



**Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones  
Agropecuarias**

**Fecha de Presentación:** Septiembre 2011

**Estación Experimental:** Santa Catalina

**Programa/Departamento:** Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos

**Proyecto:** Código: Fortalecimiento 2100527014  
Fortalecimiento Leguminosas

**Título:** “Inducción de mutaciones utilizando rayos gamma en la variedad mejorada de arveja (*Pisum sativum* L.) INIAP 436 Liliana, para identificar genotipos resistentes a *Ascochyta* spp.”

**Ubicación 1:** Provincia: Pichincha  
Cantón: Mejía  
Parroquia: Cutuglagua

**Ubicación 2:** Provincia: Cotopaxi  
Cantón: Latacunga  
Parroquia: Matriz

**Autor:** Pablo Alejandro Álvarez Erazo

**Colaboradores:** Ing. Eduardo Peralta I. (PRONALEG-GA, INIAP)  
Ing. Ángel Murillo I. (PRONALEG-GA, INIAP)  
Ing. Álvaro Yépez (Director, Docente IASA-ESPE)  
Ing. Abraham Oleas (Codirector, Docente IASA-ESPE)

**Fecha de Inicio:** Octubre 2011

**Fecha de Terminación:** Septiembre 2012

**Presupuesto:** \$3734,33

**Fuentes de Financiamiento:** INIAP 50%  
Tesista 50%

## Contenido

### 1. Antecedentes

Dentro de las leguminosas de grano cultivadas en Ecuador, el cultivo de arveja ocupa el tercer lugar en cuanto a superficie sembrada y nivel de producción, después del fréjol y el haba. Se cultiva principalmente en las provincias de Tungurahua, Bolívar, Imbabura, Chimborazo, Carchi, Loja y Cotopaxi. En el año 2009 se cosecharon 3342 ha de grano seco de arveja con una producción de 944 Tm. En cuanto a la superficie cosechada de arveja tierna en vaina, ésta fue de 5793 ha con una producción de 8522 Tm (INEC, 2010). Es un producto de amplio consumo en todos los estratos sociales de la población (Caicedo y Peralta, 1999). Tiene un contenido de proteína que varía entre el 22 al 26% en grano seco, lo cual la convierte en un importante componente de la nutrición de los ecuatorianos (Peralta *et al.*, 2010a).

Este cultivo es afectado severamente por tres especies de hongos pertenecientes al llamado "Complejo *Ascochyta*". Estas especies son *Ascochyta pisi*, *Mycosphaerella pinodes* (Forma anamorfa: *Ascochyta pinodes*) y *Phoma medicaginis* var. *pinodella*. Ocasionan lesiones en hojas, tallos y vainas, pudiendo éstas extenderse hasta la región del cuello de la planta (Skoglund *et al.*, 2011). De acuerdo a Hagedorn (1984), *M. pinodes* puede ocasionar una reducción del 50 al 75% de la producción de un campo de arveja si la infección es de grado moderado a fuerte. En Ecuador, de acuerdo al Programa de Leguminosas y Granos Andinos (PRONALEG-GA) del INIAP, con variedades susceptibles y condiciones ambientales favorables para este complejo de hongos, las pérdidas pueden ser alrededor del 80%<sup>1</sup>.

Las estrategias de control para esta enfermedad son la rotación de cultivos, destrucción de rastrojos infectados de la anterior cosecha y tratamiento químico de las semillas antes de la siembra, lo cual reduce la cantidad de inóculo primario. Durante el cultivo se realizan aplicaciones foliares de fungicidas, las cuales controlan en forma efectiva estos organismos. Sin embargo, los costos asociados a estas aplicaciones pueden reducir significativamente la rentabilidad de este cultivo. La mejor estrategia a largo plazo para un control efectivo es el desarrollo de variedades de arveja resistentes a *Ascochyta* spp. Sin embargo existen pocas fuentes de resistencia a esta enfermedad dentro del germoplasma de arveja analizado a nivel mundial. Especies silvestres estrechamente relacionadas a *P. sativum* poseen fuentes de resistencia, pero lamentablemente no están disponibles en nuestro medio (Bretag *et al.*, 2006).

A nivel local, en el año 2010, el PRONALEG-GA evaluó la reacción a *Ascochyta* spp. de 250 accesiones del banco de germoplasma de arveja. Todas fueron susceptibles, es decir, no se identificó fuentes de resistencia genética (INIAP, 2010). Una alternativa para generar fuentes de resistencia es la inducción de mutaciones. Esta ha sido una técnica largamente desarrollada a nivel mundial y cuya aplicación ha permitido la liberación de más de 3000 cultivares mejorados de 170 especies cultivadas (Burkart, 2009). Cabe mencionar que existen 34 variedades de arveja registradas en la Base de Datos de Variedades Mutantes (MVD) de la FAO/IAEA, las cuales presentan mejores características agronómicas que sus variedades parentales (FAO/IAEA, 2011). Para inducir mutaciones se emplean agentes mutágenos, los cuales se pueden clasificar en físicos y químicos. A la primera categoría pertenecen las radiaciones ionizantes, como los rayos gamma. En la segunda se tienen sustancias como la azida sódica y los agentes alquilantes, que tienen la propiedad de aumentar varios cientos de veces las tasas de mutación espontánea (Prina *et al.*, 2010)

<sup>1</sup>Murillo, A. 2011. Cultivo de la Arveja en el Ecuador. (Comunicación personal). PRONALEG-GA. INIAP. Estación Experimental Santa Catalina. Quito-Ecuador.

Entre las variedades de arveja registradas en la MVD, se debe mencionar la búlgara "Sredetz", obtenida a partir de líneas mutantes provenientes del cultivar "Kubrat-3". Las semillas de este cultivar recibieron un tratamiento combinado de rayos gamma y metanosulfonato de etilo (EMS) a dosis que fluctuaron entre los 2,5 a 100 Gy en el caso de los rayos gamma; y entre los 0,1 y 0,05% de concentración con respecto al EMS. Este cultivar presentó una buena resistencia a *Ascochyta pisi* (Mehandjiev *et al.*, 1999; Tomlekova, 2010). En Ecuador se han llevado a cabo trabajos de inducción de mutaciones en naranjilla (*Solanum quitoense*) para generar resistencia a nematodos (Tapia y Zambrano, 2004), y papa (*Solanum spp.*) para obtención de resistencia a *Phytophthora infestans*, (Villavicencio y Benitez, 2008; Lopez y Yáñez, 2011).

La información concerniente al número de genes involucrados en la expresión de la resistencia al "Complejo *Ascochyta*" y la forma en la que éstos se heredan no está claramente dilucidada. Algunos autores sugieren que la resistencia a *A. pisi* está determinada por un gen simple dominante mientras otros mencionan que involucra tres genes denominados Rap-1, Rap-3 y Rap-4. Así mismo se sugiere que la resistencia a *M. pinodes* es heredada en forma de carácter cuantitativo y está gobernada por una serie de genes simples dominantes (Bretag *et al.*, 2006). Timmerman-Vaughan, *et al.* (2002) encontraron trece loci de carácter cuantitativo (QTL's-Quantitative trait loci) para resistencia al "Complejo *Ascochyta*" en arveja.

Para la inducción de mutaciones, irradiando semillas de arveja con rayos gamma, el rango de dosis recomendadas está entre los 100 a 150 Gy (Jaranowski y Micke, 1985; Maluszynski *et al.*, 2009; OIEA, 2001). Sin embargo, la respuesta de cada material ante la acción de un agente mutágeno difiere incluso entre distintos cultivares de una misma especie. Es por esto que se debe llevar a cabo una prueba preliminar para determinar la severidad de los efectos somáticos que se presentan en el material tratado, o  $M_1$ , y en base a esta información determinar aquella dosis que permita obtener la mayor cantidad de sectores mutantes sin comprometer la viabilidad del material. A esta dosis se la conoce como crítica u óptima (Maluszynski *et al.*, 2009).

Según el Foro de Cooperación Nuclear en Asia (FNCA por sus siglas en inglés) (2004), los efectos de la radiación deben ser medidos inicialmente en la "Dinámica de Germinación", "Porcentaje de Sobrevivencia", "Altura de Plántulas" y "Longitud de Raíces". La dosis que produzca una reducción de hasta el 30% en los valores de estas variables, se considera como apropiada para un programa de mejoramiento mediante inducción de mutaciones. En cuanto al número de semillas a ser tratadas, Maluszynski *et al.* (2009) recomiendan emplear de 5000 a 10000 semillas  $M_1$  que permitan formar una población  $M_2$  de al menos 50000 plantas. También sugieren el empleo de una variedad ya liberada en la cual el mejoramiento de una o dos características incremente su valor agronómico.

La variedad de arveja INIAP 436 Liliana, de tipo decumbente, posee buenas características agronómicas, tales como: ciclo medianamente precoz, buen vigor y carga, grano de tamaño grande con buena demanda en el mercado y aptitud para elaboración de harina (Peralta *et al.*, 2010b). Sin embargo, es afectada severamente por los hongos del "Complejo *Ascochyta*".

## 2. Justificación

Dado que no existen fuentes de resistencia genética al ataque de los hongos del "Complejo *Ascochyta*" en el Banco de Germoplasma de arveja del INIAP, y que tal característica tampoco ha sido hallada en germoplasma foráneo, la inducción de mutaciones es una alternativa viable y fácilmente disponible para generar variabilidad genética dentro de la cual se pueda seleccionar genotipos resistentes a esta enfermedad.

### 3. Objetivos

#### 3.1. General

- Inducir mutaciones, usando rayos gamma, en la variedad INIAP 436 Liliana, para identificar genotipos resistentes a *Ascochyta* spp.

#### 3.2. Específicos

- Establecer la dosis óptima de rayos gamma para inducir mutaciones en la variedad INIAP 436 Liliana.
- Determinar en el campo los efectos somáticos que se presenten en la población  $M_1$ .
- Determinar la frecuencia de mutaciones en la población  $M_2$ .
- Evaluar la reacción de la población  $M_2$  de arveja a hongos del "Complejo *Ascochyta*".

### 4. Hipótesis

$H_0$ : La irradiación de semillas de arveja con rayos gamma no permite inducir mutaciones para resistencia a *Ascochyta* spp.

### 5. Materiales y Métodos

#### 5.1. Materiales

##### a. Dosimetría

Semillas de arveja de la variedad INIAP 436 Liliana.

Papel para germinación de semillas

Bandejas de germinación

##### b. Generación $M_1$

Semillas de arveja de la variedad INIAP 436 Liliana.

##### c. Generación $M_2$

Semillas de arveja provenientes de las plantas  $M_1$ .

Fuente de inóculo de *Ascochyta* spp.

#### 5.2. Metodología

La presente investigación constará de tres etapas. En la primera se realizarán las pruebas de dosimetría, bajo invernadero, con el fin de determinar la dosis óptima de radiación para llevar a cabo la inducción de mutaciones. La dosis óptima se refiere a aquella que produzca una reducción de hasta el 30% en las variables medidas en estas pruebas, las cuales serán: "Dinámica de Germinación", "Porcentaje de Supervivencia", "Altura de Plántulas" y "Longitud de Raíces". En la segunda etapa se irradiarán una gran cantidad de semillas con la dosis óptima determinada. Estas semillas, que constituirán la generación  $M_1$ , se sembrarán en el campo. Una vez que esta generación culmine su ciclo vegetativo y produzca semillas, estas se cosecharán y constituirán la generación  $M_2$ , cuyo desarrollo en el campo constituirá la tercera etapa. Cuando esta generación llegue a etapa de pre-floración, será inoculada con *Ascochyta* spp. y se evaluará la reacción de las plantas ante el hongo para identificar los genotipos resistentes.

### 5.2.1. Características del sitio experimental

La irradiación de las semillas se realizará en las instalaciones de la Subsecretaría de Control, Investigación y Aplicaciones Nucleares, del Ministerio de Electricidad y Energía Renovable; las mismas que están ubicadas en la localidad Aychapicho del cantón Mejía, Provincia de Pichincha.

Las pruebas de dosimetría se llevarán a cabo en los invernaderos de la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del INIAP, localizada en la parroquia Cutuglagua, cantón Mejía, Provincia de Pichincha. Está ubicada a una altitud de 3057 m; temperatura promedio de 11.6°C; con una precipitación promedio anual de 1500 mm y una humedad relativa de 79% (INIAP, 2008).

Las generaciones  $M_1$  y  $M_2$  se sembrarán en el campo en el Instituto Agropecuario Simón Rodríguez ubicado en el cantón Latacunga, Provincia de Cotopaxi a una altitud de 2850 m. Las condiciones climáticas de esta localidad de acuerdo a los Anuarios del Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI) son las siguientes: temperatura promedio: 14°C; precipitación promedio anual: 500 mm y humedad relativa del 70%.

### 5.2.2. Factores en estudio

#### a. Dosimetría

Se utilizarán dosis de 0, 50, 100, 150 y 200 Gy de rayos gamma las cuales se aplicarán a semillas de arveja de la variedad INIAP 436 Liliana (Anexo 1). El intervalo seleccionado es igualmente espaciado con la finalidad de encontrar un coeficiente y una ecuación de regresión que permita establecer de manera precisa la dosis óptima.

#### b. Generación $M_1$

En esta generación los factores en estudio serán: la población testigo y la población irradiada a la dosis óptima.

#### c. Generación $M_2$

En esta generación los factores en estudio serán: la población testigo y la población irradiada a la dosis óptima (estas poblaciones estarán conformadas por la descendencia de las plantas de las dos poblaciones de la generación  $M_1$ )

### 5.2.3. Tratamientos

#### a. Dosimetría

Cuadro 1. Tratamientos en la etapa de Dosimetría

Tratamientos	Dosis (Gy)
T1	0
T2	50
T3	100
T4	150
T5	200

#### b. Generación $M_1$

En esta generación los tratamientos estarán constituidos por:

Población testigo (dosis 0 Gy)

Población dosis óptima.

### c. Generación M<sub>2</sub>

En esta generación los tratamientos estarán constituidos por las poblaciones descendientes de la Generación M<sub>1</sub>. Se tendrá una población testigo y una población dosis óptima.

#### 5.2.4. Unidad experimental

##### a. Dosimetría

Cuadro 2. Descripción de la unidad experimental en la etapa Dosimetría

Unidad Experimental	150 semillas
Número de tratamientos	5
Número de repeticiones	3
Número de unidades experimentales	15
Número total de semillas	2250 (0,75 kg)

De las 150 semillas de arveja tratadas con una dosis determinada, 50 semillas se destinarán para cada una de las siguientes pruebas.

- 1) "Dinámica de germinación"
- 2) "Porcentaje de supervivencia"
- 3) "Altura de plántula y longitud de raíces"

##### b. Generación M<sub>1</sub>

En esta generación se tendrán dos poblaciones, por lo tanto, dos unidades experimentales. La población testigo estará conformada por 1500 plantas y la población dosis óptima por 15000 plantas.

Cuadro 3. Características del área del experimento en la generación M<sub>1</sub>

Área total del experimento	3300 m <sup>2</sup>
Dimensiones del área del experimento	75 m x 44 m
Número total de hileras	55
Número de plantas por hilera	300
Longitud de hileras	75 m
Separación entre hileras	0,8 m
Separación entre plantas	0,2 m
Número de hileras de la población testigo	5
Número de hileras de la población dosis óptima	50

La distribución de las hileras de la población testigo entre las hileras de la población dosis óptima será uniforme (Anexo 2). Dentro de cada hilera, cada diez plantas, se tendrá un espacio de 0,5 m sin plantas, el cual servirá para observar rápidamente los cambios fenotípicos en las plantas de ambas poblaciones.

##### c. Generación M<sub>2</sub>

En esta generación se tendrán dos unidades experimentales conformadas por las poblaciones descendientes de aquellas estudiadas en la primera generación: población testigo y población dosis óptima. Dado que se sembrarán las semillas provenientes de la

primera vaina del tallo principal de cada planta, la población testigo estará conformada por 7500 plantas y la población dosis óptima por 50000 plantas.

Cuadro 4. Características del área del experimento en la generación M<sub>2</sub>

Área total del experimento	11475 m <sup>2</sup>
Dimensiones del área del experimento	153 m x 75 m
Número total de hileras	192
Número de plantas por hilera	300
Longitud de hileras	75 m
Separación entre hileras	0,8 m
Separación entre plantas	0,2 m
Número de hileras de la población testigo	25
Número de hileras de la población dosis óptima	167

Se ubicarán dos hileras de plantas testigo en los bordes del área experimental. A partir de la primera hilera, cada siete hileras de plantas de la población dosis óptima, se ubicará una hilera de la población testigo (Anexo 3).

### 5.2.5 Diseño Experimental

#### a. Dosimetría

Diseño completamente al azar con cinco tratamientos y tres repeticiones en las tres pruebas a realizarse.

#### b. Generación M<sub>1</sub>

No se empleará diseño experimental

#### c. Generación M<sub>2</sub>

No se empleará diseño experimental

### 5.2.6 Análisis Estadístico

#### a. Dosimetría

Se determinará el coeficiente y la ecuación de regresión entre las dosis de radiación y los efectos de las mismas en las variables evaluadas en las pruebas de dosimetría con el fin de establecer la dosis óptima de radiación en la curva de regresión.

#### b. Generación M<sub>1</sub>

Se elaborará un cuadro de promedios para las variables a evaluarse en la población testigo y la población dosis óptima

#### c. Generación M<sub>2</sub>

Se elaborará un cuadro de promedios para las variables a evaluarse en la población testigo y la población dosis óptima

### **5.2.7. Variables y método de evaluación**

#### **a. Dosimetría**

Según el FNCA (2004), para determinar la dosis óptima de radiación para inducir mutaciones en las semillas de leguminosas, se deben realizar, bajo invernadero, las siguientes pruebas:

##### **Dinámica de germinación**

En esta prueba se tomarán las 50 semillas de arveja y se las colocará sobre papel de germinación humedecido. Se las cubrirá con otro papel, también húmedo. Se contabilizará el número de plántulas que germinen en cada unidad experimental. De acuerdo a Garófalo (2011) para considerar que una semilla ha germinado, tanto la parte aérea como la raíz deberán presentar un desarrollo inicial. El monitoreo se llevará a cabo cada dos días hasta los diez días<sup>2</sup>.

##### **Porcentaje de supervivencia**

En esta prueba se sembrarán las 50 semillas de arveja en un sustrato estéril colocado en bandejas. Las semillas se sembrarán a un cm de profundidad. El riego del sustrato será realizado con agua destilada cuando se observe disminución en la humedad del mismo. A los 30 días se registrará el número de plántulas que aún continúen su desarrollo<sup>2</sup>.

##### **Longitud de parte aérea**

En esta prueba las 50 semillas de arveja se desarrollarán en papel de germinación humedecido. A los 30 días se realizarán las mediciones, en centímetros, de la altura de las plántulas<sup>2</sup>.

##### **Longitud de raíces**

Para evaluar esta variable se realizará la medición, en centímetros, de la raíz principal de cada plántula en el momento que se lleve a cabo la medición de la parte aérea<sup>2</sup>.

#### **b. Generación M<sub>1</sub>**

Una vez determinada la dosis óptima que produzca una reducción de hasta el 30% en las variables medidas en las pruebas de dosimetría, una cantidad de 15000 semillas serán irradiadas a esta dosis, con lo cual se generará la población dosis óptima. Además, 1500 semillas no tratadas se sembrarán para constituir la población Testigo. En éstas se evaluarán las siguientes variables:

##### **Porcentaje de emergencia**

Una vez transcurridos 15 días después de la siembra, se procederá a contar el número de plantas emergidas en las poblaciones testigo y dosis óptima<sup>2</sup>.

##### **Porcentaje de plantas sobrevivientes hasta la madurez-letalidad**

Esta variable se medirá una vez que las plantas hayan alcanzado su madurez. Para esto se contabilizará el número de plantas en cada población que llegan a producir semillas y son capaces de pasar a la siguiente generación (Prina, 1989).

---

<sup>2</sup> Garófalo, J. 2011. Dosimetría. (Comunicación personal). Programa de Cereales. INIAP. Estación Experimental Santa Catalina. Quito-Ecuador.

### Porcentaje de plantas con sectores somáticos mutantes (quimeras)

Para medir esta variable se contabilizará el número de plantas que a nivel del cuarto, quinto y sexto foliolo presenten manchas irregulares de color más claro que el tejido circundante, es decir, que presentan sectores somáticos mutantes en cuanto al carácter "cantidad de clorofila producida" (Prina, 1989).

### c. Generación M<sub>2</sub>

#### Frecuencias de mutaciones clorofilicas de cada población.

Para esto se debe contabilizar, en cada población, el número de plantas mutantes clorofilicas M<sub>2</sub> de 15 días de edad que entran en las categorías albina (blanca, sin clorofila), xantha (amarilla, sin clorofila pero con carotenoides) y viridis (verde claro, menor contenido de clorofila). Con esta información se aplica la siguiente fórmula (Maluszynski *et al.*, 2009):

$$M = \frac{(\text{número de plantulas mutantes (albina + xantha + viridis)} \times 100)}{N}$$

En donde:

M = frecuencia de mutación como porcentaje.

N = número de todas las plántulas M<sub>2</sub> analizadas para una dosis particular.

#### Identificación de plantas resistentes a *Ascochyta* spp.

Las plantas M<sub>2</sub> serán inoculadas con el hongo *Ascochyta* spp. en estado de pre-floración, y una vez transcurridos 15 días, se realizará la evaluación de la reacción ante el ataque del patógeno. Para esto se utilizará la escala empleada por Timmerman-Vaughan *et al.* (2002) para medir la severidad del ataque de los hongos del "Complejo *Ascochyta*" en hojas, tallos y vainas. Esta escala tiene valores desde 1 a 10 (cuadro 5).

Cuadro 5. Escala para medir la severidad del daño causado por *Ascochyta* spp.

Valor	Tallos	Hojas	Vainas
1	Ninguna lesión	Ninguna lesión	Ninguna lesión
2	Manchas pequeñas		Pocas lesiones puntuales
3		Lesiones en hojas hasta ¼ de la altura de la planta	
4	Pocas lesiones grandes		Muchas lesiones puntuales
5		Lesiones hasta la mitad de la altura de la planta con varias áreas enfermas.	
6	Muchas lesiones grandes		Muchas lesiones puntuales junto con pocas lesiones unidas y hundidas
7		Lesiones hasta las ¾ partes de la altura de la planta con varias áreas enfermas	
8	Tallo rodeado por lesiones		Amplias lesiones hundidas
9			
10	Planta muerta	Lesiones hasta el tope de la planta con severa apariencia de enfermedad	Vainas ennegrecidas en su totalidad.

Fuente: (Timmerman-Vaughan *et al.*, 2002)

En esta investigación se considerarán como resistentes y útiles a las plantas M<sub>2</sub> que presenten reacciones hasta el valor de 3 dentro de la escala propuesta.

### Efectividad y eficiencia mutagénica de las distintas dosis de radiación aplicadas.

De acuerdo a Konzak *et al.* citados por Dhulgande *et al.* (2011) la efectividad de un mutágeno es una medida de la frecuencia de mutaciones inducidas por unidad de agente utilizado. La fórmula sugerida por Konzak *et al.* y citada por Wani (2009) es la siguiente:

$$\text{Efectividad (agente físico)} = \frac{\text{Frecuencia de mutación}}{\text{Dosis del mutágeno (Gy)}}$$

La eficiencia provee la proporción de mutaciones en relación con otros efectos biológicos no deseados asociados tales como letalidad, esterilidad del polen y aberraciones cromosómicas. Su fórmula es la siguiente (Konzak *et al.* citados por Dhulgande *et al.* 2011 y por Wani 2009):

$$\text{Eficiencia} = \frac{\text{Frecuencia de mutación}}{\% \text{ de plantas que no llegan a producir semilla (letalidad)}}$$

### 5.2.8. Manejo específico del experimento

#### a. Dosimetría

Las 2250 (0,75 kg) semillas de la variedad INIAP 436 Liliana se dividirán en 5 grupos de 450 semillas (150g), las cuales constituyen las tres repeticiones de cada tratamiento. Las semillas deberán estar con un contenido de humedad del 15% (Maluszynski *et al.*, 2009). Se empacarán en fundas de papel y se rotulará en estas las dosis que recibirán las semillas. Una vez irradiadas en las instalaciones ya mencionadas, se realizarán las pruebas de dosimetría, bajo invernadero en la EESC, y se medirán las variables ya descritas. Con esta información se determinará la dosis óptima.

#### b. Generación M<sub>1</sub>

En las dos poblaciones se realizará el manejo agronómico recomendado por Peralta *et al.* (2010) para el cultivo de arveja. Se efectuará un análisis de suelo para saber los requerimientos específicos de fertilizantes para el cultivo. El control de malezas y el aporque se llevará a cabo entre los 45 y 60 días. Será manual porque el uso de herbicidas pueden influenciar el crecimiento y desarrollo de las plantas tratadas, y algunos de los componentes activos de estos agroquímicos a menudo tienen propiedades mutagénicas (Maluszynski *et al.* 2009).

La aplicación de pesticidas se lo realizará una vez comprobada la presencia de la plaga y cuando esta se encuentre en niveles que pueda causar daño severo. Para el control de trozadores (*Agrotis* sp.) se utilizará el producto KSI (orgánico a base de ácidos láurico, palmítico y esteárico) en dosis de 800 cm<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> o Decis (Deltametrina) en dosis de 40 g ha<sup>-1</sup>. Para áfidos (*Macrosiphum pisi*) o barrenador del tallo (*Melanogromyza* sp.), se debe usar Clorpirifos (Lorsban) a una dosis de 400 cm<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>.

En cuanto a enfermedades, para el control del ataque por parte del "Complejo *Ascochyta*" se aplicará Anvil (Hexoconazol) en una dosis de 200 cm<sup>3</sup> en 200 l de agua inmediatamente después de la aparición de la mancha anillada. Para Antracnosis (*Colletotrichum pisi*) se empleará Bavistin (Carbendazín) en una dosis de 200 cm<sup>3</sup> en 200 l de agua cuando se presente la infección en el 10% de las plantas. Para controlar *Alternaria* (*Alternaria* spp.) se usará Daconil (Clorotalonil) a una dosis de 250 cm<sup>3</sup> en 200 l de agua cuando se observen las manchas características en las plantas. Para combatir Oidio (*Erysiphe polygoni*) se utilizará Elosal (Azufre) en una dosis de 1000 g en 200 l de agua, una vez que la cenicienta esté presente en tallos y hojas.

La cosecha se iniciará cuando las plantas presenten secamiento de las vainas. Para la conformación de la  $M_2$  se utilizarán las semillas producidas por la primera vaina del tallo principal aplicando el manejo sugerido por Prina (1989).

### c. Generación $M_2$

Las semillas seleccionadas producidas por la  $M_1$  constituirán la generación  $M_2$ . Serán sembradas en el mismo terreno donde se desarrolló la  $M_1$ . El manejo agronómico será similar al de la generación precedente, con la diferencia de que no se aplicarán fungicidas. La inoculación con el hongo *Ascochyta* spp. se la realizará en estado de pre-floración, dado que la planta incrementa su susceptibilidad al hongo conforme alcanza la madurez (Hagedorn, 1984). Con respecto a esto, Knott, citado por Timmerman-Vaughan *et al.* (2002), afirma que entre las fases de inicio de desarrollo de las vainas y llenado de las mismas la incidencia de la enfermedad se incrementa rápidamente en el campo.

Para el aislamiento del hongo y obtención de la fuente de inóculo se aplicará el protocolo estandarizado por el PRONALEG-GA. Para lo cual se recolectarán muestras de plantas que presenten síntomas de la enfermedad. Estas muestras serán cortadas en trozos de 0,1 a 1  $\text{cm}^2$  y serán desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1%. Después se lavarán tres veces consecutivamente con agua destilada esterilizada y se fragmentarán en pedazos más pequeños dentro de una cámara de flujo laminar previamente desinfectada. Estos fragmentos se ubicarán en cajas Petri con un medio de cultivo no acidificado compuesto por harina de arveja, dextrosa y agua en cantidades de 40 g, 20 g y 20 g, respectivamente, para un litro de medio de cultivo. Las cajas serán incubadas a 22°C durante 8 días. Una vez obtenidas las colonias, estas serán sub-cultivadas en cajas Petri con el mismo medio. En éstas se seleccionará una sola colonia, la cual servirá para un nuevo sub-cultivo, el cual se incubará por 8 días a 22°C. A partir de este sub-cultivo se realizará la proliferación del hongo en cajas Petri adicionales, las cuales se incubarán a 22°C por 15 días.

Los cultivos del hongo se enjuagarán y rasparán con agua destilada esterilizada para liberar las esporas. La suspensión de esporas se filtrará a través de una doble capa de gasa de algodón. La concentración de conidias se medirá con un hematocitómetro y se la ajustará a 50000 conidias  $\text{ml}^{-1}$ .

La inoculación se realizará de la forma aplicada por Boros y Marcinkowska (2010). A la suspensión con conidias se le añadirá el agente dispersante Tween 20 al 0,01%. La aplicación se la realizará con una bomba de mochila de 20 l de capacidad. El inóculo se aplicará en las últimas horas de la tarde.

Al cabo de 15 días después de la inoculación, se evaluará la severidad del ataque del hongo en las plantas de acuerdo a la escala adoptada de Timmerman-Vaughan *et al.* (2002). Aquellas plantas que se encuentren dentro de los valores 0 a 3 se identificarán como genotipos con resistencia a la enfermedad.

## 6. Cronograma

Cuadro 6. Cronograma de actividades para el proyecto de tesis.

MESES														
ACTIVIDADES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Elaboración de anteproyecto	■													
Presentación al Comité		■												
Dosimetría			■											
Generación M <sub>1</sub>				■	■	■	■	■						
Generación M <sub>2</sub>									■	■	■	■		
Procesamiento de Datos													■	
Corrección de tesis													■	
Presentación del proyecto final														■

## 7. Presupuesto

Cuadro 7. Presupuesto del proyecto de tesis.

Rubro	Unidad	Cantidad	Precio Unitario (Dólares)	Precio Total (Dólares)
<b>Dosimetría</b>				
Sustrato estéril	Quintal	2	\$ 28,00	\$ 56,00
Papel de Germinación	Paquete	2	\$ 7,00	\$ 14,00
Bandejas de Germinación	Unidad	10	\$ 3,00	\$ 30,00
Irradiaciones		5	\$ 150,00	\$ 750,00
<b>Generación M1</b>				
<b>Preparación del suelo</b>				
Arada	Horas/tractor	1,5	\$ 15,00	\$ 22,50
Rastrada	Horas/tractor	1	\$ 15,00	\$ 15,00
Surcada	Horas/tractor	1	\$ 15,00	\$ 15,00
<b>Mano de Obra</b>				
Siembra	Jornal	2	\$ 10,00	\$ 20,00
Fertilización	Jornal	1	\$ 10,00	\$ 10,00
Deshierba	Jornal	6	\$ 10,00	\$ 60,00
Aporque	Jornal	6	\$ 10,00	\$ 60,00
Cosecha	Jornal	10	\$ 10,00	\$ 100,00
<b>Insumos</b>				
Fertilizante	Kg	66	\$ 0,50	\$ 33,00
Insecticidas/Fungicidas	Kg	1	\$ 23,00	\$ 23,00
Abonos Foliare	Kg	1,5	\$ 5,00	\$ 7,50
Costales	Costal	10	\$ 0,30	\$ 3,00
<b>Generación M2</b>				
<b>Preparación del suelo</b>				
Arada	Horas/tractor	6	\$ 15,00	\$ 90,00
Rastrada	Horas/tractor	4,5	\$ 15,00	\$ 67,50
Surcada	Horas/tractor	3	\$ 15,00	\$ 45,00
<b>Mano de Obra</b>				
Siembra	Jornal	9	\$ 10,00	\$ 90,00
Fertilización	Jornal	3	\$ 10,00	\$ 30,00
Deshierba	Jornal	30	\$ 10,00	\$ 300,00
Aporque	Jornal	30	\$ 10,00	\$ 300,00
Cosecha	Jornal	45	\$ 10,00	\$ 450,00
<b>Insumos</b>				
Fertilizante	Kg	300	\$ 0,50	\$ 150,00
Insecticidas	Kg	5	\$ 23,00	\$ 115,00
Abonos Foliare	Kg	5	\$ 5,00	\$ 25,00
Costales	Costal	50	\$ 0,30	\$ 15,00
<b>Otros gastos</b>				
Movilización		1	\$ 100,00	\$ 100,00
Material de Oficina		1	\$ 60,00	\$ 60,00
Aranceles		1	\$ 500,00	\$ 500,00
<b>SUBTOTAL</b>				\$ 3.556,50
Imprevistos (5%)				\$ 177,83
<b>TOTAL</b>				\$ 3.734,33

## 8. Bibliografía

Boros, L. y Marcinkowska, J. 2010. Assessment of Selected Pea Genotypes Reaction to Ascochyta Blight under Field Conditions and the Impact of Disease Severity on Yield Components. (en línea). *Journal of Agricultural Science* 2(3):84-91. Consultado: 3 jul. 2011. Disponible en: [www.ccsenet.org/jas](http://www.ccsenet.org/jas)

Bretag, T.; Keane, P. y Price, T. 2006. The epidemiology and control of ascochyta blight in field peas: a review. *Australian Journal of Agricultural Research* 57: 883-902.

Burkart, W. 2009. Opening Remarks. In Shu, QY. Ed. *Induced Plant Mutations in the Genomic Era*. Roma, Italia. FAO/IAEA

Caicedo, C; Peralta, E. 1999. Chocho, Frejol y Arveja, Leguminosas de grano comestible con un gran mercado potencial en Ecuador. Programa Nacional de Leguminosas. Estación Experimental Santa Catalina. INIAP FUNDACYT PROFRIZA. Quito Ecuador 22p.

Dhulgande, GS; Dhale, DA; Pachkore, GL; Satpute, RA. 2011. Mutagenic Effectiveness and Efficiency of Gamma Rays and Ethyl Methanesulphonate in Pea (*Pisum sativum* L.). (en línea). *Journal of Experimental Sciences* 2(3): 7-8. Consultado 20 mar. 2011. Disponible en: <http://www.jexpsciences.com>

FAO/IAEA (Food and Agriculture Organization/International Atomic Energy Agency). 2011. Mutant Varieties Database. (en línea). Viena, Austria. Consultado 2 mar. 2011. Disponible en: <http://mvgs.iaea.org/Search.aspx>

FNCA (Forum for Nuclear Cooperation in Asia). 2004. Mutation Breeding Manual. (en línea). Eds. Medina, FIS; Amano, E; Tano S. Consultado 4 mar. 2011. Disponible en: [http://www.fnca.mext.go.jp/english/mb/mbm/e\\_mbm.html](http://www.fnca.mext.go.jp/english/mb/mbm/e_mbm.html)

Hagedorn, D. 1984. Compendium of pea diseases. American Phytopathological Society. St. Paul, MN. 57 p.

INAMHI, 2004-2008. Anuario Meteorológico No. 44-48. (en línea). INAMHI. Quito, Ecuador. Consultado 27 jul 2011. Disponible en: <http://www.inamhi.gov.ec/html/anuarios.htm>

INEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos). 2010. Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua ESPAC. (en línea). Consultado 15 ene. 2011. Disponible en: <http://redatam.inec.gov.ec:9090/lcds-samples/testdrive-remoteobject/main.html#>

INIAP (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias). 2010. Informe Técnico Anual. Estación Experimental Santa Catalina. Quito, Ecuador

INIAP. 2008. Estación Experimental Santa Catalina. Boletín Promocional No. 20. Quito, Ecuador.

Jaranowski, J. y Micke, A. 1985. Mutation Breeding in Peas. (en línea) Joint FAO/IAEA. Mutation Breeding Review. no 2. 24p. Consultado 4 jul 2011. Disponible en: [http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/\\_Public/32/024/32024229.pdf](http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/32/024/32024229.pdf)

López, R. y Yáñez, E. 2011. Evaluación y selección de plantas mutantes con resistencia a tizón tardío (*Phytophthora infestans*) en variedad Superchola (*Solanum tuberosum*) a nivel de campo obtenidas mediante radiaciones ionizantes Gamma en Mejía, Provincia de Pichincha. (en línea). Memorias del IV Congreso Ecuatoriano de la Papa. Consultado 6 sep 2011. Disponible en: [http://www.quito.cipotato.org/4\\_Nac\\_papa/Memorias/r\\_lopez\\_memoria.pdf](http://www.quito.cipotato.org/4_Nac_papa/Memorias/r_lopez_memoria.pdf)

Maluszynski, M; Szarejko, I; Bhatia, CR, Nichterlein, K; Lagoda, P.JL. 2009. Methodologies for generating variability. Part 4: Mutation techniques. In Ceccarelli, S; Guimarães, EP, Weltzien, E; Eds. Plant breeding and farmer participation. Roma, Italia. FAO. p.160-173.

Mehandjiev, A., Noveva, S. y Kosturkova, G. 1999. Induced mutations and their application in genetic improvement of pea. (en línea). *Pisum Genetics* 31: 24-26. Consultado: 4 jul 2011. Disponible en: <http://pisum.bionet.nsc.ru/pg/31/24.htm>

OIEA (Organismo Internacional de Energía Atómica) 2001. Radiation Sensitivity Tables. (en línea). Consultado 2 mar 2011. Disponible en: <http://mvg.iaea.org/PDF/Radiation%20Sensitivity%20Tables.xls>

Peralta, E; Murillo, A; Mazón, N; Monar, C; Pinzón, J; Rivera, M. 2010a. Manual Agrícola de Fréjol y otras Leguminosas. Cultivos, Variedades y Costos de Producción. Publicación Miscelánea no 135 (Segunda impresión actualizada). Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos. Estación Experimental Santa Catalina. INIAP. Quito, Ecuador. 70 p.

Peralta, E; Murillo, A; Mazón, N; Pinzón, J; Monar, C. 2010b. INIAP 436 Liliana. Nueva variedad de arveja para la provincia de Bolívar. Boletín divulgativo No. 381. Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos. Estación Experimental Santa Catalina. INIAP. Quito, Ecuador.

Prina, A. 1989. Consideraciones sobre la aplicación eficiente de la mutagénesis inducida en fitomejoramiento. Castelar, Argentina. Instituto de Genética. INCA-CITA. Mendelina 9(1): 5-49.

Prina, A; Landau, A; Pacheco, MG; Hopp, E; 2 010. Mutagénesis, TILLING y EcoTILLING. In Levitus, G; Echenique, V; Rubinstein, C; Hopp, E; Mronginski, L; Eds. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. 2 ed. S.I. Argenbio INTA. p. 217-228.

Rubiales, D.; Fernández-Aparicio, M.; Moral, A.; Barilli, E.; Sillero, J. Y Fondevilla, S. 2009. Disease Resistance in Pea (*Pisum sativum* L.) Types for Autumn Sowings in Mediterranean Environments. (en línea) *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 45(4): 135-142. Consultado: 18 jun. 2011. Disponible en: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/13676.pdf>

Skoglund, L. G., Harveson, R. M., Chen, W., Dugan, F., Schwartz, H. F., Markell, S. G., Porter, L., Burrows, M. L., and Goswami, R. 2011. Ascochyta Blight of Peas. (en línea). *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2011-0330-01-RS. Consultado 25 jun 2011. Disponible en: [http://www.vffarms.com/Images/Resources/Crop\\_Health/Peas/Ascochyta\\_Peas.pdf](http://www.vffarms.com/Images/Resources/Crop_Health/Peas/Ascochyta_Peas.pdf)

Tapia, C. y Zambrano, E. 2004. Inducción de mutaciones en naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.). Informe Técnico Anual INIAP. Quito, Ecuador. pp.139-148.

Timmerman-Vaughan, G., Frew, T., Butler, R., Murray, S., Gilpin, M., Falloon, K., Johnston, P., Lakeman, P., Russell, A. y Khan, T. 2004. Validation of quantitative trait loci for Ascochyta blight resistance in pea (*Pisum sativum* L.), using populations from two crosses. (en línea). *Theoretical and Applied Genetics* 109(8):1620-1631. Consultado 20 jun 2011. Disponible en: <http://www.springerlink.com/content/8yawxw31xbp6gvmc/>

Timmerman-Vaughan, G., Frew, T., Russell, A., Khan, T., Butler, R., Gilpin, M., Murray, S y Falloon, K. 2002. QTL Mapping of Partial Resistance to Field Epidemics of Ascochyta Blight of Pea. (en línea). *Crop Sci.* 42:2100–2111. Consultado 25 jun 2011. Disponible en: <https://www.crops.org/publications/cs/articles/42/6/2100>

Tomlekova, N. 2010. Induced Mutagenesis for Crop Improvement in Bulgaria. (en línea). Joint FAO/IAEA. Plant Mutation Reports 2 (2): 4-27. Consultado 26 jun 2011. Disponible en: <http://www-naweb.iaea.org/nafa/pbg/public/pmr-02-02.pdf>

Villavicencio, F. y Benitez J. 2009. Multiplicación de plantas irradiadas de papa (para resistencia). (en línea). Informe Anual 2008. Estación Experimental Santa Catalina. Departamento Nacional de Biotecnología. Quito, Ecuador. p. 47-49. Consultado 6 sep 2011. Disponible en: [http://www.iniap.gob.ec/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&gid=338&Itemid=796](http://www.iniap.gob.ec/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=338&Itemid=796)

Wani, A. 2009. Mutagenic Effectiveness and Efficiency of Gamma Rays, Ethyl Methane Sulphonate and their combination treatments in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) (en línea). Asian Journal of Plant Science. Consultado 20 mar. 2011. Disponible en: <http://www.docsdrive.com/pdfs/ansinet/ajps/0000/8927-8927.pdf>

## 9. Anexos

### 9.1. Anexo 1

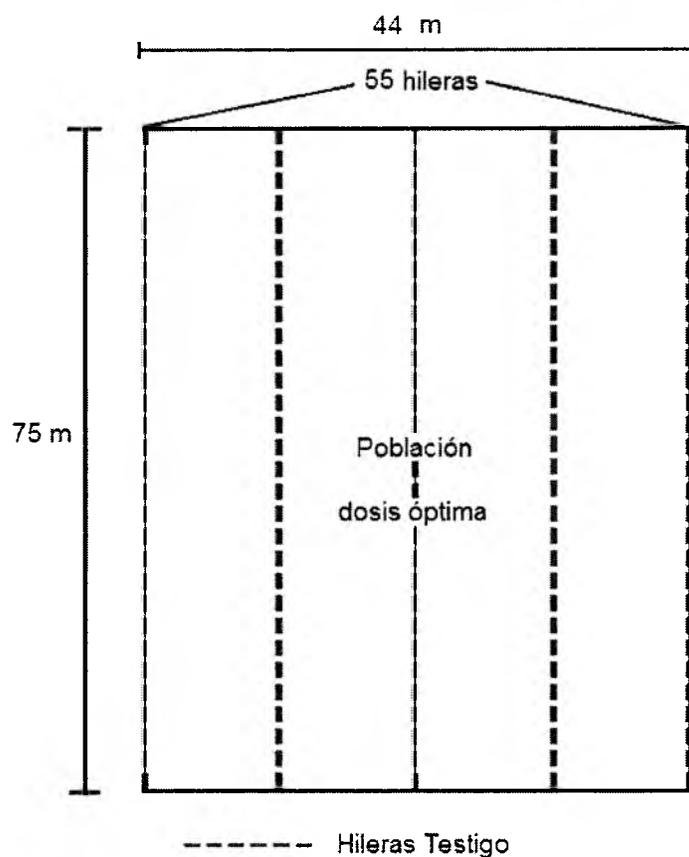
#### Características de la variedad INIAP 436 Liliana.

CARACTERES	INIAP 436 LILIANA
<b>MORFOLÓGICOS</b>	
Hábito de Crecimiento	Decumbente
Color de grano seco	crema
Altura de la planta (cm)	113,7
<b>AGRONÓMICOS</b>	
Días a la floración	68
Días a la cosecha en verde	92
Días a la cosecha en seco	121
Rendimiento promedio en grano seco (kg/ha).	1688
Rendimiento promedio en vaina verde (kg/ha).	6673
<b>DE CALIDAD</b>	
Contenido de proteína (base seca)	25,5%

Fuente: (Peralta *et al.*, 2010b)

### 9.2. Anexo 2

#### Distribución de las hileras de la población testigo entre las hileras de la población dosis óptima en la generación $M_1$



9.3. Anexo 3

Distribución de las hileras de la población testigo entre las hileras de la población dosis óptima en la generación M<sub>2</sub>

