otras con necrosis.

#### **d. Manejo específico del experimento**

##### **- Determinación de la resistencia a *Phytophthora infestans* en mutantes sólidos.**

**Materiales y Métodos** (Huang, S.; *et al*, 2005):

##### **- Preparación del material vegetal *in vitro*:**

Para preparar el material vegetal para la inoculación *in vitro*, se cortará yemas laterales uninodales y serán trasplantadas hacia frascos de vidrio (diámetro de 10 cm) o a frascos de plástico (diámetro de 15 cm) con medio MS30. Cada frasco contendrá cinco cortes de yemas laterales uninodales con un espacio de separación de 2 a 3 cm entre cortes y entre las paredes internas del frasco. Las condiciones de crecimiento *in vitro* serán: 24°C, 16 horas de luz y 8 de obscuridad. Las plantas que presenten entre tres a cuatro hojas completamente desarrolladas serán usadas para la inoculación. Generalmente tomará entre 4 a 5 semanas para que el follaje este suficientemente desarrollado para la inoculación.

- **Aislamiento, mantenimiento y preparación del inóculo de *Phytophthora infestans*:** El aislamiento, mantenimiento y preparación del inóculo será desarrollado de acuerdo a un protocolo ya establecido (Anexo N° 2).

##### **- Inoculación:**

Para el ensayo de la inoculación *in vitro*, las tres hojas más grandes de cada planta serán inoculadas mediante una pipeta de 10 µl. Se colocará una gota por hoja de una suspensión de zoospora a una concentración de  $2.5 \times 10^4$  esporas por ml sobre el lado adaxial. La preparación del inóculo y la inoculación serán desarrolladas en condiciones estériles. Las hojas que hayan tocado la pared interna, la tapa de los frascos o el medio serán excluidas porque estas hojas se volverán más susceptibles que las otras hojas de la misma planta. Los frascos con las plantas inoculadas *in vitro* serán encubadas en una cámara de 16 horas de luz y 8 de obscuridad a 16 °C.

Se anotará los resultados de resistencia o susceptibilidad a los 6 u 8 días postinoculación (dpi).

## 6. PRESUPUESTO DEL PROYECTO

Rubro	Unidad	Precio Unitario USD	Cantidad	Valor
<b>A. PERSONAL</b>				
Tesista	Estudiante	292	12	3504
<b>Total</b>				<b>3504</b>
<b>B. INSUMOS</b>				
<b>Producción 40 litros de medio</b>				
Medio MS simple	L	3,37	25	84,25
Pantonenato de Calcio	Mg	0,38	80	30,4
Acido Giberélico	Mg	0,38	150	57
Sacarosa	G	0,03	200	6
Agar	G	0,3	50	15
Alcohol	L	1	3	3
Agua destilada	L	0,1	20	2
Desinfectante	L	1	2	2
Jabón Líquido	L	2	2	4
Parafilm	M	1,705	2	3,41
Mascarilla	Unidad	0,2	15	3
Hojas Bisturí	Unidad	0,2	320	64
Fundas	Unidad	0,01	100	1
Papel Aluminio	Paquete	4	2	8
Papel absorbente	Paquete	1	5	5
Cinta autoclave	Rollo	4	1	4
Autoclave	Unidad	909	1	136,35
Cámara de flujo	Unidad	12656	2	4007,73
<b>Total</b>				<b>4321,49</b>
<b>C. MATERIALES</b>				
Tubos de ensayo	Unidad	0,7	1000	700
Cajas petri	Unidad	0,75	5	3,75
Probetas (1000 ml)	Unidad	53	1	53
Probetas (100 ml)	Unidad	23	1	23
Pipetas (1 ml)	Unidad	0,67	1	0,67
Pipetas (10 ml)	Unidad	0,97	1	0,97
Matraces (10 ml)	Unidad	27,71	1	27,71
Vasos de precipitación (250 ml)	Unidad	20	1	20
Magentas	Unidad	1,74		0
Mangos de Bistrurí	Unidad	19	2	38
Espatulas	Unidad	30	2	60
Pinzas	Unidad	20	2	40
Mecheros de alcohol	Unidad	4	2	8
Tijeras	Unidad	10	2	20
Marcadores	Unidad	4	2	8

Bandejas	Unidad	3	2	6
Mandiles	Unidad	20	1	20
Barras magnéticas	Unidad	1	1	1
<b>Total</b>				<b>1030,1</b>
<b>D. EQUIPO</b>				
pH/metro	Unidad	766	1	114,9
Plato calentador	Unidad	420	2	133
Dispensador	Unidad	93	1	13,95
Agitador Magnético	Unidad	432	1	64,8
Destilador	Unidad	1849	1	277,35
Higrotermógrafo	Unidad	1318	1	197,7
Reloj laboratorio	Unidad	22	1	3,3
Humificador	Unidad	237	1	35,55
Estufa	Unidad	1548	1	232,2
Balanza de precisión	Unidad	2521	1	378,15
Macro balanza	Unidad	327	1	49,05
Refrigeradora	Unidad	554	1	83,1
Calentador de agua	Unidad	136	1	20,4
Extractor de aire	Unidad	41	1	6,15
Fluorescentes	Unidad	20	12	39,6667
Esterilizador	Unidad	278	1	41,7
<b>Total</b>				<b>1690,97</b>
<b>E. MATERIALES DE OFICINA</b>				
Papel A4	Resma	4	5	20
Tinta de impresión	Unidad	10	5	50
Material fotográfico	Unidad	20	10	200
Empastado del texto	Unidad	10	10	100
Copias	Unidad	0,05	100	5
<b>Total</b>				<b>375</b>
<b>Subtotal</b>				
				<b>10921,6</b>
<b>Imprevistos</b>		<b>5%</b>	<b>546,078</b>	
<b>TOTAL: INIAP, I.A.E.A y Tesista</b>				<b>11467,6</b>

**ESCUELA POLITECNICA NACIONAL**

Rubro	Unidad	Precio Unitario USD	Cantidad	Valor
<b>SUBIDA DE LA FUENTE DE COBALTO - 60</b>				
Radiación Gamma	n° de subidas	100	20	2000
<b>TOTAL E.P.N</b>				<b>2000</b>

<b>TOTAL PRESUPUESTO TESIS</b>	
<b>INIAP</b>	3096,1
<b>E.P.N</b>	2000
<b>I.A.E.A</b>	4321,5
<b>TESISTA</b>	3504
<b>TOTAL PRESUPUESTO TESIS</b>	<b>12922</b>

<b>FINANCIAMIENTO</b>				
INSTITUCIÓN	RUBRO			%
<b>INIAP</b>	Materiales de Laboratorio, oficina y equipos			23,96
<b>I.A.E.A</b>	Insumos de Cultivo in vitro, cámara flujo laminar y autoclave			33,444
<b>E.P.N</b>	Radiaciones fuente de Cobalto 60			15,478
<b>TESISTA</b>				27,117





## 8. BIBLIOGRAFÍA

Broertjes, C., Van Harten, A. 1978. "Application of Mutation breeding in the Improvement of Vegetatively Propagated Crops: An Interpretative Literature Review". Elsevier Science Publishing, Amsterdam and New York.

CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA, CIP, 1997. "Producción de tubérculos-Semillas de papa", Manual de Capacitación (CIP), Lima, Perú.

CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA. 1997. Laboratory Manual for *Phytophthora infestans* work at CIP - Quito. Quito. p: 8 - 10.

Cuesta, X.; Castillo, C.; Rivadeneira, J.; Guevara, G. 2005. "Uso de especies silvestres para la obtención de variedades de papa resistentes al tizón tardío con la activa participación de los agricultores en Ecuador". Quito-Ecuador. Consultado 2008-05-21. Disponible en [http://www.senacyt.gov.ec/files/investigacion\\_primer\\_pedido.pdf](http://www.senacyt.gov.ec/files/investigacion_primer_pedido.pdf).

Cuesta, X.; Andrade, H.; Piedra, J.; Carrera, E. 1998. "Obtención de Clones de papa con resistencia Horizontal al tizón tardío" En. XVII Reunión de la Asociación Latinoamericana de la papa. Cochabamba – Bolivia.

Cuesta, X.; Andrade, H. 2000. "Selección de los clones del papá con resistencia al tizón tardío con la participación de agricultores" En. XVIII Reunión de la Asociación Latinoamericana de la papa. La Habana Cuba.

Cruz, E.; Yumisaca, F.; Cuesta, X. 2006. "Validación de variedades y clones de papa solanum tuberosum l. Resistentes a tizón tardío *Phytophthora infestans* (mont) de bary con estrategias de aplicación de un fungicida protectante". Quito-Ecuador. Consultado 2008-05-23. Disponible en <http://www.quito.cipotato.org>

Donini, B.; Mannino, P. 1990. "Mutation breeding programs for the genetic improvement of vegetatively propagated plants in Italy". In Dipartimento Agrobiotecnologie. Centro Ricerche Energia Casaccia. Comitato Nazionale per la Ricerca e per lo Sviluppo dell'Energia Nucleare e delle Energie Alternative (ENEA). International Symposium on the Contribution of Plant Mutation Breeding to Crop Improvement. Viena, Austria. p.240.

Guerrero, D. 2005. "Proyecto compartido-plataforma de producción y comercialización de papa con marca Quero-Guano". Informe Técnico. Plataformas de concertación. INIAP-Proyecto Fortipapa. Quito-Ecuador

Grupo Consultivo Internacional Sobre Irradiación de Alimentos, GCIIA. 2002. "La Irradiación de Alimentos: Hechos y Realidades". Secretaría del GCIIAA, División Mixta FAO/OIEA de Técnicas Nucleares en la Agricultura y la Alimentación. Viena, Austria. p 1.

Herrera, M., Carpio, H. y Chávez, G. 1999. Estudio sobre el Subsector de la Papa en el Ecuador. CIDES, INIAP, COSUDE, CIP. PNRT-Papa, Quito, Ecuador. p: 140.

Huang, S.; Vleehouwers, V.; Visser, R.; and Jacobsen, E. 2005. "An accurate *in vitro* assay for high-throughput disease testing of *Phytophthora infestans* in potato".

Laboratory of Plant Breeding. Department of Plant Sciences, Wageningen University. The Netherlands. Pp 89: 1263-1267.

Jaramillo, S. 2003. Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mon) de Bary. Universidad Nacional de Colombia, Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 137 p.

Murrillo, R., Mendoza, V. 1998. "Breeding of bitter potato (*Solanum juzepczukii*) through mutation induction and tissue culture techniques". División de Agricultura-Lab. Biotecnología Vegetal, Instituto Boliviano de Ciencia y Tecnología Nuclear (IBTEN), La Paz, Bolivia.

IAEA. 1986. "Nuclear Techniques and *in vitro* culture for plant improvement". Proceedings of a Symposium. Vienna, Austria 1985. pp 121- 128, 385-391.

Pumisacho, M.; Sherwood, S. 2002. El cultivo de la papa en Ecuador. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) y Centro Internacional de la Papa. Primera Edición. p. 229

Van Hart, A., Bouter, H., Van Ommeren, A. 1972. " Preventing quimerism in potato (*Solanum tuberosum*)". Euphytica 21. pp 11-21

## 9. ANEXOS

### Anexo 1. Preparación del medio de cultivo para introducción de brotes de tubérculo.

El medio consiste de:

Agar	0.8%
Medio Murashige & Skoog (5524 SIGMA)	4.3 g/L
Sucrosa	3%
GA <sub>3</sub>	0.2 ppm
Pantotenato de calcio	2 ppm

Fuente: CIP, 1997

### Anexo 2. Aislamiento, mantenimiento y preparación del inóculo de *Phytophthora infestans*

#### - **Obtención de muestras de *Phytophthora infestans*.**

Una vez que se observan las primeras lesiones en los genotipos de papa en campo, se procede a cortar folíolos que presenten una lesión. Se toman varias muestras de lesiones por *Phytophthora infestans* de cada uno de los genotipos de papa por localidad.

#### - **Aislamiento de *Phytophthora infestans*.**

Las muestras de folíolos enfermos obtenidas en el campo son colocadas con su respectiva identificación en cámaras húmedas. Una vez que ha crecido el micelio sobre las lesiones, en la cámara de flujo laminar, se siembra cada aislamiento en el medio de cultivo Agar-Centeno para su crecimiento. Cada aislamiento se multiplica y se mantiene puro.

#### - **Siembra de genotipos de papa en invernadero.**

La semilla de los genotipos evaluados junto con el set de diferenciales de papa se siembra en macetas plásticas bajo invernadero, como fuente de folíolos para las inoculaciones de *Phytophthora infestans*.

#### - **Toma de folíolos.**

El muestreo se realiza luego de 5-6 semanas de la siembra. Durante la mañana, se seleccionaron los folíolos de tamaño uniforme. Los folíolos se colocan con el envés hacia arriba en cada caja, sin que tuvieran contacto con el agar-agua del fondo de las cajas.

#### - **Multiplicación del inóculo.**

Para la multiplicación del inóculo se realiza una infección en folíolos de la variedad Uvilla (susceptible y carente de genes mayores); estos folíolos se mantuvieron en cajas plásticas con alta humedad relativa interior.

#### - **Preparación del inóculo.**

Para la obtención de esporangios los folíolos con el hongo crecido y esporulando, son lavados en un chorro de agua esterilizada. La suspensión luego se pasa a través de un filtro 20µm para eliminar impurezas. Posteriormente, se refrigera por el espacio de una hora a 10°C, para inducir la liberación de zoósporas.

Una vez verificada la presencia de zoósporas, la suspensión se calibra con ayuda de un hematocitómetro a 5000 zoósporas/ml por dilución con agua estéril.

- ***Inoculación de folíolos.***

Las inoculaciones se realizan en la tarde. Con una micropipeta, se ubica una gota de inóculo de 20µl, a un lado del eje principal del envés del folíolo.

- ***Incubación.***

Las cajas se sellan con papel parafilm y se ubican en un cuarto de incubación a 18°C y recibían 14 horas de luz diariamente

**Fuente:** Centro Internacional de la Papa. 1997. Laboratory Manual for *Phytophthora infestans* work at CIP - Quito. Quito. p: 8 - 10.