



**INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE  
INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS  
(INIAP)**

**DEPARTAMENTO NACIONAL DE RECURSOS  
FITOGENÉTICOS Y BIOTECNOLOGÍA  
(DENAREF)**

# **INFORME ANUAL 2003**

*Quito – Ecuador*

*Febrero, 2004*

## **PREFACIO**

Este informe recopila los esfuerzos realizados por el Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos y Biotecnología (DENAREF) durante el año 2003 hacia la preservación de los recursos fitogenéticos nativos que se encuentran en amenaza de erosión genética o pérdida de su diversidad en el campo o en áreas naturales. Los resultados de los trabajos que se reportan en las siguientes páginas son halagadores y estimulan el uso de esta fracción importante de la agrobiodiversidad.

Este documento es una muestra de la diaria y abnegada dedicación del personal técnico, científico y administrativo que por más de dos décadas ha colaborado y ha tomado decisiones para la oportuna preservación, manejo y gestión de este importante patrimonio nacional y en especial durante el año 2003.

A continuación se presenta una descripción de cada una de las fases de trabajo del DENAREF, tales como: exploración y recolección de germoplasma; introducción, intercambio y custodia; conservación; refrescamiento y multiplicación; caracterización y evaluación; y, documentación y uso del germoplasma. De igual modo, se compila la información correspondiente a los proyectos de investigación que contempla el POA (Plan Operativo Anual) ejecutado a través de los fondos estatales asignados a INIAP, y también aquellos asignados por donantes foráneos.

Las investigaciones realizadas son de carácter básica y también aplicada, tanto a nivel de Sierra (Quito – sede del DENAREF), Costa (Quevedo – unidad de trabajo en el Litoral), como también en la Amazonía (Francisco de Orellana – unidad de trabajo en el Oriente Ecuatoriano). Las acciones que se describen en este marco pretenden colocar a disposición de diversos usuarios la materia prima que colabora hacia una de las metas del INIAP: la oferta de alimento.

## PERSONAL DEL DENAREF EN EL PERÍODO 2003

### Personal en la sede del DENAREF (EESC):

Dr. Jaime Estrella E.	Líder, DENAREF (Hasta febrero 2003)
Ing. Agr., MSc. César Tapia B.	Líder, DENAREF (Desde mayo 2003)
Ing. Agr., MSC Alvaro Monteros	Banco de germoplasma; documentación
Biól. Eduardo Morillo V. ♦	
Biól. Gabriela Piedra B. ♣	Actividades de biología molecular, <i>in vitro</i> , estudios especiales
Ing. Agr. Marcelo Tacán P.	Banco de germoplasma; documentación
Ing. Agr. Luis Fellpe Lima	RTAC Proyecto PCN Cotacachi
Agr. Fernando Paredes	Manejo de colecciones
Agr. Juan Villarroel E.	Manejo de colecciones
Sra. Soraya Carvajal R.	Secretaría; servicios de información
Egdo. Eddie Zambrano	Proyecto Naranjilla - IAEA

### En la Unidad de Trabajo de la Amazonía (URFB/A NP - EENP):

Ing. Agr. Nelly Paredes A.	Responsable de la Unidad en Napo-Payamino. Colecciones de campo; manejo de frutales
----------------------------	--

### En la Unidad de Trabajo de la Costa (URFB/A Pi - EETP):

Ing. Agr. Fausto Brito B.	Responsable de la Unidad en Pichilingue. Colecciones de campo; manejo de frutales
---------------------------	--

♦ Estudios de post grado en Francia

## ÁMBITO ESTRATÉGICO DEL DENAREF

### Misión del DENAREF

Realizar esfuerzos a nivel nacional para evitar la erosión genética y cultural de numerosas especies en vías de extinción mediante la colecta, conservación, manejo integral y uso sostenible de la diversidad agrícola del país utilizando estrategias *ex situ* e *in situ*.

### Visión del DENAREF

El DENAREF, a través de técnicas de conservación y manejo integral de recursos fitogenéticos, ha consolidado un Banco Nacional de Germoplasma cuyas acciones se orientan a potenciar la diversidad genética nativa e introducida hacia su uso sostenible, y así contribuir a elevar los niveles de calidad de vida.

### Objetivos del DENAREF

- Conservar la ABD y evitar la erosión genética de los cultivos nativos y sus especies silvestres relacionadas, a través de técnicas *ex situ* e *in situ*, complementadas con investigación básica (botánica, fisiología, biotecnología, biología molecular, etc.).
- Caracterizar y evaluar las diferentes colecciones de germoplasma.
- Coordinar actividades en la temática de agrobiodiversidad con entidades nacionales e internacionales.
- Promocionar la preservación y uso sostenible de la amplia riqueza genética de plantas que dispone el Ecuador.

### Valores

- Capacidad técnica y científica para la formulación y ejecución de proyectos.
- Infraestructura y recursos adecuados.
- Laboratorios (biotecnología, calidad de semilla, etc.) adecuadamente equipados.
- Trabajo en equipo multidisciplinario.
- Puntualidad, proactividad, anticorrupción.
- Personal capacitado con habilidades de ejecución y liderazgo.

### Políticas

- Esfuerzos coordinados para evitar la erosión genética de los recursos fitogenéticos, así como para conservar y manejar el germoplasma nativo e introducido.
- Formulación de proyectos de investigación y desarrollo.
- Capacitación continua del personal.
- Reclutamiento de personal joven con vocación investigativa, talento y liderazgo.
- Alianzas estratégicas con actores dentro y fuera de INIAP.

# ÍNDICE

	<i>Pág.</i>
<b>PREFACIO</b>	<b>i</b>
<b>Personal del DENAREF período 2002-2003</b>	<b>ii</b>
<b>Ámbito estratégico del DENAREF</b>	<b>iii</b>
<b>PROYECTO 1</b>	
<b>Conservación y uso sostenible de la biodiversidad agrícola: El Banco de Germoplasma del INIAP</b>	<b>1</b>
Actividades	
Introducir e intercambiar germoplasma	5
Mantenimiento de 14000 entradas de diferentes cultivos en cámara refrigerada a -15° C	8
Monitorear, refrescar y multiplicar varias especies conservadas en el banco de semillas	10
Manejar en campo las colecciones de melloco, oca y mashua (TAs)	12
Manejar en campo las colecciones de zanahoria blanca, jícama, miso y achira (RAs)	15
Mantenimiento de la colección nacional de capulí	18
Evaluar y mantener el jardín experimental de observación de especies medicinales de la Sierra Ecuatoriana	19
Conservar <i>in vitro</i> 328 accesiones (morfotipos) de RTAs	21
Mantenimiento de las colecciones de frutales amazónicas y de cacao en la Granja San Carlos-EENP	20
Formación de bases de datos de germoplasma en el programa Excel, documentación de germoplasma y edición de la base de datos bibliográfica	24
Publicar artículos científicos en revistas nacionales e internacionales	26
Implementar la Comunidad Agro-Virtual (CAV) en INIAP	27
<b>PROYECTO 2</b>	
<b>Estudios para la identificación del potencial uso de los recursos fitogenéticos (pre-mejoramiento)</b>	<b>29</b>
Actividades	
Identificar medios de cultivo y condiciones de crecimiento para especies de importancia	31
Caracterización morfo-agronómica y molecular de la colección de achira	33
<b>PROYECTO 3</b>	
<b>Oferta de servicios: Marcaje molecular, cultivo de tejidos y custodia de germoplasma</b>	<b>37</b>
Actividades	
Identificar variedades y cultivares utilizando marcadores moleculares	39
Realizar servicio de germinación de semillas de diversas especies de importancia económica	42
Realizar servicio de conservación de semilla a largo plazo en banco base a -15° C	47
Realizar custodia <i>in vitro</i> y en invernadero de muestras de variedades	49
Realizar examen DHE de variedades en trámite del registro de obtentor	52
<b>PROYECTO 4</b>	
<b>Proyecto Integral Las Huaconas (Programa Colaborativo de Conservación y Uso de la Biodiversidad de RTAs) CIP-COSUDE</b>	<b>54</b>
Actividades	
Publicar un catálogo de morfotipos de RTAs	56
Elaborar un libro que describa las experiencias, avances y estrategias del PI Las Huaconas	58
Elaborar un disco compacto de la sistematización de experiencias <i>in situ</i> (estudio de caso)	60

	Apoyar al Municipio de Colta en actividades de capacitación agronómica y nutricional	61
<b>PROYECTO 5</b>	<b>Conservación complementaria y uso sostenible de cultivos subutilizados en Ecuador. Rescate, promoción y uso de recursos fitogenéticos interandino del Ecuador</b>	<b>64</b>
Actividades		
	Realizar un inventario de las existencias en el banco de germoplasma de los cultivos priorizados	69
	Identificar accesiones representativas a ser evaluadas en la(s) finca(s), tomando en cuenta las preferencias de los agricultores y las necesidades de mercado	71
	Definir descriptores para los estudios de caracterización agromorfológica (con enfoque participativo)	73
	Caracterizar morfológica y molecularmente las colecciones en las comunidades y en el laboratorio	77
	Documentar y analizar comparativamente la información generada	83
	Planificar y desarrollar encuestas en las comunidades seleccionadas con el propósito de documentar la diversidad genética, el conocimiento local de los cultivos de interés y las preferencias, necesidades y percepciones de los agricultores y consumidores sobre la diversidad	84
	Documentar los sistemas formales e informales de abastecimiento de semillas	86
	Identificar los agricultores que participarán en el mantenimiento de los terrenos de caracterización, así como en la caracterización y evaluación de los cultivos	88
	Sistematizar la información existente sobre parientes silvestres y afines, cultivares tradicionales, variedades mejoradas, etc.	89
	Identificar vacíos (materiales no representados) en las colecciones de germoplasma	94
	Contratar y entrenar personal técnico de apoyo (estudiantes becarios para el desarrollo de cuatro tesis de grado: una por cada acervo genético y una investigación sobre el sistema de finca)	98
	Planificar y desarrollar viajes de colecta de germoplasma en los valles interandinos	99
<b>PROYECTO 6</b>	<b>Reactivación de las colecciones de germoplasma del INIAP</b>	<b>101</b>
Actividades		
	Caracterización y fomento para uso de las colecciones de frutales amazónicos	103
	Estructurar proyectos de aplicación a fondos para la obtención de financiamiento	111
	Mantenimiento de las colecciones de frutales amazónicos	117
	Mantenimiento de la colección de cacao ( <i>Theobroma</i> sp.) de la Granja San Carlos	119
	Mantenimiento de las colecciones de frutales tropicales	121
<b>PROYECTO 7</b>	<b>Conservación de la agrobiodiversidad en Comunidades Indígenas de la Cordillera de El Cóndor - Ecuador</b>	<b>123</b>
Actividades		
	Establecer bancos de germoplasma comunales	125
	Documentar y desarrollar un concepto del manejo comunal de semillas	127
<b>PROYECTO 8</b>	<b>Inducción de mutaciones en naranjilla (<i>Solanum quitoense</i> Lam.)</b>	<b>139</b>
Actividades		
	Realizar inducciones a mutaciones de naranjilla a partir de plantas o explantes <i>in vitro</i>	141

<b>PROYECTO 9</b>	<b>Apoyo al manejo sustentable de los recursos naturales en la zona de amortiguamiento de la cordillera de El Cóndor, mediante el mejoramiento de los sistemas de producción en comunidades indígenas y de colonos</b>	<b>149</b>
<b>PROYECTO 10</b>	<b>Fortalecimiento para el Manejo e Intercambio de Información de Recursos Fitogenéticos para América Latina y El Caribe</b>	<b>150</b>
<i>Actividades</i>		
	Realizar un inventario de la situación de los recursos fitogenéticos en lo referente a conservación, caracterización, documentación, intercambio, sensibilización, gestión, entre otras	154
	Realizar la sistematización de la información y utilizar como insumo en el informe nacional del Ecuador, la información disponible en la CAN, FAO y el Ministerio del Ambiente	156

---

**Actividad:** Realizar inducciones a mutaciones de naranjilla a partir de plantas o explantes in vitro

---

**Código:** 63802 R01-A02  
**Responsables:** Ing. César Tapia, Egdo. Eddie Zambrano  
**Inst. participantes:** INIAP, IAEA  
**Inicio:** 2001  
**Terminación:** Permanente

---

• **Introducción**

La naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) es originaria de las estribaciones montañosas de los Andes de Ecuador y Colombia (Heiser, citado por Soria, 1997). En Ecuador el área de mayor cultivo se encuentra en los valles de las provincias de la amazónicas del Puyo, Napo; Morona Santiago (NRC, 1989).

Según Heiser (1991) se han reportado dos variedades botánicas *Solanum quitoense* var. *quitoense* (sin espina) y *Solanum quitoense* var. septentrionales (con espina). En Ecuador las variedades tradicionales de naranjilla tales como Baeza, Peluda y Bolona casi han desaparecido, debido a la alta susceptibilidad de plagas y enfermedades, especialmente al nemátodo del nudo de la raíz (*Meloidogyne incógnita*). Frente a esta instancia tradicionalmente los cultivares y variedades de naranjillas se siembran en áreas vírgenes (especialmente en zonas de la Amazonía), como un mecanismo de escape a patógenos.

Actualmente en Ecuador se cultiva también la variedad INIAP-Palora, que proviene de una selección de *S. sessiliflorum* llamada comúnmente "cocona" la cual posee frutos grandes. Los problemas fitosanitarios del cultivo son causado mayoritariamente por nemátodos ya que reducen la vida útil de la planta de 5 años a 1 ó 2 años.

INIAP condujo un estudio (Ayala, 1996) acerca de la inducción de mutaciones por irradiación de semillas de naranjillas con rayos gama ( $^{60}\text{Co}$ ). En este estudio se probaron dosis diferentes de 50 a 600 Gy a intervalos de 50 Gy, usando 100 muestras en cada dosis. La dosis de 50 a 200 Gy produjeron plantas anómalas, de las cuales aproximadamente un 4 % mostró resistencia a nemátodos.

Dada la aparente estrecha base genética de la especie cultivada, la inducción a mutaciones puede favorecer la aparición de un genotipo con características deseables. Sobre esta base, el presente estudio tiene como objetivo fundamental el generar resistencia a nematodos en la naranjilla a través de la irradiación de semilla sexual y nudos (yemas axilares) de la variedad Baeza, empleando rayos gamma ( $^{60}\text{Co}$ ) y atendiendo a los parámetros de bioseguridad (DENAREF, 2001).

• **Propósitos y resultados por lograr**

**Objetivos:**

**General:**

- Generar resistencia a nematodos en germoplasma de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) de la variedad Baeza a través de la irradiación de semillas y nudos (yemas axilares) de plantas *in vitro*.

**Específicos:**

- Aplicar dosis de 50Gy de rayos gamma ( $^{60}\text{Co}$ ) en semillas de la variedad Baeza.
- Probar las mejores dosis de irradiación de nudos (yemas axilares) comprendidas entre 1 a 12 Gy para generar resistencia a nemátodos.
- Evaluar el grado de resistencia a nematodos generado en el material en estudio resultado de la aplicación de la irradiación a semillas y nudos (yemas axilares) de naranjilla.



## **Hipótesis:**

La irradiación de semillas de la variedad Baeza de naranjilla permite incrementar su variabilidad genética y generar resistencia a nemátodos.

## **• Materiales y métodos**

### **Inducción a mutaciones de naranjilla usando semillas**

#### ***Colección de semillas***

Semillas de *S. quitoense* var *Baeza* y *Peluda* fueron extraídas desde frutos colectados en la Estación Experimental Palora (EFP), (910 msnm, 1° 52' S y 78° 3' W). Los frutos fueron colectados a dos períodos de tiempo diferentes, enero y marzo del 1999.

#### ***Test de radiosensitividad in vivo***

Semillas de naranjilla (250) de las variedades locales Baeza y Peluda se enviaron a la Unidad de Mejoramiento de Seibersdorf (Austria), para desarrollar test de radiosensitividad. Las semillas fueron esterilizadas con 70% alcohol, 30% p/v Clorox (blanqueador comercial con 5.2% (p/v) NaOCl). Las semillas fueron esterilizadas por 10-15 min. Entonces, se lavaron con agua estéril (3 veces) y transferidos a medio MS con 0.18% gelrite y 3% sucrose en tubos de ensayo. Este test se condujo con 10 semillas por tratamiento con dosis entre 100 y 750 Gy incluyendo un control.

Simultáneamente, 2000 semillas de var. Baeza se enviaron a la Comisión Ecuatoriana de Energía Atómica para radiación con dosis de 50 Gy, basado en estudios previos en Ecuador Revelo y Ayala (1999). Parámetros de bioseguridad básicos fueron aplicados durante todo el proceso.

#### ***Germinación de semillas irradiadas***

Semillas mutadas provenientes de la Comisión Ecuatoriana de Energía atómica fueron germinadas en la sección oriental de la Estación Experimental Santa Catalina, localizada a 0°23' S y 78°31' W, 2480 msnm. Las semillas germinaron en un germinador *Seedburo*® con temperaturas alternas de 15 y 25°C cada 12 horas y 80% de humedad relativa. Las semillas de naranjilla fueron ubicadas en cajas petri de 10 cm de diámetro con papel toalla embebida en 75 ppm de GA3. El porcentaje de germinación fue evaluado después de 13, 16, 20 y 26 día de imbibición.

#### ***Evaluación en invernadero***

Las plántulas se transplantaron en macetas con 500 g de suelo estéril (suelo, arena y humus en relación 3:1:1) y localizadas en un invernadero (24°C y 70% HR). Agua fue provista cuando fue necesario. Se registraron variables a los 10, 25, 30 y 42 días como largo de planta (cm), número de hojas por planta, tamaño de hoja (ancho y largo en cm), presencia y ausencia de espinas. Cuando las plantas estuvieron de 12 cm de alto y en promedio 5 hojas verdaderas, fueron inoculadas.

#### ***Inoculación de nematodos***

Para establecer el protocolo de inoculación de nematodos (previa a la evaluación de 1500 plantas), una inoculación primaria se llevó a cabo con una muestra aleatoria de 5 plantas de plantas irradiadas de naranjillas incluyendo el mismo número de plantas de control (no irradiadas). La inoculación se llevó a cabo en el Laboratorio de Nematología de la EES Catalina.

Las plantas de naranjilla fueron inoculadas con 5000 y 10000 de *Meloidogyne incognita*. El inóculo fue preparado de raíces infectadas de naranjilla colectadas en un campo comercial cerca de Palora. Las agallas fueron cortadas en pequeños pedazos para aislar los huevos de nematodos de acuerdo a la técnica del Hipoclorito de sodio, descrita en Hussey y Barker, (1973) y expresada en huevos por maceta. Se obtuvo una concentración de 1000 huevos/ml. La cantidad de inóculo fue de 10 huevos por gramo de substrato (Población Inicial PI).

### **Evaluación de nemátodos**

**Para identificar la resistencia de nematodos de los mutantes, los siguientes tratamientos fueron establecidos:**

1. Plantas de naranjilla de semillas irradiadas (50 Gy) e inoculadas con nematodos.
2. Control A. 10 plantas de semillas no irradiadas sin nematodos
3. Control B. 10 plantas de semillas no irradiadas con inoculación de nematodos.

Incrementos sobre 1 fueron considerados y aceptados estadísticamente.

La respuesta de las plantas a los nematodos fue determinada en base a la eficiencia del hospedero en relación a reproducción de los nematodos (índice). Este índice de incremento de población de nematodos identifica las plantas tolerantes o resistentes. Adicionalmente, la altura de planta en cm (PH), y el peso en gramos del follaje (FFW) fue evaluado

**Cuadro 25.** Respuesta de las plantas a nematodos por [19] con modificación.

Reproducción de nematodos Mas bajo	Rendimiento comparado al control Igual o mas alto
Indice > 1 Susceptible-Tolerante	Susceptible- No tolerante
Indice < 1 Resistente-Tolerante	Resistente- No tolerante

El criterio para evaluar la combinación de estas variables son:

1. RESISTENTE-TOLERANTE Plantas con baja reproducción de nematodos ( $fP / Pi < 1$ ) y mayor o igual rendimiento que el control.
2. RESISTENTE-NO TOLERANTE plantas con baja reproducción de nematodos ( $fP / Pi < 1$ ) y menor rendimiento que el control.
3. SUSCEPTIBLE-TOLERANTE plantas con alta reproducción de nematodos ( $fP / Pi > 1$ ) e igual o mayor rendimiento que el control.
4. SUSCEPTIBLE-NO TOLERANTE plantas con alta reproducción de nematodos ( $fP/Pi > 1$ ) y menor rendimiento que el control.

Después de la evaluación, plantas individuales de naranjilla resistente-tolerante fueron seleccionadas, basadas en el índice de incremento entre 0.0 y 0.5 y PH y FFW valores iguales o mayores que el control A.

Las plantas resistentes fueron propagadas asexualmente (preparando un monto de cortes tanto como fue posible). Los pedazos fueron tratados con hormona de enraizamiento, plantadas en fundas de polietileno con suelo y ubicadas en un invernadero. Estas plantas se usaron para verificar resultados previos (Figura 12).



**Figura 12.** A. Raíces de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam) con nodulaciones de nematodos. B. Plantas de naranjilla creciendo en condiciones de invernadero C. Raíces de naranjilla de una planta resistente a nematodos.

### Experimento en campo

El experimento de campo se condujo en la Estación Experimental Palora (910 msnm, 1° 52´ S y 78° 3´ W).

### Inducción de mutaciones de naranjilla usando explantes *in vitro*.

#### Test de radiosensitividad *in vitro*

El test de radiosensitividad fue desarrollada en la var. Peluda en la Unidad de Mejoramiento de plantas Seibersdorf Austria. Se desarrolló un ensayo preliminar con dosis entre 5, 10, 15, 20, 25 Gy a 30Gy con una dosis de 28.74 Gy/min. Plántulas se ubicaron cajas petri conteniendo papel filtro embebido en agua destilada y tratados con radiación gamma. Inmediatamente después de la radiación, los nudos simples (divisiones de las plántulas) se transfirieron a un medio nuevo en tubos con dos explantes por tubo y 44 explantes por dosis y puestos en un cuarto de cultivo. La evaluación se desarrolló después de 6 semanas.

El cultivo *in vitro* de *Solanum quitoense* var. Baeza irradiada con dosis de 5, 6, 7, 8 y 9 Gy fueron recibidas desde Seibersdorf, Austria. Las plantas habían sido propagadas después de la radiación hasta la generación M1V3. Algunas plantas fueron incluidas como controles.

En Ecuador (La Comisión de Energía Atómica), un test de radiosensitividad (60 Co) con dosis entre 1 Gy a 12 Gy fue conducido con explantes *in vitro*. Las evaluaciones mensuales se llevaron a cabo con las siguientes variables: altura de planta, ausencia o presencia de raíces y número de nodulaciones por planta.

### Evaluación en invernadero

Las plantas *in vitro* se transplantaron a invernadero. A los tres meses del transplante las plantas de naranjilla fueron inoculadas y tres meses después se evaluaron. Las plantas evaluadas como resistentes fueron reintroducidas *in vitro* para su micropropagación. Se usó la escala de Cook, (1974)

### Introducción y micropropagación *in vitro*.

En la EE Santa Catalina, se cultivó *S. quitoense* var. Baeza. Para la desinfección segmentos de tallo se lavaron profusamente con agua corriente, jabón líquido y desinfectante (Povidine); se usó también fungicida Benlate al 1% (v/v). Los residuos de este proceso se eliminaron con agua destilada. El medio de inicio consistió de la formulació MS suplementado con 2 mg/l de pantotenato de calcio, 0.25 mg/l GA<sub>3</sub>, 10 mg/l Putrescina, 20 g/l Sucrosa, 6,5 g/l Agar y 5 g/l de carbón activado. El medio de micropropagación fue el mismo excepto que se omitió el carbón activado.

- **Resultados**

A continuación se resumen datos presentados en una publicación aprobada por la Comisión Internacional de Energía Atómica como parte final de este proyecto (Monteros et al., 2004).

### **Inducción de mutaciones en naranjilla usando semillas.**

#### **Test de radiosensibilidad por semillas.**

Las variedades de *Solanum quitoense* mostraron respuesta similar y no hubo diferencia en la variable altura de plántulas entre dosis de 100 y 250 Gy. La tasa de germinación para Peluda fue 80, 70 y 60% y para Baeza 60, 70, 80% para el control, 100 Gy y 250 Gy, respectivamente.

La germinación demoró una semana más en las semillas tratadas que en el control. Las dosis de 500 Gy y superiores inhibieron completamente la germinación. Se recomendó realizar un test de sensibilidad de 50 a 450 Gy e incluyendo un mayor número de semillas por tratamiento.

Un experimento en mutaciones conducidas en INIAP, incluyendo radiaciones de <sup>60</sup>Co entre 50 Gy y 600 Gy, a intervalos de 50 Gy. La intensidad optima fue 50 Gy. Entonces, 2000 semillas de Baeza fueron irradiadas con 50 Gy.

#### **Evaluación en invernadero.**

Bajo el procedimiento descrito arriba 1500 semillas mutadas germinaron y estuvieron listas para trasplante. Las plantas se establecieron en condiciones de invernadero siguiendo procedimientos aséptico.

El Cuadro 26 muestra datos de los experimentos preliminares conducidos con cinco plantas de semillas irradiadas y cinco controles, previo a la evaluación completa. Las plantas control (no irradiadas) mostraron un incremento de nematodos en condiciones de invernadero en un rango de 3,6 a 33,6 veces con un promedio de 10.9. Este índice de incremento es normal en condiciones de invernadero y la variabilidad se debe a otras causas del manejo del experimento. Por otro lado las semillas irradiadas mostraron diferente incremento de nematodos; por ejemplo la planta 3 presento un valor (I) de 0,06 ( $I=fP/iP=324/5000 = 0.06$ ).

Entonces esta planta puede ser considerada resistente (una vez que la población inicial decreció). Adicionalmente, valores de altura de planta (PH) y peso fresco del follaje (FFW) de la planta No 3 (38 cm y 104 g) son más altas que las del control (30 cm y 71 g), entonces se estableció la tolerancia de las plantas a nematodos.

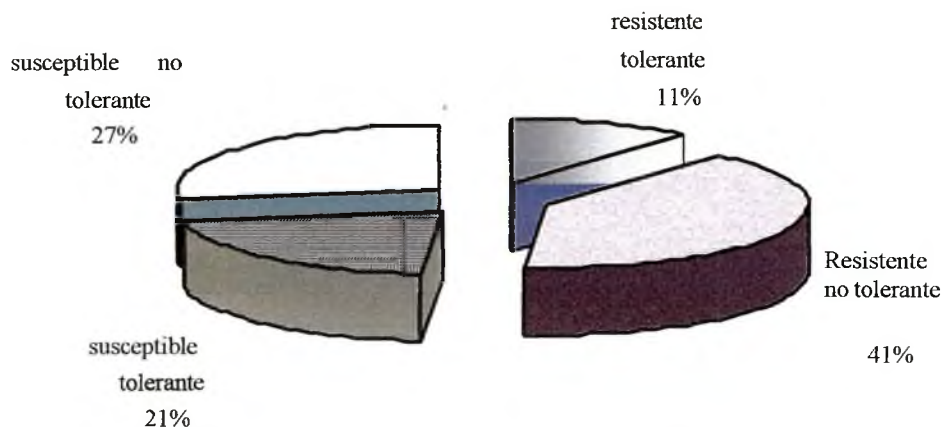
Basado en estos resultados, 1420 plantas de las 1500 se evaluaron siguiendo la misma metodología (datos no incluidos). Entonces, 162 plantas (11.4 %) presentaron resistencia-tolerancia a nematodos, 566 plantas (39.8 %) fueron resistentes-no tolerantes, 302 plantas (21.3 %) fueron susceptibles-tolerantes, y 390 plantas (27.5 %) fueron susceptibles-no tolerantes (Figure 13).

De las 162 plantas resistentes-tolerantes, 125 fueron seleccionadas porque presentaron valores de 0.0 a 0.5 (índice de incremento) para la reproducción de nematodos y valores superiores de PH y FFW que el control 1. Adicionalmente, las plantas irradiadas presentaron una altura de planta promedio de 12 cm, con 4.7 hojas por planta y un tamaño de hoja de 12,99 cm largo por 11,78 cm ancho; mientras que las plantas control fueron 10.83 cm alto y tenían 4.4 hojas y tamaño de hoja de 11.37 cm largo por 10.23 cm ancho.

**Cuadro 26.** Datos de altura de planta (PL), peso fresco del follaje (WFF), población inicial (ip), población final (fp), incremento de la población (I) y respuesta al ataque de nematodos en plantas irradiadas y no irradiadas.

Tratamiento	PH (cm)	FFW (g)	Ip (huevos/maceta)	FP (huevos/maceta)	I	Resultado
Control No.						
1	36	70	5000	35264	7.1	
2	31	83	5000	168150	33.6	
3	27	75	5000	17840	3.6	
4	26	36	5000	30720	6.1	
5	30	90	5000	41800	4.2	
Promedio	30	71			10.9	
Irradiated No.						
1	43	219	5000	8308	1.6	S
2	40	109	5000	48816	9.7	S
3	38	104	5000	324	0.06	R
4	35	154	5000	8190	1.6	S
5	40	251	5000	10560	2.1	S

Las plantas seleccionadas presentaron características fenotípicas características de la variedad Baeza (altura de planta de 140 cm en plantas adultas), pigmentos antocianicos en flores, brotes y venas de la hoja. En las hojas no encontramos espinas pero si vellocidades presentes en las hojas, brotes, frutos y tallos jóvenes. Sin embargo, algunas plantas mostraron diferentes características que la variedad 8% mostraron hojas curvadas, 1% presenta espinas atípicas y 1.4% hojas moradas y 0.1% tallos fasciados.



**Figura 12.** Resultados de la evaluación de la resistencia a nemátodos de 1500 plantas de *Solanum quitoense* M1P provenientes de semillas irradiadas.

### Evaluación de campo

Las plantas resistentes seleccionadas del invernadero se propagaron vegetativamente y se obtuvieron 576 plantas. El objetivo de este experimento fue multiplicar semillas para caracterizaciones y evaluaciones futuras para resistencia a nematodos. Al principio, 98% de las plantas se adaptaron a las condiciones ambientales. Sin embargo, al final del experimento solo el 6% de plantas sobrevivieron. Frutos fueron colectados de 35 plantas resistentes y se extrajeron semillas que fueron procesadas y almacenadas a (-15 °C).

Estos materiales se perdieron debido a severos ataques de *Fusarium oxysporum* y marchitamiento de las raíces (*Pseudomonas solanacearum*). En ambos casos, los primeros síntomas aparecieron después del período de florecimiento, donde pudrición y marchitamiento fueron observados, seguidos de caídas de flores y frutos y finalmente la muerte de las



plantas. En el caso de ataque de *Fusarium oxysporum*, los síntomas incluyeron manchas negras localizadas en las nervaduras de las plantas. Los síntomas relacionadas a *Pseudomonas solanacearum* se observaron como marchitez en el sistema radicular.

Se registraron características agronómicas para el material resistente: número de flores por inflorescencia (18), días a la floración (108), días a la cosecha (235), peso del fruto (78g) y pulpa de color verde. Los valores promedios incluyen datos de las 35 plantas que produjeron frutos maduros que fueron morfológicamente similares a Baeza. Los materiales tienen los siguientes códigos: 1255, 1201, 1087, 1008, 920, 756, 740, 662, 634, 626, 598, 545, 525, 479, 470, 460, 459, 457, 403, 401, 399, 373, 340, 303, 295, 277, 265, 248, 165 (1), 165 (2), 148, 70 (1), 56, 39 (1), 37 (1).

### Inducción de mutaciones de naranjilla usando explantes *in vitro*.

#### Evaluación en invernadero

Setenta plantas desde *in vitro* (Vegetativa 4) enviadas desde Viena, fueron evaluadas: 33 plantas (5GyV4), 24 plantas (7GyV4), 2 plantas (8GyV4) y 13 plantas (9GyV4). Trece plantas irradiadas a 5Gy fueron evaluadas como resistentes. Ninguno de ellos presentó resistencia a nemátodos (datos no incluidos), 94,6% fueron susceptibles no-tolerantes y 5,5% susceptibles tolerantes.

De la evaluación de materiales *in vitro* con dosis entre 1 Gy y 12 Gy, se determinó que la dosis 5Gy y 7Gy fueron óptimas.

Se condujo la multiplicación *in vitro* de 1000 plantas de naranjilla para la generación vegetativa 4 (V4) (5Gy dosis). Entonces, se evaluaron en invernadero obteniendo 13 plantas resistentes (Cuadro 27). Son necesarias la multiplicación *in vitro*. El Cuadro 28, incluye datos de plantas usadas como control.

**Cuadro 27.** Plantas resistentes a nemátodos de *Solanum quitoense* desde *in vitro* (Vegetativa 4) después de la evaluación de 1000 plantas en invernadero (dosis 5Gy).

Código	PH (cm)	FFW (g)	IP (huevos/planta)	FP (huevos/planta)	I	Reacción
5GyV4*** Ba 13	31	250	10000	5821.2	0.58	RT*
5GyV4Ba 084	23	50	10000	9762.0	0.98	RS**
5GyV4Ba 126	33	250	10000	1826.0	0.18	RT
5GyV4Ba 163	28	120	10000	7404.0	0.74	RS
5GyV4Ba 165	26	160	10000	5860.5	0.59	RS
5GyV4Ba 206	62	700	10000	7855.6	0.79	RT
5GyV4Ba 248	54	750	10000	182.8	0.02	RT
5GyV4Ba 264	41	300	10000	7161.0	0.72	RT
5GyV4Ba 316	68	950	10000	5203.2	0.52	RT
5GyV4Ba 431	40	300	10000	7030.8	0.70	RT
5GyV4Ba 634	73	500	10000	1147.7	0.11	RT
5GyV4Ba 851	33	180	10000	551.68	0.06	RT
5GyV4Ba 852	50	500	10000.0	395.04	0.04	RT

\*RT= Resistant-tolerant; \*\*RS= Resistant-susceptible; \*\*\*= Vegetative 4

Otras 1000 plantas (7Gy) se han multiplicado usando cultivo de tejidos y actualmente se están evaluando en invernadero.

**Cuadro 28.** Datos de plantas de naranjilla usadas como control para el experimento de resistencia a nematodos.

<b>Plantas</b>	<b>PH (cm)</b>	<b>FFW (g)</b>	<b>IP (huevos/planta)</b>	<b>FP (huevos/planta)</b>	<b>I</b>
Control 2	27	250	10000	16422	1.64
Control 2	50	150	10000	24829	2.48
Control 2	53	146	10000	58057	5.81
Control 2	24	91	10000	216770	21.6
Control 2	43	169	10000	207360	20.74
	<b>39.4</b>	<b>161.2</b>	<b>10000</b>	<b>104687.6</b>	<b>10.45</b>

- **Conclusiones y recomendaciones**

La evaluación de semillas mutadas de naranjilla en la generación M1 en la Estación Experimental Santa Catalina fue un error técnico. Sin embargo, la resistencia a nemátodos fue ya observada a esta generación que debía ser solo de multiplicación. Factores tales como el alto número de semillas necesarias, el gran espacio requerido para una evaluación adecuada en campo, adicionado al ciclo de vida de la naranjilla (8 meses) hacen que la evaluación de materiales resistentes a través del uso de semillas sea difícil de llevarlo a la práctica. Como consecuencia, se consideró necesario continuar el estudio utilizando plantas de naranjilla mutadas y reproducidas con técnicas *in vitro*.

Se obtuvo importantes materiales de naranjilla resistentes a nematodos provenientes de la dosis 5Gy en la generación vegetativa 4 (V4), que están siendo multiplicadas *in vitro*. Estamos esperando los resultados de la evaluación en invernadero de otras 1000 plantas de la otra óptima dosis (7Gy V4) para continuar su evaluación en el campo. La evaluación en campo es importante para evaluar los materiales resistentes que solventen los problemas técnicos y ambientales que los agricultores del centro de producción experimentan en sus fincas.

- **Reconocimientos**

El DENAREF deja constancia de su agradecimiento a la Agencia Internacional de Energía Atómica (AIEA/FAO) y a la Agencia Ecuatoriana de Energía Atómica por el apoyo financiero y técnico de este proyecto. A la Granja Experimental Palora y al Departamento de Protección Vegetal de la E.E. Santa Catalina, por la excelente coordinación en las actividades.