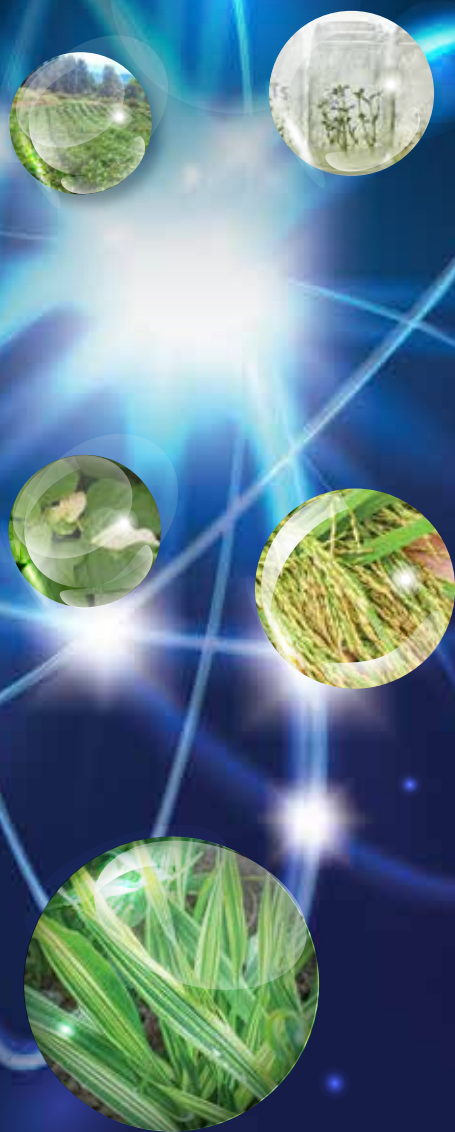


Vol. 12, Núm. 3 (2020)

aci
avances
en ciencias e
ingenierías

**II Simposio
Latinoamericano de**

Aplicaciones Nucleares en la Agricultura



Vol. 12, Núm. 3 (2020)

aci

avances
en ciencias e
ingenierías

USFQ PRESS

Universidad San Francisco de Quito USFQ
Campus Cumbayá USFQ, Quito 170901, Ecuador
<https://usfqpress.com>

USFQ PRESS es el departamento editorial de la Universidad San Francisco de Quito USFQ. Fomentamos la misión de la universidad al divulgar el conocimiento para formar, educar, investigar y servir a la comunidad dentro de la filosofía de las Artes Liberales.

ACI Avances en Ciencias e Ingenierías

Vol. 12, Núm. 3, 2020

Autores en esta edición:

Fatma Sarsu¹, Isaac Kofi Bimpong¹, Ljupcho Jankuloski¹, Alejandra Landau², Vanina Brizuela², Franco Lencina², Alicia Martínez², Daniel Díaz², María Gabriela Pacheco², Alberto R. Prina², Mauricio Tcach³, Verónica Bugallo^{4,5}, Gabriela Facciuto⁵, Mariana Pérez de la Torre⁵, Vanina Brizuela⁶, Alberto Prina⁶, Alejandra Landau⁶, Pablo Álvarez⁷, Álvaro Yépez⁷, Emilio Basantes⁷, Ángel Murillo⁸, Eduardo Peralta⁸, Jorge Rivadeneira⁹, Xavier Cuesta⁹, Roberto López¹⁰, María Villavicencio¹¹, Kristha Paredes Branda¹², Héctor Nakayama¹², Edith Segovia¹², María Caridad González¹³, Yamil E. Cartagena¹⁴, Rafael A. Parra¹⁴, Franklin M. Valverde¹⁴, José L. Zambrano¹⁴, Soraya P. Alvarado¹⁵, Eddy Paul Anguisaca Totasi¹⁶, María Cristina Cuesta Plúa¹⁶, Marco Vinicio Sinche Serra¹⁶, Elena Villacrés¹⁷, Mishel Yanez^{17,18}, María Belén Quelal¹⁷, Trosky Yáñez¹⁸, Javier Garófalo-Sosa¹⁹, Luis Ponce-Molina¹⁹, Patricio Noroña-Zapata¹⁹, Diego Campaña-Cruz¹⁹

¹Plant Breeding and Genetics Section, Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria.

²Instituto de Genética "Ewald A. Favret" (IGEAF), CICVyA, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Buenos Aires, Argentina.

³Estación Experimental Agropecuaria Sáenz Peña, Chaco, Argentina.

⁴Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

⁵Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Floricultura, Buenos Aires, Argentina.

⁶Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Genética "Ewald A. Favret", Buenos Aires, Argentina.

⁷Universidad de la Fuerzas Armadas ESPE, Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias IASA I. Sangolquí, Ecuador.

⁸Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental Santa Catalina, Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos. Cutuglahua, Ecuador.

⁹Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental Santa Catalina (EESC), Programa Nacional de Raíces y Tubérculos. Mejía, Ecuador.

¹⁰Universidad Estatal de Bolívar, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Medio Ambiente. Guaranda, Ecuador.

¹¹Escuela Politécnica Nacional, Departamento de Ciencias Nucleares, Quito, Ecuador.

¹²Universidad Nacional de Asunción, Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica, Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (UNA, DGICT, CEMIT), San Lorenzo, Paraguay.

¹³Instituto Nacional Ciencias Agrícolas (INCA), Mayabeque, Cuba.

¹⁴Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental Santa Catalina, Mejía, Ecuador.

¹⁵Universidad Central del Ecuador (UCE), Facultad de Ciencias Agrícolas, Quito, Ecuador.

¹⁶Departamento de Ciencias Nucleares, Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria, Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.

¹⁷Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Estación Experimental Santa Catalina, Departamento de Nutrición y Calidad de Alimentos, Mejía, Ecuador.

¹⁸Universidad Central del Ecuador (UCE). Carrera de Química de Alimentos. Quito, Ecuador.

¹⁹Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental Santa Catalina, Programa de Cereales, Mejía, Ecuador.

Esta obra es publicada luego de un proceso de revisión por pares (*peer-reviewed*) que contó con la participación de dos revisores académicos anónimos para cada artículo.

Editora en jefe: Eva Lantsoght

Editores de ese número especial: Gabriela Albán, Mario Caviedes y José L. Zambrano

Editores Asociados:

Daniela Almeida Streitwieser, Politécnico, Universidad San Francisco de Quito, Ecuador

Diana Alexandra Pazmiño, COCIBA, Universidad San Francisco de Quito, Ecuador

Diego F. Cisneros-Heredia, COCIBA, Universidad San Francisco de Quito, Ecuador

Elisa Bonaccorso, COCIBA, Universidad San Francisco de Quito, Ecuador

Esteban Suarez, COCIBA, Universidad San Francisco de Quito, Ecuador

Juan Manuel Guayasin, COCIBA, Universidad San Francisco de Quito, Ecuador

Prof. Lionel Trojman, Institut supérieur d'électronique de Paris, Francia

Melissa Infusino, Politécnico, Universidad San Francisco de Quito, Ecuador

Oihane Fernandez Blanco, Politécnico, Universidad San Francisco de Quito, Ecuador

René Parra Narváez, Politécnico, Universidad San Francisco de Quito, Ecuador

Consejo Editorial:

Andrea Arias, DuPont Pioneer, Johnston, IA, Estados Unidos
Carlos Ventura, The University of British Columbia, Vancouver, BC, Canadá
César Costa, Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador, Ecuador
César Iván Álvarez-Mendoza, Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador
Johannio Marulanda Casas, Universidad del Valle, Cali, Colombia
John Blake, University of Florida, Gainesville, FL, Estados Unidos
Luis Rincón, Universidad de Los Andes, Mérida, República Bolivariana de Venezuela
Nikolay Aguirre, Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador
Oswaldo Morales Nápoles, Delft University of Technology, Países Bajos
Robert Cazar, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador
Ruth Mariela Álvarez, Universidad de Carabobo, República Bolivariana de Venezuela
Salvador Godoy, Instituto Politécnico Nacional, México, México D.F.
Santiago Ron, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ecuador
Yenisel Plasencia-Calaña, Maastricht University, The Netherlands

Comité Científico Internacional

Gabriela Guevara, Universidad Técnica de Berlín Alemania
Howard Ramirez-Malule, Universidad del Valle, Colombia
Janio Jardán, Universidad Tecnológica Indoamérica, Quito, Ecuador
Julio Valdivia-Silva, Universidad de Ingeniería & Tecnología, Perú
Luca Sorriso-Valvo, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Rome, Italy
Nora Oleas, Universidad Tecnológica Indoamérica, Quito, Ecuador
Oliver Merchiers, Institut national des sciences appliquées (INSA) Lyon, Francia
Patricia Conde Cespedes, ISEP - école d'ingénieurs du numérique, Francia
Patrick Venail, Universidad de Ingeniería & Tecnología, Perú
Paula Rojas, Universidad Adolfo Ibáñez, Santiago, Chile
Rafael Angarita, Institut Supérieure d'électronique de Paris (ISEP), Francia
Tiziano Perea, Universidad Autónoma Metropolitana, México
Victor Murray, Universidad de Ingeniería & Tecnología, Perú

Producción editorial: Eva Lantsoght

Corrección de Estilo: Gabriela Albán

Diseño de cubierta: Ricardo Vásquez

Diseño y diagramación: Krushenka Bayas

Webmaster: Jaime Páez

3ª edición, abril 2021

ISSN(e): 2528-7796

DOI: <http://dx.doi.org/10.18272/aci.v12i3>



Esta publicación se realiza bajo los términos de una licencia Creative Commons «Atribución-NoComercial- 4.0 Internacional». Para atribución, los autores originales, título, fuente (USFQ Press) y el DOI o URL de la publicación deben ser citados.

Catalogación en la fuente Biblioteca de la Universidad San Francisco de Quito USFQ.

Simposio Latinoamericano de Aplicaciones Nucleares en la Agricultura
(2° : 2020 : Quito, Ecuador)

Aplicaciones nucleares en la agricultura / autores en esta edición,
Fatma Sarsu ... [y otros]. – 3ª ed. – Quito : USFQ Press, 2021.

p. cm. ; (ACI Avances en Ciencias e Ingeniería, ISSN: 2528-7788 ;
Vol. 12, no. 3 (2020))

1. Agricultura – Congresos, conferencias, etc. – I. Sarsu, Fatma. – II.
Título. – III. Serie.

CLC: SB 16 .S56 2021
CDD: 338.175096

OBT-112

El uso de nombres descriptivos generales, nombres comerciales, marcas registradas, etc. en esta publicación no implica, incluso en ausencia de una declaración específica, que estos nombres están exentos de las leyes y reglamentos de protección pertinentes y, por tanto, libres para su uso general.

La información presentada en este libro es de entera responsabilidad de sus autores. USFQ PRESS presume que la información es verdadera y exacta a la fecha de publicación. Ni la Editorial, ni los autores dan una garantía, expresa o implícita, con respecto a los materiales contenidos en este documento ni de los errores u omisiones que se hayan podido realizar.

Contenido

Prólogo 1

Comunicados

Contribution of induced mutation in crops to global food security 2

Contribución de la mutación inducida en cultivos a la seguridad alimentaria mundial

Fatma Sarsu, Isaac Kofi Bimpong, Ljupcho Jankuloski

Induced mutations in crop plants: mutants of scientific and/or agronomic interest at the Institute of Genetics “Ewald A. Favret” 12

Mutaciones inducidas en plantas cultivadas: mutantes de interés científico y/o agronómico en el Instituto de Genética “Ewald A. Favret”

Alejandra Landau, Vanina Brizuela, Franco Lencina, Alicia Martínez, Mauricio Tcach, Daniel Díaz, María Gabriela Pacheco, Alberto R. Prina

Artículos

Aplicación de rayos X para la obtención de mutantes ornamentales en *Salvia coccinea* 26

X-rays treatments to obtain ornamental mutants in *Salvia coccinea*

Verónica Bugallo, Gabriela Facciuto, Vanina Brizuela, Alberto Prina, Mariana Pérez de la Torre, Alejandra Landau

Evaluación fenotípica de dos generaciones de plantas de arveja (*Pisum sativum* L.) provenientes de semillas irradiadas con rayos gamma 36

Phenotypic evaluation of two generations of pea plants (*Pisum sativum* L.) from gamma-irradiated seeds

Pablo Álvarez, Álvaro Yépez, Emilio Basantes, Ángel Murillo, Eduardo Peralta

Generación y selección de mutantes de papa (*Solanum tuberosum*) con resistencia al tizón tardío (*Phytophthora infestans*) 50

Generation and selection of potato mutants (*Solanum tuberosum*) with resistance to late blight (*Phytophthora infestans*)

Jorge Rivadeneira, Roberto López, María Villavicencio, Xavier Cuesta

Determinación de la dosis letal media (DL50) para mutaciones inducidas con rayos gamma en dos variedades de cebada (*Hordeum Vulgare* L.) 58

Determination of the medium lethal dose (LD50) for gamma rays induced mutations in two barley varieties (*Hordeum Vulgare* L.)

Javier Garófalo Sosa, Luis Ponce-Molina, Patricio Noroña Zapata, Diego Campaña Cruz

Evaluación in vivo del efecto genotóxico y citotóxico de los extractos acuosos de dos variedades mutantes de *Hibiscus sabdariffa* L. 72

In vivo evaluation of the genotoxic and cytotoxic effect of the aqueous extracts of two mutant varieties of *Hibiscus sabdariffa* L.

Kristha Paredes Branda, Héctor Nakayama, María Caridad González, Edith Segovia

Eficiencia del uso de abonos verdes y urea en el cultivo de maíz de valles altos	80
Efficiency of the use of green manures and urea in the cultivation of corn in the highlands Yamil E. Cartagena, Rafael A. Parra, Soraya P. Alvarado, Franklin M. Valverde, José L. Zambrano	
Tratamiento postcosecha con radiación gamma para extender la vida útil de papa chaucha amarilla (<i>Solanum phureja</i>)	94
Post-harvest treatment with gamma radiation to increase shelf life of yellow chaucha potato <i>Solanum phureja</i> Eddy Paul Anguisaca Totasig, María Cristina Cuesta Plúa, Marco Vinicio Sinche Serra	
Efecto de la irradiación gamma sobre las características de calidad y la durabilidad de la papa (<i>Solanum tuberosum</i>) almacenada	112
Effect of gamma irradiation on the quality characteristics and durability of stored potato (<i>Solanum tuberosum</i>) Elena Villacrés, Mishel Yanez, María Belén Quelal, Trosky Yáñez	
Proceso editorial	128

Prólogo

Las aplicaciones de isótopos y radiaciones en la agricultura han sido una de las áreas de cooperación técnica e investigación más importantes en la Organización Internacional de Energía Atómica (OIEA). El Acuerdo Regional de Cooperación para la Promoción de la Ciencia y la Tecnología Nucleares en América Latina y el Caribe (ARCAL), establecido en 1984, es el principal mecanismo de acción en la región, mediante el cual se promueve el uso de las técnicas nucleares con fines pacíficos, para investigación y desarrollo. Entre los problemas que se abordan en los proyectos desarrollados se encuentran la producción agrícola, las prácticas eficientes en el uso de fertilizantes y agua, el control de plagas, inocuidad de alimentos, la repercusión en el medio ambiente de los residuos de plaguicidas y la producción y sanidad pecuaria.

El aumento en la producción de alimentos es una necesidad de la humanidad que se deberá resolver en los próximos años. Aumentar la producción de alimentos de una manera sostenible requerirá un uso más adecuado de los recursos genéticos disponibles, además de tierra y agua. La tecnología nuclear es una de las formas más innovadoras que se utilizan para mejorar la producción y las prácticas agrícolas. Las aplicaciones nucleares en la agricultura dependen del uso de isótopos y técnicas de radiación para combatir plagas y enfermedades, generar nuevas variedades, aumentar la producción de cultivos, proteger la tierra y los recursos hídricos, garantizar la inocuidad y autenticidad de los alimentos y aumentar la producción ganadera.

Una de las actividades más relevante en América Latina y el Caribe del ARCAL es el uso de energía nuclear en programas de mejoramiento genético, mediante la irradiación de rayos gamma en diferentes cultivos de importancia económica, dirigidos a obtener nuevas variedades con mayor adaptación al cambio climático, con incrementos de productividad y disminución del ciclo de cultivo.

La Carrera de Ingeniería en Agronomía del Colegio de Ciencias e Ingenierías de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ), el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), OIEA, ARCAL y el Programa Coreano en Agricultura Internacional (KOPIA) organizaron en la ciudad de Quito en marzo de 2020 el "II SIMPOSIO LATINOAMERICANO DE APLICACIONES NUCLEARES EN LA AGRICULTURA" dirigido a técnicos, docentes, investigadores y estudiantes de la Carrera de Agronomía y otras áreas afines de la región. El objetivo fue promover el intercambio de experiencias y conocimientos sobre el uso de técnicas nucleares en agricultura en las áreas de Mejora Genética Vegetal, Sanidad Vegetal, Seguridad Alimentaria y Adaptación al Cambio Climático en la región. En el Simposio participaron expositores de 17 países de Latinoamérica y del Caribe, que pertenecen a: INTA (Argentina), EPAGRI (Brasil), Comisión Chilena de Energía Nuclear (Chile), Universidad Distrital Francisco José de Caldas (Colombia), Universidad Nacional de Costa Rica (Costa Rica), INCAE (Cuba), IDIAF (República Dominicana), INIAP (Ecuador), Universidad de El Salvador (El Salvador), ICTA (Guatemala), Ministerio de Agricultura (Jamaica), ITSON (México), Universidad Centroamericana (Nicaragua), IDIAP (Panamá), Universidad Nacional de Asunción (Paraguay), Universidad Nacional Agraria La Molina (Perú) y el INIA (Venezuela). Participaron además colegas del IAEA (Austria).

Esta edición especial de la revista ACI Avances en Ciencias e Ingeniería publica en extenso varios de los trabajos presentados durante el Simposio y pretende apoyar con la difusión del uso de la energía nuclear en agricultura en América Latina y el Caribe.

La edición fue planificada después del Simposio de Quito, antes de que se declarara la pandemia causada por COVID-19, estuvo prevista para ser publicada en noviembre de 2020. La pandemia retrasó cuatro meses la planificación original, porque la mayoría de los autores, de diversas partes del mundo, tuvieron que reprogramar sus actividades ante la incertidumbre de los primeros meses de la pandemia y el cambio en el modo de trabajo.

Contribution of induced mutation in crops to global food security

Fatma Sarsu¹, Isaac Kofi Bimpong¹ and Ljupcho Jankuloski¹

¹Plant Breeding and Genetics Section, Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria.

*Autor para correspondencia/ Corresponding autor, e-mail: F.Sarsu@iaea.org

Contribución de la mutación inducida en cultivos a la seguridad alimentaria mundial

Abstract

Mutation breeding for crop improvement is a technique used for over 70 years. Induced mutation is a fast way to increase the rate of spontaneous genetic variation in plants contributing to global food security. The genetic variability, created through mutagenesis i.e. physical or chemical, is an important breeding material for developing improved varieties and many studies in the field of functional genomics. The randomly generated heritable genetic changes are expressed in the mutant plants, which are selected for new and useful traits, such as high yielding, disease resistance, tolerance to abiotic stresses and improved nutritional quality. The technique helps to improve the tolerance of crop species to adverse climatic conditions, such as extremes of temperatures, drought, occurrence of pests and diseases. Through support provided by the Joint FAO/IAEA Division, significant agronomic and economic impact has been generated in many countries. The FAO/IAEA Mutant Variety Database (MVD) (<http://mvd.iaea.org>) demonstrates the significance of mutation induction as an efficient tool in crop improvement. The extensive use of induced mutant germplasms in crop improvement programs resulted in releasing of more than 3,332 mutant varieties from around 228 crop species (20 July 2020).

Keywords: Crop improvement, Food security, Induced mutations, Mutant varieties, Plant breeding.

Resumen

El mejoramiento por mutaciones para la mejora de cultivos es una técnica utilizada desde hace más de 70 años. La mutación inducida es una forma rápida de aumentar la tasa de variación genética espontánea en plantas que contribuyen a la seguridad alimentaria mundial. La variabilidad genética, creada a través de mutagénesis, es decir, física o química, es un material de reproducción importante para el desarrollo de variedades mejoradas y muchos estudios en el campo de la genómica funcional. Los cambios genéticos hereditarios generados aleatoriamente se expresan en las plantas mutantes, que se seleccionan por características nuevas y útiles, tales como alto rendimiento, resistencia a enfermedades, tolerancia al estrés abiótico y mejor calidad nutricional. La

técnica ayuda a mejorar la tolerancia de las especies de cultivos a condiciones climáticas adversas, como temperaturas extremas, sequía, aparición de plagas y enfermedades. Gracias al apoyo proporcionado por la División Mixta FAO / OIEA, se han generado importantes efectos agronómicos y económicos en muchos países. La base de datos de variedades mutantes (MDV, por sus siglas en inglés) de la FAO / OIEA (<http://mvd.iaea.org>) demuestra la importancia de la inducción de mutaciones como una herramienta eficaz en la mejora de cultivos. El uso extensivo de germoplasmas mutantes inducidos en programas de mejora de cultivos dio como resultado la liberación de más de 3332 variedades mutantes de alrededor de 228 especies de cultivos (20 de julio de 2020).

Palabras clave: Mejoramiento de cultivos, Mutaciones inducidas, Seguridad alimentaria, Variedades mutantes.

INTRODUCTION

Food security, nutrition and promotion of sustainable agriculture are the key issues on the national governments' agenda in many countries. According to projections, the expected total population growth will be more than nine billion by 2050; therefore, an increase of at least 70% in food production is essential in the next three decades [1, 2]. The available land for agricultural expansion is very limited, thereby breeding new improved varieties with adaptability to climate change environment and improvement of crop productivity is becoming ever more important.

The impact of mutation breeding in plant development of crop production and providing sustainable agriculture is well known worldwide [3]. Mutation, which is heritable change in the genetic material of a living organism can lead to the creation of new germplasms which can be subsequently selected for better traits such as yield, resistance to disease pest, tolerance to abiotic stresses, nutritional quality, growth habits, and preferred end-user characters [4].

Climate change is largely accepted as a factual and pressing global problem. Nuclear techniques in plant mutation breeding has an important role in plant adaptation to climate change. Through global warming and the more frequent occurrence of extreme weather, it is an essential and effective measure to apply the good varieties with biotic/abiotic stress tolerance. The technique helps to enhance tolerance of crop species to adverse climatic conditions, such as high temperatures, drought, and occurrence of pests and diseases [5, 6].

Mutation breeding has become a traditional method in plant breeding and has contributed to the present germplasm and development of new varieties with desired traits. Based on the FAO/IAEA Mutant Variety Database [7] on the officially registered mutants, a total of 3332 mutant crop varieties in 228 crop species, across 73 countries have been released for planting in numerous countries throughout the world (Figure 1a-b). The mutant varieties are improved for a different trait such as resistance to biotic stress (557), tolerance to abiotic stress (248), increased yield and yield components (1029), quality and nutrition traits (1173), and agronomic and botanic traits (2981).

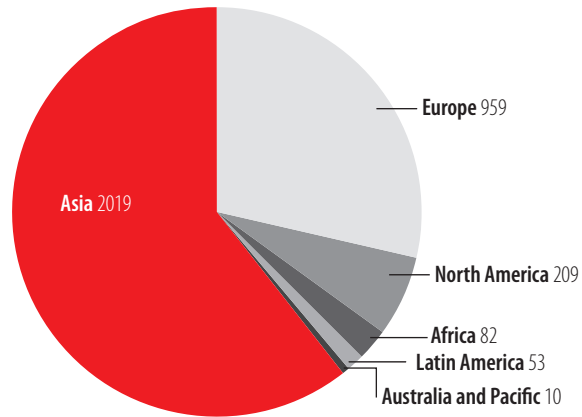


Figure 1a) The number of registered mutant varieties in different continents (July 2020, The FAO/IAEA MVD).

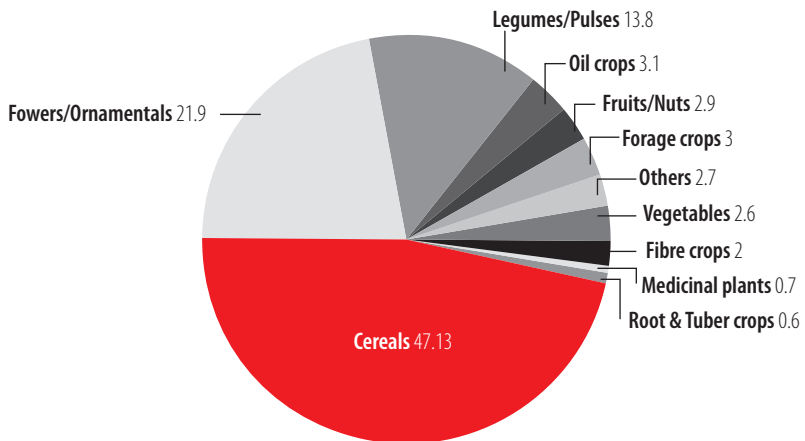


Figure 1b) Proportion of different mutant plant varieties (July 2020, The FAO/IAEA MVD).

The released plant mutant varieties are mostly consisted of cereal species (47.13%) with the majority of (25%) rice (Figure 1b), flowers/ornamentals (21.9%) and legumes and pulses (13.8%). Most of the mutant varieties are released in Asia (2019), following by Europe (959), North America (209), Africa (82), Latin America (53) and Australia and Pacific (10) (Figure 1a).

Numerous papers have already been available on the impact of mutant and mutation-derived crops [8,9], and many papers were presented at the Joint FAO/IAEA International Symposium on "Plant Mutation Breeding and Biotechnology" in 2018, in Vienna, Austria, and at the Symposium on "Applications of Nuclear Techniques in Agriculture" in 2020, in Quito, Ecuador. The worldwide contribution of induced mutations for food production and the food security is presented in this paper.

CONTRIBUTION OF INDUCED MUTATIONS TO THE GLOBAL FOOD SECURITY

Asia

Asia has more than 60% of induced mutations and mutation-derived varieties. China, Japan and India are countries that have registered the vast number of mutant varieties with an economic impact on food security.

In China, mutation induction in crops has been one of the efficient breeding approaches for more than 50 years. Based on the FAO/IAEA Mutant Variety Database (<https://mvd.iaea.org/>), China has released over 800 mutant cultivars in different crops which includes 46 ornamental species. The maximum annual dissemination area of mutant varieties is more than nine million hectares; which results in production of over 1.5 million tons of crops annually, with an estimated value of about US\$ 500 million [10].

Numerous research institutions and universities involved in mutation breeding in India. Thus far, over 340 mutant varieties have been registered in different crops such as 56 legumes and pulses, 32 edible oil plants and 26 groundnut mutant varieties. Appealing traits for released mutant includes high-yielding, early-maturing, large seed, high oil content and tolerance to biotic and abiotic stresses. The first induced large seed groundnut mutant variety, 'TG 1', was developed using X-ray irradiation in 1973. Subsequently, 15 Trombay groundnut (TG) varieties with superior traits, such as high-yield, large seed, early maturity were developed. Forty-five percent of Indian breeders' groundnut seeds are TAG varieties, mostly TAG24. Based on breeder seed statistics, these groundnut varieties produced 1 022 metric tons worth US\$ 1.18 million from 1998 to 2008 [8, 11].

In Japan, the research on radiation-induced mutation started during the 1960s. In total, 479 mutant varieties have been registered comprising 79 species, improved using X- and gamma- rays, ion beams, chemical mutagenesis and *in vitro* culture (soma clonal variation), and approximately 79% of these were induced using gamma irradiation [12].

Pakistan has succeeded to develop 59 mutant varieties in different crops, such as cotton (12), mung bean (11), rice (10), chickpea (9), wheat (6), lentil (3) oilseed brassica (3), mustard (1), sesame (2), groundnut (1), castor bean (1), and mandarin (1). The mutant variety 'NIAB 78' was the first cotton variety developed in 1983 using induced mutations. It has assisted transformation of cotton production and stimulated a wider impact on agriculture in Pakistan. 'NIAB 78' had early maturity and higher yield and showed wider adaptability and eventually covered 80% of the cotton area in Punjab and Sindh provinces [8]. By introduction of this variety, cotton production increased from 654 000 tons to 2 613 000 tons during 1991 and 1992 [13]. This mutant variety remained in farmers' fields over a very long period (1983–2000) and led to an increase in cotton production from 1 024 000 tons to 72 766 000 tons per year in Pakistan [14].

Mutation breeding for crop improvement, particularly in rice and soybean, is one of the most successful field of application of nuclear techniques in Viet Nam. To date, 58 crop varieties predominantly rice (36) have been released to farmers. The rest include, soybean, chrysanthemum, maize, groundnut, Indian jujube and field mint making



significant contributions to national food security [7]. Rice which represents more than 60% of mutant varieties, does not only contribute to the national food security, but also provides income and decreases poverty among millions of rural communities in Viet Nam. These rice mutant varieties have 10–20% higher yields in comparison to the parent varieties, with lodging resistance, tolerance to acid soils, salinity, tolerance to biotic stress, short duration and better nutritional quality. Due to short duration, mutant rice varieties can be cultivated 2–3 crops per year and avoid early flooding. With resistance to diseases and pests, cultivation can be done with a reduced number of sprayings, which saves costs and protects the environment from excessive use of pesticide [8–9].

Europe

Basic mutation research commenced in Europe during the late 1920s. Mutation breeding has become a significant method in the European plant breeding programmes resulting release of 959 mutant varieties, particularly in wheat and barley [15,16].

In Bulgaria, mutagenesis has been efficiently applied in crop breeding for over 50 years. The country has released 76 mutant cultivars in 15 different crop species, such as barley (5), wheat (5), durum wheat (9), maize (26), sunflower (3), lentil (4), bean (2), pea (1), chickpea and vetch (2), soybean (5), tomato (6), pepper (4), cotton (2), and tobacco (2). Some of the mutant varieties, e.g. maize mutant hybrid 'Kneja 509' and durum wheat variety 'Gergana' have become the leading varieties occupying up to 50% of the planting area from 1984 to 2000. In durum wheat, mutant varieties have not only covered nearly all the growing areas but also doubled the yield over the past 30 years [17].

Wheat mutation breeding programme had a great success with officially released eleven durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. Durum) varieties in Italy. Six of them were developed through the direct use of identified mutants and five were developed through cross breeding. Creso is one of the best durum wheat varieties which was released in 1974 that has a significant impact in Italian economy contributing with US\$1.9 billion. Many wheat mutant lines developed in Italy were used in the wheat improvement programs in Austria and Bulgaria for releasing improved wheat varieties [18, 8].

North America

The United States has developed 139 mutant varieties including the first semi-dwarf rice variety, 'Calrose 76' which was induced by gamma irradiation and officially released in 1977 in California. This gene is transferred by crossing other varieties and led to the development of 22 new rice cultivars in the United States, Australia and Egypt [19].

Latin America

The IAEA, through its technical cooperation program, together with the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) has been working with countries in Latin America and the Caribbean for many years to introduce and strengthen crop mutation breeding. In 2014, a new project was launched, with the participation of national agricultural research institutes and universities from 18 countries in the region. The Joint FAO/IAEA Division contributed extensively to human capacity building through regional

training courses (organized twice a year) on plant mutation breeding techniques for crop improvement, contributing towards food security. The project used mutation breeding techniques to develop improved crops with better tolerance to environmental stresses and better quality. The project targeted crops of economic interest to the region, as well as native crops of more local importance. The improved plants are being developed into new varieties that can be disseminated to farmers, where they will have an impact on food security and the agricultural economy in the region. As a result of the project, participating countries have successfully developed a range of new mutant varieties.

In Argentina, rice varieties from Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) covered 40% of the rice production area during 2016-17 [20]. Additionally, they were distributed in other Latin American countries, such as Uruguay, Colombia, Chile, Costa Rica, Panama, Dominican Republic, Nicaragua and Honduras, where weedy red rice is a problem. Currently Imidazoline herbicide resistant varieties are grown on more than 800 000 hectares. The IMI tolerant rice varieties have increased production and excellent growth. They have also been very useful to improve abandoned rice fields for being severely occupied by red rice [20].

Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) successful example from Brazil, has been effectively using induced mutations with the collaborating Centre of Nuclear Energy in Agriculture (CENA/USP) in the improvement of new rice varieties. In 2013, the mutant rice variety, 'SCS118 Marques', was developed through gamma application of parent SCSBRS Tio Taka variety [7]. This variety has lodging resistance, showing moderate resistance to blast disease, high yield, late maturity, long grains and consumer preferred cooking quality and is advised to be used in rice-producing areas of Santa Catarina. The mutant variety 'SCS121 CL' which shows resistance to Kifix (an herbicide of the Imidazolinones group) was released in 2014. It enables better control of weedy rice in the fields with the application of the herbicide, dropping the use of other chemicals [21,7].

The IMI-herbicide resistant cultivar (Clearfield rice) was improved through mutagenesis without the addition of any foreign gene and was registered in 2002 [22]. That has provided the selective control of weedy and wild rice in the fields. Additionally, employment of combined management practices has increased rice yield in Brazil by approximately 2500 kg ha⁻¹, an increase of 50% [23]. Around 1.1 million ha of an arable land was planted in Brazil with IMI herbicide resistant variety [24].

Induced mutation has been successfully applied in Cuba for genetic improvement of crops. Numerous successes have been achieved in a range of food and ornamental crops. So far, Cuba has released 21 varieties in hibiscus (3), sugarcane (4), tomato (3), rice (9) and soybean (2) [7]. The rice variety 'LP7', officially released in 1997, has higher yield and is tolerant to salinity. Another success is in tomato, 'Maybel' and 'Domi' mutant varieties, have significantly increased yields under drought conditions [25, 26].

Since 1978, Peru has continuously used induced mutation in crop improvement programs and produced significant results. The barley mutant variety 'UNA La Molina 95' was released in 1995 and is characterized by its earliness, short stature, and production of naked grains (huskless) with higher protein content [7]. The high yielding and better-quality barley variety 'Centenario', was released in 2006. It is grown at altitudes of up to



5 000 m above sea level and is changing the local varieties in the Central Highlands of Peru, extending the range of crops to higher altitudes [7,27]. The amaranth mutant variety 'Centenario' released in 2006, is cultivated in the Peruvian highlands, and can be labelled as an "organic product" and exported as a high-value commodity [7, 28].

Africa

The semi-dwarf mutant rice varieties, 'Giza 176' and 'Sakha 101', were released in Egypt during the 1990s with the standard yield abruptly increasing from 3.8 t ha⁻¹ to 8.9 t ha⁻¹. 'Giza 196' is cultivated as the lead variety with a yield of 10 t ha⁻¹ [9]. Induced mutation technique was also successfully applied in edible oil crops, such as sesame and safflower. Five sesame varieties were developed with high yield and good quality during 1992 to 1996. Two safflower varieties were released in 2011 with high yield and oleic fatty acid, resistant to leaf spot and smut, contributing to higher income for farmers in the country [7].

Since 1983, Ghana Atomic Energy Commission has been working on induced mutation in crop improvement. Cassava mutant variety 'Tekbankye' with excellent cooking and pounding quality was released in 1997. This mutant variety is tolerant to Africa Cassava Mosaic Virus (ACMV), thereby leading to its quick adoption by many farmers in Ghana's forest zone as it is used to prepare *fufu*, the nation's most popular cassava-based food. Farmers continued to cultivate this mutant variety in large acreages until its resistance to mosaic virus disease, particularly ACMV, broke down in the early 2000s. However, due to its preferred taste by consumers it is still being grown by some farmers for domestic consumption [9].

Namibia's Ministry of Agriculture, Water and Forestry developed four sorghum and seven cowpea varieties with 10–20% higher yield than local cultivars under drought conditions and pre-released to farmers. The new developed improved mutant varieties will be disseminated to more than 8000 farmers. Farmers are expected to be involved in seed multiplication, and therefore number of farmers and production area to be subsequently increased in the next years. The Ministry of Agriculture is facilitating seed multiplication for the 2020 and 2021-22 cropping seasons and planning to provide all potential cowpea growers in the country during the 2023 cropping season [29, 30].

Mauritius has released three high-yielding mutant varieties, namely Summer King, Summer Star and Rising Star. These varieties were distributed among farmers and seed multiplication continues to reach more farmers [7].

In the early 1990s, Sudan began to integrate mutation breeding methods for crop improvement. Successful breeding programs using nuclear techniques and plant biotechnologies were conducted to enhance productivity of cereals crops, banana, tomato and groundnuts under stress environment to ensure sustainable food security and well-being of farmers. The outcome of these efforts resulted in development of a banana variety 'Albeely' with high yield potential. 'Albeely' is widely cultivated by farmers in banana production areas along the Blue Nile in the south of Wad Medani [9]. A drought-tolerant peanut variety, 'Tafrá-1', was released in 2018 for Sudanese farmers in drought-prone areas, which improved their livelihoods and led to an increase in the country's exports [7,31].

CONCLUSIONS

Enhancing food security and availability of enough food is among the top priorities for most of the developing countries. The extensive application of mutagenesis in crop breeding programs all over the world has assisted the official registration of over 3 300 mutant varieties during the last 85 years. A large majority of released mutant varieties (including cereals, pulses, oil, root and tuber crops, and ornamentals) have been released in developing countries, resulting in positive economic impacts. Thus, plant mutation breeding is an efficient tool for preserving and enhancing global food security. Some highlights were presented in this paper showing that many mutant varieties are covered in Asia, Europe, Latin America and Africa. For example, in Peru, farming activities 3000 meters above sea level are very limited by the harsh conditions of the environment. The Cereal and Native Grains Research Program produced improved mutant barley and amaranth varieties thriving at up to 5000 m altitude, consequently providing Andean local farmers with more food, income and enhancing their quality of life. The mutant barley variety, Centenario II, occupies 18% of the dedicated barley growing area in Peru, through this, 15000 farmers profited from the release of this barley variety. Vietnams' mutation breeding program resulted in the releasing of several rice and soybean varieties contributing to national socio-economic impact. More than 4 million farmers in Vietnam are using rice varieties developed through mutation breeding. The success in soybean breeding is documented with occupation of 50% of the soybean area in Vietnam.

The Joint FAO-IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture has advanced the research, improvement and application of nuclear techniques in food and agriculture for the past 55 years. The success in the area shows the achievement of the Joint FAO-IAEA Division and the essential support given to the Member States. In the last decade, induced mutation has combined current biotechnologies, such as the use of doubled haploid technology, and application of molecular markers, which offers the breed of new varieties within a short space of time. Mutation breeding in combination with other technologies provides the fastest way to generate genetic diversity to develop suitable crops and their cultivars that can withstand all adverse stresses as a result of climate change and to ensure food security globally.

AUTHORS' CONTRIBUTION

Fatma Sarsu formal analyses, investigation, visualization, writing original draft- review and editing; Isaac Kofi Bimpong and Mr Ljupcho Jankuloski revised the article critically and contributed to the write up.

REFERENCES

- [1] Mba, C. (2013). Induced Mutations Unleash the Potentials of Plant Genetic Resources for Food and Agriculture, *Agronomy* 2013, 3, 200–231. Doi:10.3390/agronomy3010200, <https://www.mdpi.com/journal/agronomy>
- [2] Beddington, J., Asaduzzaman, M., Fernandez, A., Clark, M., Guillou, M., Jahn, M., Erda, L., Mamo, T., Van, Bo, N., Nobre, C., A., Scholes, R., Sharma, R., & Wakhungu, J. (2011). *Achieving Food Security in the Face of Climate Change: Summary for Policy Makers from the Commission on Sustainable Agriculture and Climate Change*. Copenhagen, Denmark: CGIAR Research Program on Climate Change, Agriculture and Food Security (CCAFS).
- [3] Sivasankar, S., Heng, L.H., & Kang, S. (2020). Agriculture: Improving Crop Production. Doi: 10.1016/B978-0-12-409548-9.12323-1
- [4] Spencer-Lopes, M.M., Forster, B.P., & Jankuloski, L. (2018). *Manual on Mutation Breeding* Third Edition, FAO.
- [5] Sarsu, F., Ghanim, A.M.A., Das, P., Bahuguna, R.N., Kusolwa, P.M., Ashraf, M., Singla-Pareek, S.L., Pareek, A., Forster, B.P., & Ingelbrecht, I. (2018). *Pre-Field Screening Protocols for Heat-Tolerant Mutants in Rice*, Springer.
- [6] Suprasanna, P., Mirajkar, S.J., & Jain, S.M. (2014). *Induced mutagenesis for improving plant abiotic stress tolerance*. Edited by N.B. Tomleková, M.I. Kozgar and M.R. Wani "Mutagenesis exploring genetic diversity of crops" Wageningen Academic Publisher.
- [7] FAO/IAEA Mutant Variety Database. Retrieve from: <https://mvd.iaea.org/>, consulted: 20 July 2020.
- [8] Ahloowalia, B.S., Maluszynski, M., & Nichterlein, K. (2004). Global Impact of mutation-derived varieties. *Euphytica* 135- 187-204.
- [9] Kharckwal, M.C. & Shu, Q.Y. (2009). *The role of Induced Mutations in World Food Security*. In: Shu, Q.Y. editor *Induced Plant Mutations in the Genomics Era*.
- [10] Luxiang, L., Xiong, H., Guo, H., Zhao, L., & Xie, Y. (2018). *New Mutation Techniques Applied in Crop Improvement in China*. FAO/IAEA International Symposium on Plant Mutation Breeding and Biotechnology, 27-31 August 2018, Vienna, Austria.
- [11] Souza, S.F., Reddy, K.S., Badigannavar, A.M., Manjay, J.G. & Jambhulkar, S.J. (2009). *Mutation Breeding in Oilseeds and Grain Legumes in India: Accomplishments and Socio-Economic Impact*. In: Shu, Q.Y. editor *Induced Plant Mutations in the Genomics Era*.
- [12] Nakagawa, H. (2018). *History of Mutation Breeding and Molecular Research Using Induced Mutations in Japan*. FAO/IAEA International Symposium on Plant Mutation Breeding and Biotechnology, 27-31 August 2018, Vienna, Austria.
- [13] NIAB. Retrieved from: <http://www.niab.org.pk/mutation.htm>. Consulted 20 July 2020.
- [14] Haq, M.A. (2009). *Development of Mutant Varieties of Crop Plants at NIAB and the Impact on Agricultural Production in Pakistan Proceedings*. In: Shu, Q. Y. editor *Induced Plant Mutations in the Genomics Era*.
- [15] Pathirana, R. (2011). Plant Mutation Breeding in Agriculture. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 6, No. 032.
- [16] Zakir, M. (2018). Mutation Breeding and its Application in Crop Improvement under Current Environmental Situations for Biotic and Abiotic Stresses, *International Journal of Research Studies in Agricultural Sciences (IJSAS)*. Volume 4, Issue 4, 1-10.
- [17] Yanev, A. (2006). Mutant Durum Wheat Varieties Developed in Bulgaria. *Plant Mutation Reports*, Vol. 1, No. 2.
- [18] Scarascia- Mugnoza, G.T., Amato, A.D. & Avanzi, S. (1991). *Mutation Breeding Programme for Durum Wheat (Triticum turgidum spp durum Desf)*. Proceedings of the Symposium on Plant Mutation Breeding for Crop Improvement, 18–22 June 1990, Vienna, Austria.
- [19] Rutger, J.N. (2009). FAO/IAEA International Symposium on Induced Plant Mutations in the Genomics Era. Proceedings. In: Shu, Q.Y. editor *Induced Plant Mutations in the Genomics Era*.
- [20] Livore, A.B., Landau, A. & Prina, A.R. (2018). *The Success of IMI Tolerant Rice Varieties in Latin America*. FAO/IAEA International Symposium on Plant Mutation Breeding and Biotechnology, 27-31 August 2018, Vienna, Austria.

- [21] Schiocchet, M. A., Noldin, J. A., Marschalek, R., Wickert E., Eberhardt, D.S., Knoblauch, R., Scheuermann, K. K., Raimondi, J. V., & Andrade, A. (2015). SCS121 CL: Rice cultivar resistant to herbicides of imidazolinone chemical group. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* vol.15 no.4. Doi: <https://doi.org/10.1590/198470332015v15n4c47>
- [22] Croughan, T., Utomo, H., Sanders, D., and Braverman, M. (1996). Herbicide-resistant rice offers potential solution to red rice problem. *Louisiana agriculture* 46, 24-26
- [23] Merotto, A., Goulart, I.G., Nunes, A., Kalsing, A., Markus, C., Menezes, V. and Wander, A. (2006). Evolutionary and social consequences of introgression of non -transgenic herbicide resistance from rice to weedy rice in Brazil. *Evolutionary appl.* 9. 837-846.
- [24] Singh, V., Zhou, S., Ganie, Z., Valverde, B., Avila, L., Marchesan, E., Merotto, A., Zorrilla, G., Burgos, N., and Norsworthy, J. (2017). *Rice Production in the Americas*. In "Rice Production Worldwide", pp. 137-168. Springer.
- [25] Gonzalez, M.C., Mukandama, J.P., Ali, M.M., Trujillo, D., Ferradaz, I. & Fuentes, J.L. (2008). Selection and Characterization of Tomato Mutants Tolerant to Low Water Supply. *Plant Mutation Reports*, 2(1): 27–32.
- [26] González-Cepero, M.C., Alonso, R.G., & Fernández, D.H. (2020). Girón 50, Nuevo Mutante de Tomate (*Solanum lycopersicon* L.) Tolerante a la Sequía y Altas Temperaturas. II Simposio Latinoamericano de Aplicaciones Nucleares en Agricultura, 56 March 2020, Quito, Ecuador.
- [27] Gomez-Pando, L., Eguiluz, A., Jimenez, J., Falconi, J., & Aguilar E.A. (2009). *Barley (Hordeum vulgare) and Kiwicha (Amaranthus caudatus) Improvement by Mutation Induction in Peru*. In: Shu, Q.Y. editor Induced Plant Mutations in the Genomics Era.
- [28] Gómez-Pando, L., Deza-Montoya, D. & Ibañez-Tremolada, M. (2020). Mejoramiento Genético de la Tolerancia al Calor de Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) Mediante Inducción de Mutaciones. II Simposio Latinoamericano de Aplicaciones Nucleares en Agricultura, 5–6 March 2020, Quito, Ecuador.
- [29] Horn, L.H., Shimelis, H.A., Sarsu, F., Mwadzingeni, L. & Laing, M.D. (2017). Genotype-by-environment Interaction for Grain Yield Among Novel Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) Selections Derived by Gamma Irradiation. *The Crop Journal*, 8. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.10.002>
- [30] FAO/IAEA Joint Division, Nuclear Techniques in Food and Agriculture Plant Breeding and Genetics Newsletter. Retrieved from: <https://www.iaea.org/publications/14740/plant-breeding-and-genetics-newsletter-no-45-july-2020> . Consulted August 2020.
- [31] Abdalla, E., Bakhit, O. & Elsheikh S. (2018). Groundnut Mutants with End-of-season Drought Tolerance for the Marginal Dry Lands of North Kordofan State, Sudan. FAO/IAEA International Symposium on Plant Mutation Breeding and Biotechnology, 27–31 August 2018, Vienna, Austria.

Induced mutations in crop plants: mutants of scientific and/or agronomic interest at the Institute of Genetics “Ewald A. Favret”

Alejandra Landau¹, Vanina Brizuela¹, Franco Lencina¹, Alicia Martínez¹, Mauricio Tcach², Daniel Díaz¹, María Gabriela Pacheco¹, Alberto R. Prina¹

¹Instituto de Genética “Ewald A. Favret” (IGEAF), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Buenos Aires, Argentina.

²INTA, Estación Experimental Agropecuaria Sáenz Peña, Chaco, Argentina.

*Autor para correspondencia/ Corresponding autor, e-mail: landau.alejandra@inta.gov.ar

Mutaciones inducidas en plantas cultivadas: mutantes de interés científico y/o agronómico en el Instituto de Genética “Ewald A. Favret”

Abstract

The use of induced mutations techniques in crop plants at the Institute of Genetics “Ewald A. Favret” (IGEAF) INTA, started in 1949, with the pioneer work of Ewald Favret, who studied the effects of physical and chemical mutagens on barley (*Hordeum vulgare*) and wheat (*Triticum aestivum*). IGEAF contributed with several novel results about the effects of important chemical mutagens such as ethyl methane sulfonate (EMS) and sodium azide, and their interactions with X-rays, on barley and wheat. During several decades, a good deal of the research was directed to study the relationship between the different effects of mutagenic treatments on the M¹ and subsequent generations, and its implications for efficient selection of induced mutants. Many original barley and wheat mutants have been isolated at IGEAF, which early on contributed to elucidate the genetic basis of characters like the hormonal control of growth, the grain protein content and diseases reactions. Besides, several other novel mutants were isolated and characterized including genetically unstable mutants, which are able to originate new heritable variability. One of these mutants is the barley chloroplast mutator (*cpm*) from which some interesting mutants have been isolated. Moreover, a high throughput strategy for the screening of plastome mutants originated by the *cpm* was developed (cpTILLING) that allowed the detection of 61 different mutational events, showing the *cpm* as an extraordinary source of plastome mutants. Furthermore, a mutant allele of the *ahas* (acetolactate synthase) gene in wheat conferring imidazolinones herbicides tolerance, was isolated. The incorporation of this allele to other genetic backgrounds showed increased levels of tolerance, which in one family were observed in association with increased Fusarium tolerance. In addition to the work done in barley and wheat, interactions with several breeding programs in other crops were carried out. Finally, some commercial achievements of INTA obtained by using induced mutations techniques are briefly described; being the most important the case of the INTA rice (*Oryza sativa*) breeding program for developing imidazolinones tolerant commercial varieties that in recent years covered 70% of the irrigated rice area in Latin America.

Editado por /
Edited by:
Gabriela Albán

Recibido /
Received:
10/08/2020

Aceptado /
Accepted:
04/11/2020

Publicado en línea /
Published online:
01/04/2021

Keywords: Barley mutant, Cotton mutant, Herbicide tolerance, Induced mutations, Mutator genes, Rice mutant, Wheat mutant.

Resumen

El uso de técnicas de mutaciones inducidas en plantas en el Instituto de Genética “Ewald A. Favret” (IGEAF) INTA, se inició en 1949, con el trabajo pionero de Ewald Favret, quien estudió los efectos de mutágenos físicos y químicos en cebada (*Hordeum vulgare*) y trigo (*Triticum aestivum*). El IGEAF contribuyó con varios resultados novedosos sobre los efectos de importantes mutágenos químicos como el metanosulfonato de etilo (EMS) y la azida sódica, y sus interacciones con los rayos X, en la cebada y el trigo. Durante varias décadas, gran parte de la investigación se dirigió a estudiar la relación entre los diferentes efectos de los tratamientos mutagénicos en la M_1 y las generaciones posteriores, y sus implicaciones para la selección eficiente de mutantes inducidos. En el IGEAF se han aislado muchos mutantes originales de cebada y trigo, que desde el principio contribuyeron a interpretar la base genética de caracteres, como el control hormonal del crecimiento, el contenido de proteína del grano y las reacciones a enfermedades. Además, se aislaron y caracterizaron varios otros mutantes nuevos, incluidos mutantes genéticamente inestables, que son capaces de originar una nueva variabilidad heredable. Uno de estos mutantes es el mutador de cloroplastos de la cebada (*cpm*) del que se han aislado algunos mutantes interesantes. Además, se desarrolló una estrategia de alto rendimiento para la búsqueda de mutantes de cloroplasto originados por *cpm* (cpTILLING) que permitió la detección de 61 eventos mutacionales diferentes, mostrando a *cpm* como una fuente extraordinaria de mutantes de cloroplasto. Además, se aisló un alelo mutante del gen *ahas* (acetolactato sintasa) en trigo que confiere tolerancia a herbicidas imidazolinonas. La incorporación de este alelo a otros acervos genéticos, mostró mayores niveles de tolerancia, que en una familia se observaron en asociación con una mayor tolerancia a *Fusarium*. Además del trabajo realizado en cebada y trigo, se realizaron interacciones con varios programas de mejoramiento en otros cultivos. Finalmente, se describen brevemente algunos logros comerciales de INTA obtenidos mediante el uso de técnicas de mutaciones inducidas; siendo el caso más importante el del programa de mejoramiento del arroz INTA (*Oryza sativa*) para el desarrollo de variedades comerciales tolerantes a imidazolinonas, que en los últimos años cubrió el 70% de la superficie arrocería irrigada en América Latina.

Palabras clave: Genes mutadores, Mutante de algodón, Mutante de arroz, Mutante de cebada, Mutaciones inducidas, Mutante de trigo, Tolerancia a herbicidas.

INTRODUCTION

Spontaneous mutations, have facilitated the domestication of several crops, such as, the abolishment of bitterness and toxicity in almonds, and the loss of natural seed dispersal mechanism in peas, barley, wheat, etc. [1]. The concept of mutations in living organisms was established at the beginnings of the last century by Hugo de Vries to designate drastic



inheritable changes occasionally occurring in nature. Interestingly, back then de Vries proposed that the rate of spontaneous mutations could be artificially augmented and even be useful in breeding. Indeed, in the 20s, Stadler proved the genetic effects of ionizing radiations on several cultivated plants (barley, maize, wheat and oat) and developed the basis of the experimental mutagenesis in plants. The first commercial success came in 1936 with the release of the first cultivar obtained by using X-rays treatments on tobacco [2, 3, 4].

Since then, these techniques have been used for plant breeding and basic research in many crops either with chemical or physical mutagens. Nowadays, there are more than 3,200 mutant cultivars officially released in more than 220 crops worldwide (<https://mvd.iaea.org/>). In this review, we summarize the most important achievements regarding induced mutants in different crops obtained within the Institute of Genetics and in collaboration with other breeding programs of INTA.

INDUCED MUTATIONS BACKGROUND AT INSTITUTE OF GENETICS "EWALD A. FAVRET" (IGEAF)

Investigations about induced mutations techniques in crop plants at IGEAF started as early as 1949 by Ewald A. Favret. The institute played a pioneer work in Latin America, contributing with several novel results about the effects of important chemical mutagens such as ethyl methane sulfonate (EMS) and sodium azide and their interactions with X-rays on barley and wheat [5, 6, 7, 8, 9, 10]. During several decades, a good deal of investigations was focused on the study of the relationship between the different effects of mutagenic treatments on the M_1 and subsequent generations, and its implications for an efficient selection of induced mutants [3, 4, 11]. From a huge amount of mutagenic treatments many original barley and wheat mutants have been isolated at IGEAF that early on contributed to elucidate the genetic basis of characters like the hormonal control of growth [12], the grain protein content [13], and diseases reactions [6, 14, 15]. In the last decades, several other novel mutants were isolated at IGEAF, which are still under investigation. Some of them are described below.

MUTANTS OF SCIENTIFIC AND OR BREEDING INTEREST

1) DNI (Diverse Number of Internodes) barley mutant

This mutant was isolated after combined treatments of X-rays and sodium azide and it is characterized by showing an extremely high variation in internode numbers among plants and also among different tillers of the same plant, thus it was named DNI. When DNI plants were grown at the field nursery the proportions between normal and multinoded tillers depended on the sowing date. Interestingly, under diverse environmental conditions, the mutant showed several other abnormalities such as, multibranching culms and stolonifer habit, hair like organs emerging from the coleoptile, tillers notably retarding leaf senescence and spikes showing vegetative sectors together with normal ones (see Fig. 1). The gene responsible for DNI phenotype is not known yet; it is hypothesized that it is involved in a very basic mechanism in charge of the establishment and maintenance of meristem identity [16].



FIGURE 1. DNI barley mutant. A. Plant harvested at the field nursery showing normal tillers carrying mature spikes (yellow arrow) together with multinoded ones (red arrow) carrying vegetative tops with notably retarded leaves senescence. B: DNI (left) and a wild type barley plant (right) grown at greenhouse during winter (short days) and room temperature. DNI mutant shows multibranching culms and stolonifer habit. C. DNI spikes showing vegetative sectors together with normal spikelets, some of them can give normal seeds with germination ability. D. Top with intermediate characteristics between spikelets and leaves. E. Stolonifer habit in a tiller of DNI plant. F. Hair like organ emerging from the coleoptile of a DNI seedling.

2) Barley mutant with roots lacking tropic response to submergence

This mutant was identified when grown in hydroponics [17] by the sandwich method [18]. In those particular conditions, mutant roots did not show the growth pattern with windings and turnings usually observed in wild type barley roots before they submerged (Fig. 2). It was determined that this root behavior is controlled by a semi-dominant nuclear gene [17] and that ethylene produced by mutant roots was significantly lower compared to that of wild type roots when grown in the sandwich method [17, 19]. On the other hand, when grown in humid chambers, where roots grew freely without any physical contact, wild type and mutant roots were morphologically similar and they also had a similar ethylene production [19].



FIGURE 2. Barley mutant with roots lacking tropic response to submergence. A. Wild type seedlings with roots showing the typical pattern with windings and turnings usually observed when grown in hydroponics by the sandwich method. B. Mutant seedlings lacking tropic response to submergence. C. F_1 seedlings showing an intermediate root phenotype.

3) The barley chloroplast mutator mutant (*cpm*)

The mutator genotype *cpm* was detected in a family at the M_4 generation coming from a combined treatment of X-rays and sodium azide applied on barley seeds. The breeding behavior of the *cpm* was first described by Prina [20, 21] based on the frequencies of chlorophyll deficiencies, mostly clonally-variegated, observed in seedlings coming from crosses and backcrosses of the *cpm* with the wild type parental genotype. The *cpm* originated a wide spectrum of cytoplasmically-inherited chlorophyll deficiencies (Fig. 3). When a *cpm* plant is crossed as a father with a wild type plant, as plastids are 100% inherited through the ovule in barley, F_1 plants are supposed to carry only wild type plastids. As it was expected, F_1 plants did not show any chlorophyll deficiencies as evidences of genetic instability. However, chlorophyll deficient narrow streaks appeared in a few seedlings of the F_2 generation, and the frequencies of clonally-variegated seedlings increased in the subsequent generations of natural self-pollination [20]. On the other hand, when a plastome mutant is wanted to be genetically stable, the action of the *cpm* can be stopped using wild type pollen to pollinate the selected plastome mutant and then, in F_2 and subsequent generations, selecting plants and families showing solid mutant phenotypes of the selected plastome mutant. The genetically stable plastome mutants achieved in this way were called cytoplasmic lines (CLs), three of which are described below.

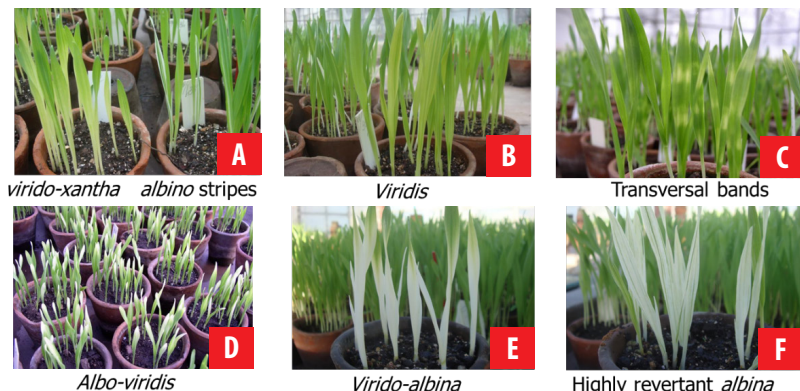


FIGURE 3. The chloroplast mutator mutant (*cpm*). Some of the chlorophyll deficient phenotypes isolated from *cpm* plants: A) Virido-xantha seedlings on the left and albino striped seedlings on the right. B) Viridis seedlings. C) Transversal banded seedlings. D) Albo-viridis seedlings. E) Virido-albino seedlings. F) Highly revertant albino seedlings.

3.1) CL2 mutant

CL2 shows an *albo viridis* phenotype (Fig. 4), explained as a consequence of a delay in plastid protein synthesis during embryogenesis [22]. The *infA* gene, which encodes IF1 protein (translation initiation factor 1), was proposed as a candidate gene responsible for CL2 phenotype. When it was sequenced, a missense mutation (T 157 C) was found corresponding to a Ser 52 Pro change in the protein. Other two plastome mutants, showing a similar phenotype to CL2 and independently originated from the original CL2 were isolated (CL2-like 1 and -2). Interestingly, CL2-like 1 also carried a mutation in the *infA* gene, a T 97 C transition corresponding to a Phe 32 Leu change in the protein [23], while CL2-like 2 presented another different change at the DNA level (A 185 G), corresponding to a change of Asp 61 Gly at IF1 protein. In another experiment, plants of the original genetically stable CL2 mutant were pollinated with *cpm* pollen, looking for reestablishing the *cpm* mutation effect on CL2 mutant plastids, which was assumed could be assessed through observing reversions to the wild type color of the CL2 phenotype. One seedling carrying a darker green stripe in the first leaf on a CL2 mutant phenotype background was found and when the *infA* gene was sequenced, the original CL2 mutation was found plus another missense transition (A 178 G/Met 59 Val) that was interpreted as having a compensation effect on the phenotypic expression of the original CL2 mutant allele [24]. All the above-mentioned results strongly support the relationship between the CL2 phenotype and mutations in the *infA* gene. It is also worth mentioning that these mutants were the first *infA* gene mutants described in higher plants.



C	Mutant	DNA change	Amino acid change
	CL 2	T 157 C	Ser 52 Pro
	CL2-like 1	T 97 C	Phe 32 Leu
	CL2-like 2	A 185 G	Asp 61 Gly
	Double mutant with compensatory effect	T 157 C + A 178 G	Ser 52 Pro + Met 59 Val

FIGURE 4. CL2 mutant. A. On the left, wild type barley, on the right the CL2 mutant showing the *albo viridis* phenotype. B. CL2 seedling showing a phenotypic reversion when carrying the *cpm*. C. Table showing other *infA* gene polymorphisms isolated by direct selection of CL2 phenotype reversions independently originated from the CL2 original mutant.



3.2) CL3 mutant

CL3 seedlings were characterized by a homogeneous light green (*viridis*) phenotype that expressed differentially depending on the temperature (Fig. 5). After several physiological and biochemical analyses, it was concluded that the photosystem I (PSI) was affected but, none of the plastid PSI proteins were altered. However, when *ycf3* and *ycf4* plastid genes, encoding two chaperones involved in PSI assembly, were sequenced, two mutations were found in intron 1 of *ycf3* gene, which affected splicing of this intron at high temperature, and the chaperone encoded by *ycf3* was missing. It was concluded that the lack of YCF3 protein during the assembly of PSI at high temperature is the cause of CL3 phenotype [25].

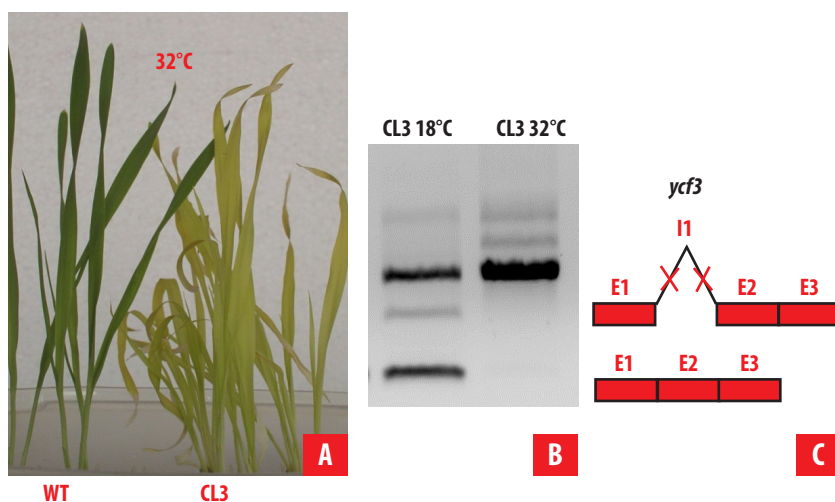


FIGURE 5. CL3 mutant. A. On the left wild type seedlings, on the right, CL3 seedlings growing at 32°C. B. RT-PCR of *ycf3* transcripts at normal and high temperature. C. scheme representing the different transcripts observed in the RT-PCR for CL3 seedlings grown at higher (H) or at low (L) temperatures. The red crosses symbolize the point mutations found in intron 1 (I1) of CL3 that avoid the splicing of I1 under higher temperatures. E: exon, I: intron.

3.3) *psbA* gene mutant

This mutant was isolated by treating a population carrying the *cpm* genotype with atrazine, an herbicide toxic for photosystem II (PSII). It was determined that this tolerant mutant carried a mutation in the *psbA* gene, as it was previously observed to confer atrazine tolerance in several other plant species [26]. The *psbA* gene encodes D1 protein and atrazine binds to the wild type version of this protein blocking photosynthesis. In field trials this mutant was observed not affected by 8X the recommended dose of atrazine constituting a promising experimental material for developing atrazine tolerant varieties (Fig. 6).



FIGURE 6. *psbA* gene mutant. A. Wild type plants without atrazine. B. Wild type plants with 8X atrazine. C. *psbA* mutant with 8X atrazine.

3.4) cpTILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes): a high throughput screening strategy for isolation of plastome mutants originated by *cpm*

The mutants described above were isolated by direct selection based on the phenotype, however, a TILLING strategy was adapted to the chloroplast genome for isolating plastome mutants in *cpm* populations. TILLING is a reverse genetics high throughput strategy that is very successful for screening nuclear gene mutants of interest in a mutagenized population [27, 28]. For cpTILLING, 31 PCR amplicons were designed comprising 33 genes to analyze 304 *cpm* seedlings that carried the *cpm* during different number of generations. At least 61 different mutational events were detected; most of them were transitions and mono nucleotide indels [29]. This strategy also allowed the discovery of a high frequency of seedlings carrying different combinations of five polymorphisms, which already exist in nature, between the *rpl23* gene and its pseudogene, which are postulated to originate in an increased rate of illegitimate recombination between these two loci [30]. All the results suggest that the failure of the *cpm* gene corresponds to a malfunction of a mismatch repair (MMR) gene involved in maintaining the stability of the plastome and that the *cpm* mutant constitutes an exceptional experimental material to obtain genetic variability in the otherwise highly conserved plastid genome. Cytoplasmic genomes, *i.e.* those residing in the chloroplast and the mitochondrion, are ruled out by modes of inheritance different than those of the nuclear genome, consequently, the appropriated methodologies for mutation induction and mutants isolation need to be adapted to those circumstances [31].

4) Two cotton (*Gossypium hirsutum*) mutants of agronomic interest.

In a joint work with the INTA cotton breeding program, located in EEA INTA Sáenz Peña (Chaco Province), a mutant tolerant to imidazolinones was isolated in the M_2 generation after a sodium azide mutagenic treatment. Selection was made by applying a solution of imazapir+imazamox (Clearsol Plus BASF). The tolerance was confirmed in subsequent generations indicating it was given by a nuclear gene with semi-dominant expression. The herbicide tolerance was observed to be better expressed after pre-emergence applications, indicating that this mutant would be especially useful in this condition [32]. It was recently determined that the imidazolinone tolerant mutant carries a point mutation in the AHAS gene. Another interesting cotton mutant with pyramidal morphology was isolated after a sodium azide mutagenic treatment. Selection was made on M_2 plants grown in glasshouse conditions and later on confirmed in subsequent generations grown at field conditions. The pyramidal morphology is proposed as very useful for narrow furrow harvest (Fig. 7) [33].



Radius = (46.6 ± 4.17) cm
Angle = $(62.0 \pm 1.25)^\circ$

C



Radius = (24.3 ± 2.41) cm
Angle = $(46.8 \pm 2.07)^\circ$



FIGURE 7. Cotton mutant with pyramidal morphology. Cotton plants grown at the greenhouse: A. Wild type. B. Pyramidal mutant showing a much shorter peduncle. C. Schemes of cotton plants after growing in the field nursery: Wild type (left) and pyramidal mutant (right). D. Two mutant plants (left) and a wild type plant (right).

5) A wheat (*Triticum aestivum*) mutant tolerant to imidazolinones

The search for tolerance to imidazolinone herbicides in wheat was started to cover the need for the development of wheat cultivars tolerant to herbicides with good graminicide characteristics to be used in the South East of Buenos Aires Province. A

mutant with tolerance to imidazolinones was isolated from approximately 200,000 M_2 seeds of Prointa Elite cv. germinated in a solution of the herbicide. It is well known in bread wheat that carrying *ahas* mutant alleles in only one of the three genomes, even though it is being used in some commercial cultivars, it gives a somewhat weak level of tolerance. Therefore, most of the imidazolinone tolerant bread wheat commercial varieties carry *ahas* mutant alleles in two of the three genomes, however, this is associated with a higher fitness cost for the plant. Through cross breeding and backcrosses with several commercial varieties, and selection for increased tolerance to imidazolinones, the tolerance level was increased and moreover, the yield and vigor in three of these families were also increased. Besides, in one of these genetic backgrounds yellow rust and Fusarium tolerance were improved, while in other it was observed a better behavior under high temperature conditions (Fig. 8).

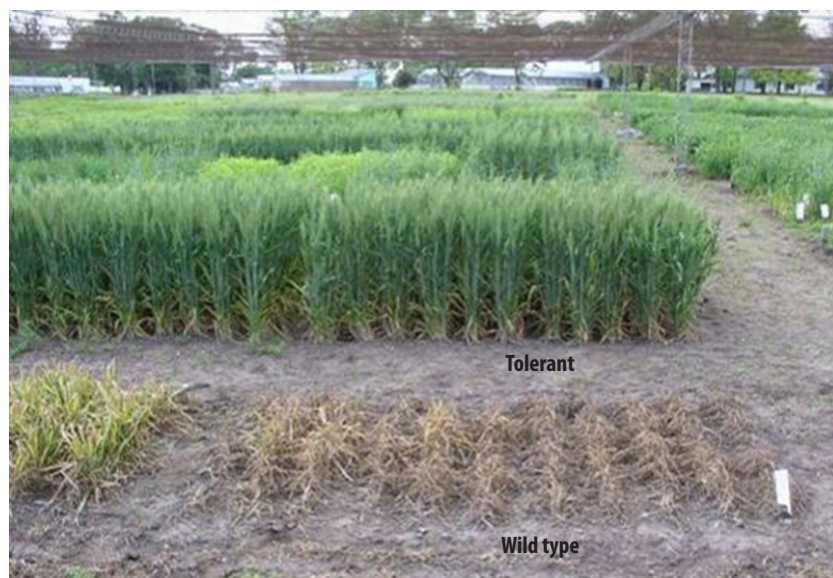


FIGURE 8. A wheat mutant tolerant to imidazolinones. The mutant and wild type plants were treated with 2X the recommended dose of imazapir solution.

INTA COMMERCIAL ACHIEVEMENTS BY MUTATION BREEDING

The first commercial achievement was obtained in peanut, the mutant variety was named *Colorado Irradiado* and it came from X-rays irradiated seeds, in a joint work between the IGEAF and EEA INTA Manfredi (Córdoba Province). This mutant was released in 1972 and was characterized for having a high yield and a higher number of fruits. Besides, it was resistant to *Cercospora Spp* and had a higher oil content. In the 1970s, more than 80% of the peanut cultivated area in Argentina (280,000 ha) was occupied by *Colorado Irradiado* mutant [34] (<https://mvd.iaea.org/#!/Variety/144>).



Other commercial achievements were the lemon (*Citrus limon*) cv *Eureka 22 INTA*, released in 1987, which had a higher fruit set, and the orange (*Citrus sinensis*) cv *Valencia 2 INTA*. These mutants were obtained in a joint work between IGEAF and EEA INTA Bella Vista (Corrientes Province).

The biggest commercial success was obtained with the rice mutant *Puitá-INTA-CL*, which was released in Argentina in 2005. This mutant, which is tolerant to imidazolinones, was obtained in a joint work of the INTA rice breeding program led by Dr. Alberto Livore and located in INTA Concepción, Uruguay (Entre Ríos Province) and IGEAF. Imidazolinones are commonly used herbicides that control a wide spectrum of weeds including the red rice, the most important weed constrain for cultivating rice. After a sodium azide treatment on seeds of three cultivars *i.e.* El Paso 144, IRGA 417 and Don Juan, and selection in M_2 on around six million plants with a mix of imidazolinones, five different alleles of the *ahas* (acetolactate synthase) gene were isolated and two of them were patented [35, 36]. Three of these mutations were not known in rice. The allele *iminta 4* (Ala 122 Thr) was used to obtain the first imidazolinone tolerant variety in Argentina. This generated a commercial agreement with BASF company under the Clear Field technology. Afterwards, three more high yield and quality varieties were released in Argentina, *i.e.* Guri INTA CL in 2011, Ñu Poty INTA CL in 2013 and Memby Pora INTA CL in 2017. Nowadays, the area sown with imidazolinone tolerant INTA rice varieties in Argentina is around 40% (100 000 ha) and in Brazil, the main rice producer in Latin America, rice varieties carrying the *iminta 4* allele, covered more than 800,000 h per year. Varieties carrying *iminta 4* allele are also sown in Uruguay, Colombia, Chile, Costa Rica, Panamá, Dominican Republic, Nicaragua, and Honduras. During the 2016/2017 and 2017/2018 campaigns, these varieties covered approximately 70% of the irrigated area in Latin America. In Europe, varieties carrying the *iminta 4* allele were released in Italy, Greece, Romania, and Portugal.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Mr. Abel Mario Moglie and Mr. José Cuello for skillful handling of the plant material. The work of all these years was supported by several Research Contracts and ARCAL projects of the International Atomic Energy Agency; PICTs and PICTOS of the Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica/Argentina and research projects of INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria/Argentina).

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Alejandra Landau conceived, developed and performed the investigations about cpTILLING, CL2 and CL3 mutant, and sequenced the *ahas* gene of the cotton mutant; Vanina Brizuela and Daniel Díaz performed the experiments and carried out the greenhouse and field observations about the wheat mutants tolerant to imidazolinones and the atrazine tolerant barley mutant; Franco Lencina performed the investigations about cpTILLING; Alicia Martínez conceived, developed and performed the investigations about the barley mutant with roots lacking tropic response to submergence; Mauricio

Tcach and Daniel Díaz conceived, developed and performed the investigations about cotton mutants; María Gabriela Pacheco conceived the investigations about cpTILLING and sequenced the AHAS gene of the wheat mutant; Alberto Prina conceived all the investigations, developed the experimental materials and supervised the greenhouse and field experiments. Alejandra Landau and Alberto Prina wrote the manuscript.

REFERENCES

- [1] Mba, C. (2013). Induced mutations unleash the potentials of plant genetic resources for food and agriculture. *Agronomy*, 3, 200–231. DOI: 10.3390/agronomy3010200
- [2] Prakken, R. (1959). Induced Mutation. *Euphytica*, 8, 270–322. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00039371>
- [3] Prina, A. R. (1989). Consideraciones sobre la aplicación eficiente de la mutagénesis inducida en fitomejoramiento. *Mendeliana*, 9, 3–48.
- [4] Prina, A. R., Landau, A. M., Pacheco, M. G., & Hopp, H. E. (2010). Mutagénesis, TILLING y EcoTILLING. En G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp y L. Mroginski (Eds), *Biotechnología y Mejoramiento Vegetal II*. Argenbio-INTA. <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/BiotechnologiaYMejoramientoVegetalII.pdf>
- [5] Favret, E. A. (1960). Somatic mutations of four genes for albinism in barley induced by X-rays and ethyl methane-sulphonate. *Hereditas*, 46 (3-4), 622–634. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1960.tb03105.x>
- [6] Favret, E. A. (1960). Spontaneous and induced mutations of barley for the reaction to mildew. *Hereditas*, 46, 20–28. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1960.tb03077.x>
- [7] Favret, E. A. (1964). Genetic effects of single and combined treatment of ionizing radiations and ethyl methane-sulphonate on barley seeds. In: *Barley Genetics I. Proceedings of the First International Barley Genetics Symposium*, Wageningen. Holland. Proc. Wagenungen PUDOC p. 68–81.
- [8] Prina, A. R. & Favret, E. A. (1983). Parabolic effect in sodium azide mutagenesis in barley. *Hereditas*, 98, 89–94. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1983.tb00583.x>
- [9] Prina, A. R. & Favret, E. A. (1983). Influence of potassium cyanide on the azide mutagenesis in barley. *Hereditas*, 98, 253–258. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1983.tb00603.x>
- [10] Prina, A. R., Hagberg, A. & Favret, E. A. (1986). Inheritable sterility induced by X-rays and sodium azide in barley. *Genética Agraria*, 40, 309–320. https://www.researchgate.net/publication/282255023_Inheritable_sterility_induced_by_X-rays_and_sodium_azide_in_barley
- [11] Prina, A. R., Landau, A. M., & Pacheco, M. G. (2012). Chimeras and Mutant Gene Transmisión. In: Q.S. Shu, B. P. Forster & H. Nakagawa (Eds), *Plant Mutation Breeding and Biotechnology*. FAO/IAEA, International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria (ISBN 978-1-78064-085-3) pp 181-189. <http://www.fao.org/3/a-i2388e.pdf>
- [12] Martínez, A. H., & Favret, E. A. (1990). Anthocyanin synthesis and lengthening in the first leaf of barley isogenic lines. *Plant Science*, 71(1), 35–43. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(90\)90066-W](https://doi.org/10.1016/0168-9452(90)90066-W)
- [13] Favret, E. A., Manghers, L., Solari, R., Avila, A., Monesiglio, J. C. (1970). Gene control of protein production in cereal seeds. *Conference paper: Improving plant protein by nuclear techniques. Proceedings of a symposium*, Vienna. Jointly organized by the IAEA and FAO. pp.87–97. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19711604439>
- [14] Favret, E. A. (1965). *Induced mutations in breeding for disease resistance. The use of induced mutations in plant breeding*. Report of the meeting organised by the FAO/IAEA, 25th may-1st June 1964. Roma. Pergamon. Oxford. GB pp. 521–536.
- [15] Favret, E. A., Saione, H., Franzone, P. M., Arias, M. C., Solari, R. M. & Lind, V. (1983). Disease reaction mutagenesis in barley and wheat. In: *Induced Mutations for Disease resistance in Crop Plants*. STI/PUB/633, IAEA, Vienna pp. 53–63.
- [16] Prina, A. R. (1995). A developmental barley mutant with temperature conditioned expression and vegetative and sexual reproduction. In: *Induced Mutations and Molecular Techniques for Crop Improvement, Proceedings of a symposium*, Vienna, 19-23 June 1995, jointly organized by IAEA and FAO, pp 633-634
- [17] Martínez, A. E., Franzone, P. M., Aguinaga, A., Polenta, G., Murray, R. & Prina, A. R. (2004). A nuclear gene controlling seminal root growth response to hydroponic cultivation in barley. *Environmental and Experimental Botany*, 51, 133–144. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2003.09.001>
- [18] Myhill, R. R. & Konzak, C.F. (1967). A new technique for culturing and measuring barley seedlings. *Crop Science*, 7, 275–277. <https://doi.org/10.2135/cropsci1967.0011183X000700030038x>
- [19] Martínez, A.E., Landau, A., García, P. T., Polenta, G., Arias, M. C., Murray, R., Pensel, N. & Prina, A. R. (2005). Two mutants affecting adaptative responses to abiotic stresses in barley seedlings. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 41(1), 1–10. <https://www.agriculturejournals.cz/web/cjgpb.htm?type=issue&volume=41&issue=No1>

- [20] Prina, A. R. (1992). A mutator nuclear gene inducing a wide spectrum of cytoplasmically inherited chlorophyll deficiencies in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 85, 245–251. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00222866>
- [21] Prina, A. R. (1996). Mutator-induced cytoplasmic mutants in barley: genetic evidence of activation of a putative chloroplast transposon. *Journal of Heredity*, 87, 385–389. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a023020>
- [22] Prina, A. R., Arias, M. C., Lainez, V., Landau, A. & Maldonado, S. (2003). A cytoplasmically inherited mutant controlling early chloroplast development in barley seedlings. *Theoretical and Applied Genetics*, 107, 1410–1418. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1391-0>
- [23] Landau, A., Díaz Paleo, A., Civitillo, R., Jaureguiualzo M., & Prina, A. R. (2007). Two infA gene mutations independently originated from a mutator genotype in barley. *Journal of Heredity*, 98(3), 272–276. <https://doi.org/10.1093/jhered/esm014>
- [24] Landau, A. M., Pacheco, M. G., & Prina, A. R. (2011). A second infA plastid gene point mutation shows a compensatory effect on the expression of the cytoplasmic line 2 (CL2) syndrome in barley. *Journal of Heredity*, 102(5), 633–639. <https://doi.org/10.1093/jhered/esr061>
- [25] Landau, A. M., Lokstein, H., Scheller, H. V., Lainez, V., Maldonado, S., & Prina, A.R. (2009). A cytoplasmically inherited barley mutant is defective in photosystem I assembly due to a temperature-sensitive defect in ycf3 splicing. *Plant Physiology*, 151, 1802–1811. <https://doi.org/10.1104/pp.109.147843>
- [26] Ríos, R.D., Saione, H., Robredo, C., Acevedo, A., Colombo, N., & Prina, A.R. (2003). Isolation and molecular characterization of atrazine tolerant barley mutants. *Theoretical and Applied Genetics*, 106, 696–702. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1119-6>
- [27] McCallum, C.M., Comai, L., Greene, E.A., & Henikoff, S. (2000). Targeting Induced Local Lesions In Genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiology*, 123, 439–442. <https://doi.org/10.1104/pp.123.2.439>
- [28] Colbert, T., Till, B.J., Tompa, R., Reynolds, S., Steine, M.N., Yeung, A.T., McCallum, C.M., Greene, E.A., Comai, L., & Henikoff, S. (2001). High throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiology*, 126, 480–484. <https://doi.org/10.1104/pp.126.2.480>
- [29] Landau, A., Lencina, F., Pacheco, M. G., & Prina, A. R. (2016). Plastome mutations and recombination events in barley chloroplast mutator seedlings. *Journal of Heredity*, 107(3), 266–273. <https://doi.org/10.1093/jhered/esw003>
- [30] Lencina, F., Landau, A. M., Petterson, M. E., Pacheco, M. G., Kobayashi, K., & Prina, A. R. (2019). The *rpl23* gene and pseudogene are hotspots of illegitimate recombination in barley chloroplast mutator seedlings. *Scientific Reports*, 9:9960. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46321-6>
- [31] Prina, A. R., Pacheco, M. G., & Landau, A. M. (2012) Mutation Induction in Cytoplasmic Genomes. In: Q.S. Shu, B. P. Forster & H. Nakagawa (Eds), *Plant Mutation Breeding and Biotechnology*. FAO/IAEA, International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria (ISBN 978-1-78064-085-3) pp 203-208. <http://www.fao.org/3/a-i2388e.pdf>
- [32] Tcach, M. A., Díaz, D. G., Martínez, A. E., Brizuela, V. E., Acuña, C., & Prina, A. R. (2018). Caracterización de una nueva fuente de tolerancia a imidazolinonas en algodón *Gossypium hirsutum* obtenida mediante inducción de mutaciones. 1º Congreso Internacional de Algodón, 27/10/17, Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco, Argentina. <https://inta.gob.ar/documentos/caracterizacion-de-una-nueva-fuente-de-tolerancia-a-imidazolinonas-en-algodon>
- [33] Diaz, D. G., Tcach, M., Peterlin, O., Mondino, M., & Prina, A. R. (2011). Selección de líneas de algodón con fructificación agrupada en progenies obtenidas a partir de mutaciones inducidas en Guazuncho 2 INTA. En: *Ciencia y Tecnología de los Cultivos Industriales* 1 (2) :124-127.
- [34] Kharkwal, M. C., & Shu, Q. Y. (2009). The Role of Induced Mutations in World Food Security. In: Q.Y. Shu (Ed), *Induced Plant Mutations in the Genomes Era*. FAO/IAEA, Rome, Italy. (ISBN 978-92-5-106324-8) pp 33-38. <https://mvd.iaea.org/PDF/IPM200901.pdf>
- [35] Livore, A. B., Prina, A. R., Singh, B. K., Ascenzi, R., & Whitt, S. R. (2010). *Herbicide-resistant rice plants, polynucleotides encoding herbicide-resistant acetohydroxyacid synthase large subunit proteins, and methods of use*. United States Patent application publication. <https://patents.justia.com/inventor/alberto-livore>
- [36] Livore, A. B., Prina, A. R., Birk, I., & Singh, B. (2011). Rice plants having increased tolerance to imidazolinone herbicides. European patent application. <https://patents.justia.com/inventor/alberto-livore>

Aplicación de rayos X para la obtención de mutantes ornamentales en *Salvia coccinea*

Verónica Bugallo^{1,2}, Gabriela Facciuto², Vanina Brizuela³, Alberto Prina³, Mariana Pérez de la Torre², Alejandra Landau³

¹ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

² Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Floricultura., Buenos Aires, Argentina.

³ Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Genética "Ewald A. Favret", Buenos Aires, Argentina.

*Autor para correspondencia/ Corresponding autor, e-mail: bugallo@agro.uba.ar

X-rays treatments to obtain ornamental mutants in *Salvia coccinea*

Resumen

El género *Salvia* posee gran valor ornamental, numerosas variedades en el mercado mundial y cuenta con alrededor de 900 especies, 19 de las cuales son nativas de Argentina. *Salvia coccinea* es una de la especies argentinas con mayor potencial ya que posee gran rusticidad, vigor y flores muy vistosas de un color rojo intenso. Sin embargo, al abordar el mejoramiento en esta especie, los problemas que se presentan son la dificultad para la hibridación interespecífica y la escasa variación fenotípica que expresa la especie. Para aumentar la variabilidad genética en programas de mejoramiento de plantas ornamentales, la aplicación de técnicas de inducción de mutaciones es ideal ya que puede modificar características de las flores, del follaje, del hábito de crecimiento y de variables fisiológicas. Con el objetivo de obtener variabilidad genética para la obtención de plantas ornamentales de *S. coccinea*, se aplicaron rayos X a semillas de un genotipo selecto con dosis de 100 a 600 Gy. Para evaluar el efecto producido, se estimó el área de los cotiledones por medio del análisis fotográfico, se calculó la dosis letal media (DL50) en la supervivencia de las plantas y se evaluaron los fenotipos obtenidos. La expansión de los cotiledones fue afectada en todos los tratamientos con aplicación de rayos X, mostrando un área menor que en el tratamiento control. La DL50 se estimó por regresión lineal, resultando en un valor de irradiación de 312 Gy. Entre los fenotipos mutantes se observaron deformaciones foliares, alteraciones en la pigmentación de las hojas (variegación, albinismo) y torsión en tallos. La selección de nuevas variedades se orientará a la obtención de plantas compactas, variegación de las hojas, novedades en forma y color de flores y esterilidad.

Palabras clave: DL50, Inducción de mutaciones, Mejoramiento genético, Plantas nativas, Plantas ornamentales.



Editado por /
Edited by:
Gabriela Albán

Recibido /
Received:
7/08/2020

Aceptado /
Accepted:
24/10/2020

Publicado en línea /
Published online:
01/04/2021

Abstract

The *Salvia* genus has great ornamental value, with numerous varieties on the world market. Around 900 species correspond to this genus, 19 of which are native to Argentina. *Salvia coccinea* is one of the Argentinean species with the greatest potential since it has great rusticity, vigor and very showy flowers of an intense red color. However, breeding in this species has two major constrains: a low variability and a difficult interspecific hybridization. To increase genetic variability in ornamental plants, mutation induction techniques are specially appropriated since they have great chances to modify characteristics of flowers, foliage, growth habit and physiological variables keeping unchanged most of the genetic background. In order to evaluate X-rays effects in *S. coccinea*, X-rays treatments were applied to seeds of a selected genotype in doses of 100 to 600 Gy. To evaluate the effect produced, the area of the cotyledons was estimated by means of the analysis of photographs, the median lethal dose (LD50) in the survival of the plants was calculated, and the phenotypes obtained were evaluated. Cotyledon expansion was affected in all treatments with X-rays application, showing a smaller area than the control treatment. The LD50 was estimated using the formula obtained by linear regression, resulting in an irradiation value of 312 Gy. Among the phenotypes modifications, leaf deformations, pigments alterations (variegation, albinism) and stem torsion were observed. The selection of mutants will focus on compact plants, leaf variegation, novelties in flower shape and color, and sterility.

Keywords: DL50, Induced mutations, Native plants, Ornamental plants, Plant mutation breeding.

INTRODUCCIÓN

Tanto en Argentina como en el resto de Sudamérica, los recursos genéticos nativos han sido poco explotados para el desarrollo de plantas ornamentales; sin embargo, el germoplasma proveniente de esta zona ha sido utilizado en el desarrollo de variedades por empresas internacionales. No obstante, a pesar de las inmensas ganancias que generan, los países de origen no reciben beneficio alguno [1].

El género *Salvia* (*Lamiaceae*) posee gran valor ornamental, tiene numerosas variedades en el mercado mundial y cuenta con alrededor de 900 especies de las cuales 19 son nativas de Argentina [2]. *Salvia coccinea* Buc'hoz ex Etl. es una de las especies argentinas con mayor potencial ya que posee gran rusticidad, vigor y flores muy vistosas de un color rojo intenso; sin embargo, al abordar el mejoramiento en esta especie, uno de los problemas que se presenta es la dificultad para la hibridación interespecífica y la escasa variabilidad fenotípica que presenta.

Para aumentar la variabilidad genética en programas de mejoramiento de plantas ornamentales, la aplicación de técnicas de inducción de mutaciones es especialmente apropiada. En estos programas, los objetivos principales son: modificar características de las flores como color, tamaño, morfología y fragancia; del follaje, como forma, tamaño y pigmentación; del hábito de crecimiento, como compacidad y ramificación; y de



variables fisiológicas como cambios en la respuesta fotoperiódica, floración temprana, continua y tolerancia a estreses bióticos y abióticos [3]. Estos objetivos tienen altas probabilidades de ser alcanzados mediante la aplicación de técnicas de mutaciones inducidas manteniendo sin cambios la gran mayoría del contenido genético.

Con el objetivo de obtener variaciones fenotípicas en *S. coccinea* que permitan la obtención de nuevas variedades ornamentales, se aplicaron técnicas de inducción de mutaciones por rayos X. En este trabajo se efectuó la determinación de la dosis letal media (DL50) para esta especie, así como también la evaluación del efecto fenotípico temprano en la expansión de los cotiledones en plántulas y, posteriormente, el fenotipo en plantas adultas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Irradiación con rayos X

El material vegetal empleado consistió en semillas de un genotipo selecto de *S. coccinea* proveniente de la colección *in vivo* del Instituto de Floricultura del INTA, Argentina.

Las semillas fueron irradiadas por medio de un equipo de rayos X de tipo industrial a 120 kilovoltio (kV) y 15 miliamperio (mA). Se aplicaron dosis incrementales de rayos X en seis tratamientos: 100, 200, 300, 400, 500 y 600 Gy, más un control con semillas no irradiadas. Se irradiaron, por lo menos, 50 semillas por tratamiento. Para la estimación de la dosis letal media (DL50), se evaluó la cantidad de plantas adultas obtenidas respecto del tratamiento control, teniendo en cuenta la viabilidad de la semilla. El efecto de los tratamientos se analizó ajustando los datos a un modelo matemático de regresión lineal simple y, con la fórmula resultante, se obtuvo la DL50. La supervivencia de plantas entre las diferentes dosis y el control fueron contrastadas por medio de la prueba de diferencia de proporciones, realizados por medio del programa estadístico InfoStat 2009 [4].

Germinación y evaluación de las plántulas

Inmediatamente después de los tratamientos con rayos X, las semillas fueron embebidas en agua durante una hora luego de lo cual se les retiró el mucílago que exudan frotándolas en una toalla de papel, para evitar posibles barreras a la germinación (Figura 1). La siembra se realizó en bandejas plásticas alveoladas en un sustrato compuesto por turba, perlita y vermiculita en proporción 1:1:1 (Figura 1). Las bandejas de germinación se colocaron en invernáculo bajo un sistema de microaspersión hasta la emergencia de las hojas verdaderas.

Las plántulas fueron evaluadas en un estadio temprano, a los 20 días de la siembra. Para ello, se tomaron fotografías en vista superior de las bandejas alveoladas y se analizaron por medio del programa Image J versión 1.50i, estimando el área relativa de la superficie de los cotiledones en cada tratamiento. Las superficies de cotiledones entre cada tratamiento fueron contrastadas por medio de un ANOVA con comparaciones por BSS por medio del programa InfoStat 2009 [4].

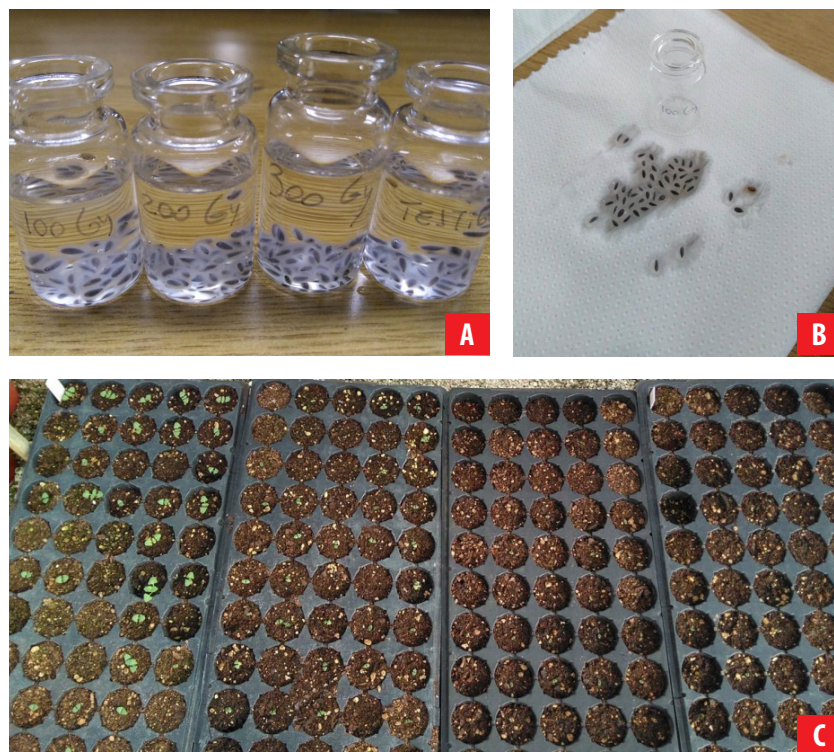


Figura 1: Tratamiento de semillas y siembra para la inducción de mutaciones por rayos X en *Salvia coccinea*. A. Semillas en imbibición; B. limpieza del mucilago de las semillas previo a la siembra; C: plántulas provenientes de la germinación de los tratamientos con dosis 0, 100, 200 y 300 Gy (de izquierda a derecha).

Evaluación de plantas con fenotipos mutantes

La evaluación de los fenotipos se realizó en los diferentes estadios de las plantas hasta la floración. Se realizaron comparaciones con las plantas del tratamiento testigo y se registraron fotográficamente los fenotipos aberrantes.

RESULTADOS

En un primer ensayo se aplicaron dosis de rayos X de 100, 200 y 300 Gy a semillas de *S. coccinea* y se estimó la viabilidad de las semillas del control en un 84% (42 semillas germinadas de 50 totales). En un segundo ensayo con 400, 500 y 600 Gy, la viabilidad de las semillas del control fue de 96,3% (52 semillas germinadas de 54 totales). La viabilidad de las semillas de los tratamientos control fue utilizada para relativizar los porcentajes de supervivencia de los tratamientos con aplicación de rayos X (Tabla 1).

Por otro lado, se observaron resultados variables en cuanto a la supervivencia de plantas. Los porcentajes de formación de plantas adultas fueron desde un 85.7% para el tratamiento con dosis de 100 Gy de rayos X hasta 0% cuando la dosis ascendió



a 600 Gy (Tabla 1). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia entre los tratamientos con 100, 200 y 300 Gy, mientras que se observaron diferencias en el número de plantas adultas sobrevivientes, cuando aumentaron las dosis por encima de 400Gy. La regresión lineal entre los porcentajes de supervivencia y las dosis de rayos X aplicadas ajustó con un coeficiente de correlación R^2 de 0.94 (Figura 2).

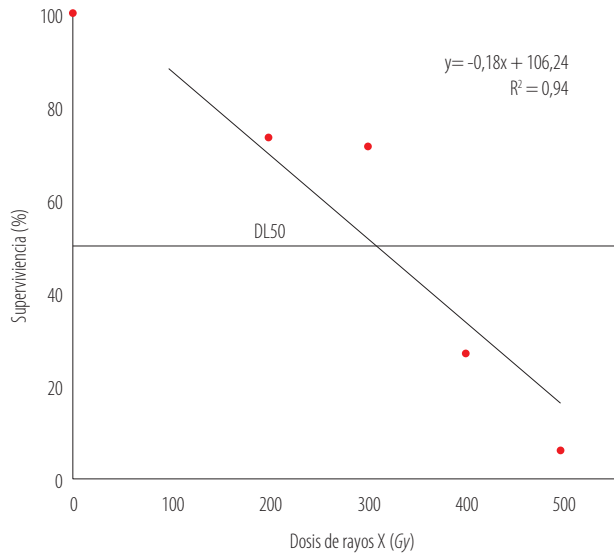


Figura 2. Porcentaje de supervivencia de las plantas en función de las dosis de rayos X (Gy) aplicadas a las semillas (regresión lineal) y determinación de dosis letal media (DL50) en *Salvia coccinea*.

La dosis letal media (DL50) fue estimada por medio de la fórmula obtenida por regresión lineal, resultando en un valor de irradiación de 312 Gy (Figura 2).

El área media de los cotiledones mostró diferencias significativas entre los tratamientos con rayos X y el control. En los cotiledones de las plántulas del primer ensayo, los tratamientos con 100 y 300 Gy no mostraron diferencias estadísticas entre sí; sin embargo, el tratamiento con 200 Gy mostró un tamaño significativamente menor. Los cotiledones de las plántulas del segundo ensayo, presentaron un tamaño menor a mayores dosis de rayos X, no mostrando diferencias estadísticas los tratados con 500 y 600 Gy. En la comparación entre todos los tratamientos, las dosis de 100, 300 y 400 Gy exhibieron un área de tamaños entre el 34.37 y el 38.16 % respecto de los cotiledones control, mientras que los tratados con 200, 500 y 600 Gy, presentaron valores relativos entre un 22.62 y 31.09% (Tabla 1).

Tabla 1: Supervivencia relativa total de plantas, porcentaje de supervivencia relativa y área de los cotiledones en plantas de *Salvia coccinea* irradiadas con rayos X. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Dosis de rayos X (Gy)	Supervivencia relativa de plantas (plantas producidas/ plantas control)	Supervivencia relativa (%)	Área relativa media de los cotiledones (%)
0 (100, 200, 300)	42/42 a	100.0	100.0 a
100	36/42 b (p 0,0129)	85.7	38.1 b
200	31/42 b (p 0,1893)	73.8	31.0 c
300	30/42 b (p 0,8125)	71.4	34.4 b
0 (400, 500, 600)	52/52 a	100.0	100.0 a
400	14/52 c (p <0,0001)	26.9	36.6 b
500	3/52 d (p 0,0037)	5.7	27.4 c
600	0/52 d (p 0,1213)	0	22.6 c

En cuanto a la aparición de fenotipos aberrantes, éstos fueron observados a partir de 300 Gy. Entre ellos se observaron deformaciones foliares, alteraciones en la pigmentación de las hojas, variegación, albinismo y torsión en tallos (Figura 3).

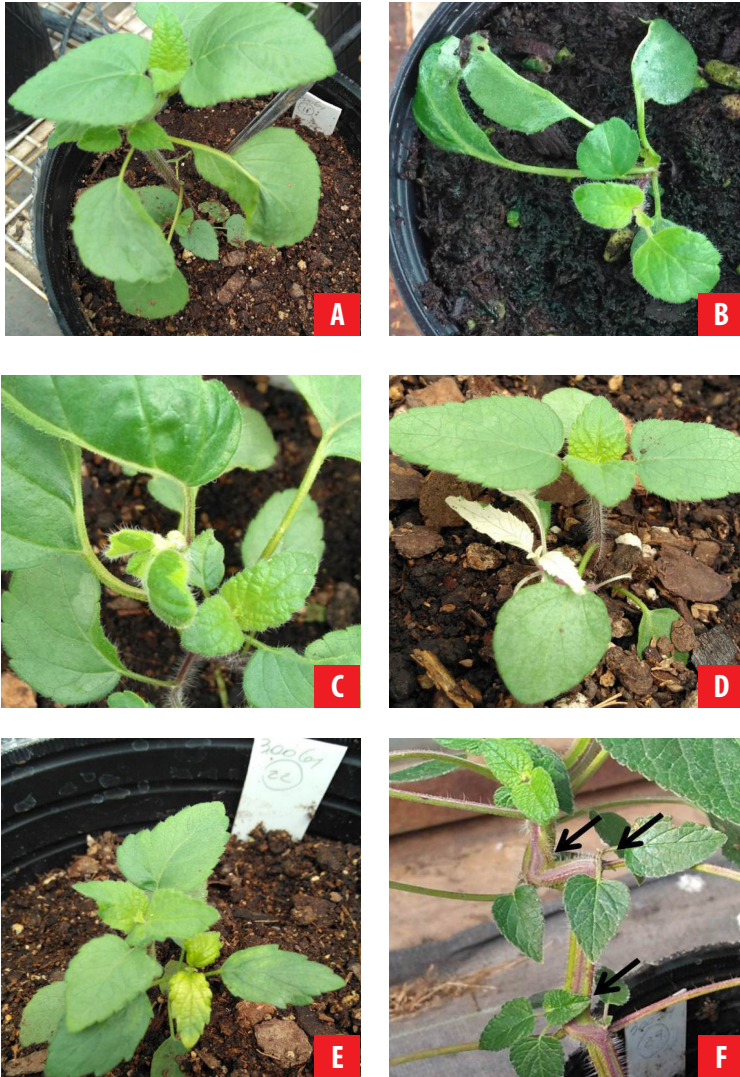


Figura 3: Efectos fenotípicos observados en plantas de *Salvia coccinea* provenientes de semillas irradiadas con rayos X. AC,B,: deformaciones foliares; D, E: cambios en la pigmentación de las hojas, variegación y albinismo; F: torsión en tallos.

DISCUSIÓN

La aplicación de técnicas de inducción de mutaciones ha sido ampliamente utilizada para la obtención de plantas ornamentales, con más de 700 variedades registradas [5]. Por estos métodos se han obtenido variedades en los géneros: *Alstroemeria*, *Rosa*,

Chrysanthemum, *Dahlia*, *Begonia* y *Dianthus*, entre otros. Sin embargo, a la fecha no existe ninguna variedad de *Salvia* ornamental en dicho registro.

La dosis letal media (DL50) obtenida en este trabajo para *S. coccinea* fue de 312 Gy, la cual resultó alta comparada con la empleada para la obtención de mutantes a partir de semillas en algunas especies como *Passiflora edulis* y *flavicarpa* (125 Gy), *Cucurbita maxima* y *Cucurbita moschata* (160-190 Gy); pero resulta similar a la utilizada para arroz (345-423 Gy) [6-8]. Sin embargo, la DL50 estimada en especies crucíferas fue mucho mayor (400-800 Gy), siendo esta diferencia atribuida a diferencias en el volumen nuclear y el tamaño cromosómico [9]. El espesor y la textura del tegumento de la semilla también podrían alterar la DL50 [10].

Una de las ventajas del uso de inducción de mutaciones en el mejoramiento de plantas ornamentales propagadas vegetativamente es la posibilidad de seleccionar en la generación mutagenizada M_1 [3], ya que la propagación agámica, permite mantener mutantes al estado heterocigota. Por lo tanto, no es necesario llegar a la homocigosis para poder registrar la variedad. Esto también representa una oportunidad para el mejorador cuando puede alternarse con reproducción sexual, teniendo la posibilidad de seguir buscando variación mediante la autofecundación, así como también en la recombinación, mediante el cruzamiento entre mutantes diferentes.

El área media de la superficie de los cotiledones fue significativamente menor al control en todos los tratamientos ensayados. La reducción en el área de los cotiledones suele atribuirse al daño cromosómico, dado que los rayos X producen rupturas y rearrreglos [11]. Esa hipótesis sugeriría que en los cotiledones de *S. coccinea* ocurriría división celular post-germinación. Sin embargo, deberán realizarse estudios para dilucidar cuál fue el mecanismo afectado.

Los fenotipos aberrantes obtenidos resultaron muy interesantes para los objetivos de mejoramiento. Algunas de las modificaciones encontradas en hojas como las variegaciones y cambios de pigmentación, así como la torsión de tallos (Figura 3) pueden proveer de la variabilidad requerida para generar una nueva variedad. Por otro lado, algunos de los fenotipos obtenidos mostraron indicios de que sus tejidos presentan un mosaico genético, siendo quimeras sectoriales o mericlinales (Figuras 3.c, d y e). En caso de resultar de interés, podría aislarse intentando enraizar la porción que presenta la mutación. La obtención de variantes sólidas en esta etapa, se atribuiría a la expresión de variación pre-existente no detectada en el fenotipo parental.

Existen diferentes metodologías para la inducción de mutaciones por rayos X. En este trabajo fueron aplicadas dosis agudas en una sola exposición a la radiación. Sin embargo, algunos autores han obtenido un mayor número de mutantes mediante una exposición fraccionada de la DL50 ya que, según afirman, permite al genoma recuperarse entre eventos de irradiación [12-15].

Si bien ya se obtuvieron fenotipos promisorios, el plan de mejoramiento continuará aplicando la DL 50 calculada para obtener un mayor número de mutantes. La aplicación de la radiación se repetirá como dosis aguda pero no se descarta la posibilidad de evaluar el efecto de dosis fraccionadas. También se planea realizar autofecundaciones y



cruzamientos dirigidos entre mutantes. La selección de nuevas variedades se orientará a la obtención de plantas compactas, variegación de las hojas, novedades en forma y color de flores y esterilidad. Las plantas obtenidas a partir de los ensayos de inducción de mutaciones se encuentran actualmente en cultivo en el Instituto de Floricultura del INTA, Argentina, para continuar su evaluación.

AGRADECIMIENTOS

A Zulma Roa, quien mantiene con dedicación la colección de trabajo de *Salvia* en el Instituto de Floricultura del INTA.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

Verónica Bugallo: concepción de la investigación; diseño de la metodología; redacción del manuscrito; adquisición, análisis e interpretación de los datos; estadísticas.

Gabriela Facciuto: concepción de la investigación, diseño de la metodología, redacción del manuscrito; adquisición, análisis e interpretación de los datos.

Vanina Brizuela: adquisición de los datos de laboratorio.

Alberto Prina: redacción del manuscrito, revisión crítica del contenido intelectual del manuscrito.

Mariana Pérez de la Torre: redacción del manuscrito, revisión crítica del contenido intelectual del manuscrito.

Alejandra Landau: adquisición de los datos de laboratorio, redacción del manuscrito, revisión crítica del contenido intelectual del manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Bugallo, V., Pannunzio, M. J., Cardone, S. & Facciuto, G. (2011). *Breeding Advances in Passiflora Native to Argentina. Floriculture and Ornamental Biotechnology*, Global Science Books, UK. 5 (1): 23-34. ISSN: 1749-0294.
- [2] O'Leary, N. & Moroni, P. (2016). Las especies de *Salvia* (*Lamiaceae*) para Argentina. *Darwiniana nueva serie* 4(1): 91-131.
- [3] Schum, A. & Preil, W. (1998). Induced mutations in ornamental plants. In: Jain, SM; Brar, DS; Ahloowalia, BS (Eds.), *Somaclonal variation and induced mutation in crop improvement. Current plant science and Biotechnology in agriculture*, vol. 32. Springer.
- [4] Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W. (2011). *InfoStat*. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. [5] FAO/IAEA. 2020. Mutant Variety Database. Recuperado de: <http://mvd.iaea.org>. Consultado en junio 2020
- [6] Flores, P. S., & Bruckner, C. H. (2015). Radiossensibilidade de sementes e segmentos caulinares de maracujazeiro-amarelo submetidos à radiação gama. *Ciência Rural*, 45(12), 2131-2136. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20121274>
- [7] Kurtar, E. S., Balkaya, A. & Kandemir, D. (2017). Determination of semi-lethal (LD50) doses for mutation breeding of Winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.) and pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.). *Fresenius Environmental Bulletin* 26(5): 3209-3216.
- [8] Harding, S.S., Johnson, S. D., Taylor, D. R., Dixon, C. A. & Turay, M. Y. (2012). Effect of Gamma Rays on Seed germination, seedling height, survival percentage and tiller production in some rice varieties cultivated in Sierra Leone. *American Journal of Experimental Agriculture* 2(2): 247-255.
- [9] Gómez-Campo, C. & Delgado, L. (1964). Radioresistance in crucifers. *Radiation Botany* 4(4):479-483.
- [10] Olasupo, F. O., Ilori, C. O., Forster, B. P. & Bado, S. (2016). Mutagenic effects of gamma radiation on eight accession of Cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). *American Journal of Plant Sciences*, 7: 339-351.
- [11] Ibrahim, R., Ahmad, Z., Salleh, S., Hassan, A. A. & Ariffin, S. (2018). Mutation Breeding in Ornamentals. In: *Ornamental Crops* (pp. 175-211). Springer, Cham.
- [12] Bologna, P., Soto, S., Coviella, M.A., Pannunzio, M.J. Facciuto, G. Prina A.R. & Borja M. (2012). X-Rays as a tool for inducing variants of *Calibrachoa*. In: *Proceedings XXVIIIth IHC-IS on Advances in Ornamentals, Landscape and Urban Horticulture*. ISHS. *Acta Horticulturae* 937:941-946.
- [13] Broertjes, C. (1972). Improvement of vegetatively propagated plants by ionizing radiation. In: *Induced Mutations and Plant Improvement (Proceedings FAO/IAEA Study Group Meeting*, (pp.293-299). Buenos Aires, Argentina.
- [14] Matsumura, S. (1961). Dose Rate and RBE for Radiation Induced Mutations in Plants. *The Japanese Journal of Genetics* VI, Suppl. 36:65-67.
- [15] van Harten, A.M. (1998). *Mutation Breeding-Theory and Practical Applications*. Ed. Cambridge.

Evaluación fenotípica de dos generaciones de plantas de arveja (*Pisum sativum* L.) provenientes de semillas irradiadas con rayos gamma

Pablo Álvarez¹, Álvaro Yépez¹, Emilio Basantes¹, Ángel Murillo^{2*}, Eduardo Peralta²

¹Universidad de la Fuerzas Armadas ESPE, Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias IASA I. Sangolquí, Ecuador.

²Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental Santa Catalina, Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos. Cutuglahua, Ecuador.

*Autor para correspondencia/ Corresponding autor, e-mail: angel.murillo@iniap.gob.ec

Phenotypic evaluation of two generations of pea plants (*Pisum sativum* L.) from gamma-irradiated seeds

Resumen

La inducción de mutaciones es una técnica que permite generar nueva variabilidad genética útil para la búsqueda de mutantes de interés en diversos caracteres, para lo cual se pueden utilizar agentes mutagénicos que pueden ser de tipo físico o químico. El objetivo de este estudio fue: evaluar fenotípicamente dos generaciones de plantas provenientes de semillas irradiadas con cobalto 60 de la variedad de arveja INIAP 436 Liliana. La investigación se realizó en la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del INIAP a 3057 msnm y en el Instituto Técnico Superior Simón Rodríguez (ITSSR) a 2775 msnm. La primera etapa consistió en determinar la dosis óptima de radiación para inducir mutaciones (dosimetría). Se probaron cinco tratamientos: 0, 50, 100, 150 y 200 Gy, y se determinó que la dosis óptima fue de 120 Gy. En la segunda etapa se irradiaron 30 000 semillas de arveja de la variedad INIAP 436 Liliana a la dosis determinada. Esta población (M_1) fue sembrada en campo junto a un testigo sin irradiar y se evaluó el porcentaje de emergencia y el número de plantas que presentaron sectores mutantes clorofílicos en el cuarto, quinto y sexto foliolo, y plantas que tenían vainas con y sin grano. En la tercera etapa, 50000 semillas de la población M_2 fueron sembradas en cada localidad, se midieron las mismas variables que en la etapa anterior. Además, se calculó la frecuencia, efectividad y eficacia de la radiación. En la población M_1 tratada se observó disminución en el porcentaje de emergencia, así como el apareamiento de plantas quiméricas deficientes en clorofila y estériles, lo cual se debe a los cambios genéticos debido a la radiación aplicada. Igualmente, en la M_2 se observaron plantas mutantes clorofílicas de las categorías *albina*, *xantha* y *viridis*, lo cual indica que, a pesar de la frecuencia de mutación baja (0,22%), el tratamiento aplicado indujo mutaciones que pasaron a la segunda generación (M_2). No fue posible identificar mutaciones que confieran resistencia a *Ascochyta* sp, debido posiblemente a que es un carácter poligénico.

Palabras clave: Mejoramiento genético, Mutaciones, Mutantes clorofílicas, Progenie.



Editado por /
Edited by:
Gabriela Albán

Recibido /
Received:
06/08/2020

Aceptado /
Accepted:
02/11/2020

Publicado en línea /
Published online:
01/04/2021

Abstract

Mutation plant breeding is a technique that generates new genetic variability that can be used to identify and select mutants of interest for various characters. The mutant agent can be physical or chemical. The objective of this study was to evaluate two generations of plants of the pea variety INIAP 436 Liliana whose seed was irradiated with cobalt 60. The research was carried out at the Santa Catalina Experimental Station (EESC) of INIAP at 3057 masl and at the Simon Rodriguez Higher Technical Institute (ITSSR) at 2775 masl. Previously, the optimal dose of radiation to induce mutations (dosimetry) in the pea variety was evaluated with five treatments: 0, 50, 100, 150 and 200 Gy, and it was determined that the optimal dose was 120 Gy. With the optimal dose, 30000 seeds of pea were irradiated. This population (M_1) was sown in the field together with a control without irradiation. The emergence percentage and the number of plants that presented chlorophyll mutant sectors in the fourth, fifth and sixth leaflets, and plants that had pods with and without grain were evaluated. In the next cycle, 50000 seeds of the M_2 population were sown in each locality, the same variations were measured as in the previous stage. In addition, the frequency, effectiveness and efficiency of the mutation were calculated. In the treated M_1 population, a decrease in the percentage of emergence was observed, as well as the appearance of chimeric plants deficient in chlorophyll and sterile, which is due to genetic changes due to the applied radiation. Similarly, in M_2 chlorophyll mutant plants of the albino, xantha and viridis categories were observed, which indicates that, despite the low mutation frequency (0.22%), the applied treatment induced mutations that passed to the second generation (M_2). It was not possible to identify mutations that confer resistance to *Ascochyta* sp, possibly due to its polygenic character.

Keywords: Chlorophyll mutants, Mutations, Plant breeding, Progeny.

INTRODUCCIÓN

La inducción de mutaciones es una técnica que permite generar nueva variabilidad genética. Se realiza empleando agentes mutagénicos que pueden ser de tipo físico o químico [1]. En el grupo de los agentes físicos se encuentran los rayos gamma que son emitidos por los radionucleidos cobalto 60 (^{60}Co) o cesio (^{137}Cs) y que son un tipo de radiación electromagnética, ionizante y muy penetrante [2]. La exposición de células vivas a estos rayos ocasionan estrés oxidativo que conlleva daños al ADN, entre otras macromoléculas. La reparación enzimática de tales daños puede producir mutaciones [3, 4]. La dosis óptima del agente mutagénico es aquella que produce alteraciones en el ADN sin comprometer en gran medida la viabilidad del material tratado. Para determinarla, se debe medir el efecto de la exposición a un rango de dosis sobre variables como altura o peso seco de plántulas [5]. La dosis óptima es aquella que ocasiona una reducción del 30% en la variable evaluada [6].

Para inducir mutaciones en leguminosas se recomienda utilizar los rayos gamma e irradiar de 5000 a 10000 semillas, que forman la generación M_1 . Las semillas cosechadas a partir de esas plantas originan la generación M_2 , que debe estar formada por al



menos 50000 individuos. Las plantas M_1 son quiméricas. Esta característica se observa fácilmente debido al apareamiento de sectores mutantes clorofílicos. En la M_2 , salvo excepciones [7], no existen quimeras y se observan plantas mutantes clorofílicas con la totalidad de sus tejidos de un color diferente al usual, pudiendo pertenecer a las categorías *albina* (blanca, sin clorofila), *xantha* (amarilla) y *viridis* (verde claro) [6]. El registro del número de plantas M_2 mutantes clorofílicas es útil para calcular la frecuencia de mutaciones inducida por el tratamiento mutagénico, así como su efectividad y eficiencia. La efectividad se define como una medida de la frecuencia de mutaciones inducidas por unidad de agente utilizado. La eficiencia provee la proporción de mutaciones en relación con otros efectos biológicos deletéreos observables en la M_1 , tales como letalidad, esterilidad del polen y aberraciones cromosómicas [8].

Es recomendable que en fitomejoramiento mediante mutagénesis se emplee una variedad ya liberada, en la cual la mejora de una o dos características incrementen su valor agronómico. La variedad de arveja INIAP 436 Liliana, de tipo decumbente, posee buenas características agronómicas, tales como: precocidad intermedia, buen vigor de crecimiento, grano grande, buena demanda en el mercado y aptitud para elaboración de harina; sin embargo, es susceptible a ascoquitosis [9].

Con la finalidad de evaluar fenotípicamente dos generaciones de plantas provenientes de semillas irradiadas de la variedad de arveja INIAP 436 Liliana, se indujeron mutaciones empleando rayos gamma. El proceso se dividió en tres etapas. En la primera etapa (dosimetría), se determinó la dosis óptima en base a la reducción producida por la radiación en la altura promedio de plántulas. La segunda etapa, correspondió a la evaluación en campo de una población testigo y una población irradiada a la dosis óptima (generación M_1). Se midieron los porcentajes de emergencia, porcentajes de plantas con sectores mutantes clorofílicos y porcentajes de plantas que llegaron a producir semillas en cada población. En la tercera etapa (generación M_2), se determinó los porcentajes de emergencia, la frecuencia de mutaciones clorofílicas y se evaluó la resistencia a *Ascochyta* spp, de la población irradiada y el testigo.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del INIAP y en el Instituto Técnico Superior "Simón Rodríguez" (ITSSR), Ecuador. La primera está ubicada en la parroquia Cutuglahua del cantón Mejía, provincia de Pichincha, a una altitud 3057 msnm, con temperatura promedio de 11.6°C, nivel de precipitación de 1400 mm anuales y humedad relativa de 79%. El ITSSR se localiza en la parroquia Aláquez del cantón Latacunga en la provincia de Cotopaxi, a una altitud de 2775 msnm con una temperatura promedio de 14.5 °C, nivel de precipitación de 500 mm anuales y humedad relativa del 70% [10].

Las irradiaciones se realizaron en las instalaciones de la Subsecretaría de Control, Investigación y Aplicaciones Nucleares del Ministerio de Electricidad y Energía Renovable; las mismas están ubicadas en la localidad de Aychapicho del cantón Mejía, provincia de Pichincha, Ecuador.

Etapa I. Dosimetría

Se determinó el porcentaje de humedad de semillas de arveja de la variedad INIAP 436 Liliana empleando un medidor de granos Steinlite (Fred Stein Laboratories, Inc.). Las semillas se irradiaron con una fuente de cobalto 60 (irradiador modelo 109-68, J.L. Sheperd and Associates Inc.). Se probaron cinco tratamientos: 0, 50, 100, 150 y 200 Gy. Se irradiaron 500 semillas para cada tratamiento. Después se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 10%, en la cual se sumergieron durante 10 minutos, seguido de lo cual se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

Se realizaron tres pruebas. Para cada prueba se destinaron 150 semillas por tratamiento, y cada tratamiento estuvo formado por tres repeticiones de 50 semillas cada una. En la primera prueba se midió el efecto de los tratamientos sobre la variable "porcentaje de germinación". Para esto, las semillas se mantuvieron sobre toallas de papel absorbente reutilizable humedecidas con agua destilada estéril, dentro de una estufa a 20°C durante nueve días, al cabo de los cuales se contabilizó el número de semillas germinadas.

En la segunda prueba se midió la supervivencia de las plantas hasta los 31 días posteriores a la siembra. Las semillas se sembraron sobre un sustrato constituido por tierra, compost, cascarilla de arroz y piedra pómez en una proporción de 4:2:1:1. Este sustrato se esterilizó en una autoclave a 121°C, durante 40 minutos. El riego se realizó con agua estéril. Una vez transcurrido el tiempo establecido, se contabilizó el número de plantas que aún se desarrollaban en cada unidad experimental.

En la tercera prueba, se midió la altura promedio que alcanzaron las plántulas hasta el punto de inserción del segundo foliolo. Para cada repetición se realizó el siguiente procedimiento: las semillas se colocaron cerca del borde de una toalla de papel humedecida con agua estéril. Entre cada semilla se ubicó una pajilla plástica. La toalla, junto con las semillas y las pajillas se envolvieron alrededor de un tubo de PVC de 25 cm de largo y 2.54 cm de diámetro y se sujetaron al mismo con ligas de hule. Este paquete se introdujo en un vaso plástico desechable de 1 l de capacidad. Se regaron las plántulas dos veces al día con agua estéril, y al cabo de un mes se realizaron las mediciones respectivas.

Una vez conocidas las alturas promedio de las plántulas por cada tratamiento, se determinó la ecuación y la curva de regresión para las dosis de radiación utilizando el programa Microsoft Excel. En base a la ecuación se calculó la dosis de radiación que produciría una reducción del 30% en la altura de las plántulas.

Etapa II. Generación M₁

Se irradiaron con la fuente de cobalto 60, 30000 semillas de arveja de la variedad INIAP 436 Liliana con un porcentaje de humedad del 12.7% a la dosis óptima previamente determinada. Estas semillas se sembraron en el ITSSR en surcos de 75 m de largo con un espaciamiento entre sitios de siembra de 10 cm y entre surcos de 80 cm. Entre los surcos de la población irradiada se sembraron surcos con semillas testigo o control.

A los 19 días de la siembra, se midió en surcos seleccionados al azar el porcentaje de emergencia en la población irradiada y el testigo. En la muestra de cada población se



contabilizó el número de plantas emergidas, se lo dividió por el número estimado de semillas sembradas y se multiplicó este resultado por 100.

A los 38 días, se seleccionaron al azar dos surcos de la población irradiada y de la población testigo. En cada muestra se contabilizó el número de plantas que presentaron sectores mutantes clorofílicos en el cuarto, quinto y sexto foliolo. Se contabilizó también el número total de plantas evaluadas en cada muestra. Con esta información, se calculó el porcentaje de presencia de sectores mutantes para cada foliolo considerado.

A los 136 días, se seleccionaron 100 plantas al azar de cada una de las dos poblaciones. Se contabilizó el número de plantas que tenían vainas con granos, así como aquellas que presentaban vainas vacías. La cosecha se efectuó a los 145 días. Se cosecharon 8 vainas provenientes del tallo principal de cada planta.

Etapa III. Generación M_2

Las semillas cosechadas en la etapa anterior se sembraron en dos localidades, en la EESC y en el ITSSR. En cada localidad se sembraron más de 50000 semillas provenientes de cuatro vainas de cada planta M_1 . Adicionalmente, se sembraron semillas testigo en surcos distribuidos entre la población irradiada.

Localidad EESC

El espaciamiento entre plantas y surcos fue el mismo que el empleado en la etapa 2. La longitud de los surcos fue de 100 m en la EESC. La medición de los porcentajes de emergencia se efectuó tres semanas después de la siembra. Se seleccionaron al azar 10 surcos de la población irradiada y 3 surcos de la población testigo. Se aplicó el mismo procedimiento realizado en la etapa 2 para obtener los porcentajes de emergencia. En forma simultánea, se contabilizó las plantas mutantes clorofílicas y se las clasificó en las categorías *albina*, *xantha* y *viridis*. Con esta información se calculó la frecuencia de mutación inducida utilizando la fórmula [6]:

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

En donde: M = frecuencia de mutación como porcentaje. N = número de todas las plántulas M_2 analizadas para una dosis particular. Para estimar la cantidad total de plántulas M_2 evaluadas dentro de la población, se promedió el número de plántulas presentes dentro de los surcos muestreados y a este valor se le multiplicó por el número total de surcos sembrados.

A los 96 días después de la siembra, se realizó la inoculación de las plantas con un aislamiento de *Ascochyta* sp. proveniente de la EESC. La concentración empleada fue de 10^6 conidias ml^{-1} [11]. La inoculación se realizó empleando una bomba de mochila de 20 l de capacidad. A la solución se le añadió un fijador agrícola a una dosis de 1 ml por litro. Las plantas fueron inoculadas en las últimas horas de la tarde.

Localidad ITSSR

La longitud de los surcos en esta localidad fue de 90 m, el espaciamiento entre plantas y entre surcos fue el mismo que en la EESC. Para determinar los porcentajes de emergencia se seleccionaron 10 surcos al azar de la población irradiada y 5 surcos de la población testigo. Se aplicó el mismo procedimiento empleado en la etapa 2. Una vez conocidos los porcentajes de emergencia de ambas poblaciones en las dos localidades, se realizó la transformación raíz cuadrada del arcoseno para poder realizar el análisis de varianza [10]. Para la obtención de la frecuencia de mutación se siguieron los mismos pasos empleados en la EESC.

La inoculación de *Ascochyta* sp se realizó a los 106 días de la siembra con un aislamiento proveniente del ITSSR. La concentración de conidias en la solución fue la misma que la utilizada en la EESC, así como los implementos, aditivos y procedimientos realizados. Las evaluaciones de la reacción de las plantas al patógeno se realizaron a los 25 y 46 días después de la inoculación.

Cálculo de la efectividad y la eficiencia del tratamiento mutagenico

La fórmula aplicada para calcular la efectividad de un agente mutagénico físico fue la empleada por Konzak et al., citados por Wani (2009) [12], la cual es:

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

En cuanto a la eficiencia de un agente mutagénico, la fórmula que se utilizó para obtenerla fue la siguiente (Konzak et al., citados por Wani (2009) [12]:

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

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa I. Dosimetría

Se encontró que las distintas dosis de radiación no tuvieron efecto sobre la capacidad de germinación de las semillas de arveja (Figura 1). Resultados similares fueron obtenidos en trabajos con arveja, vigna y trigo [13, 14, 15].

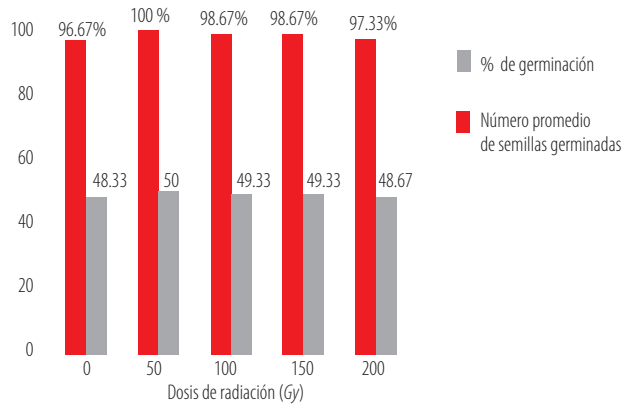


FIGURA 1. Número promedio de semillas germinadas y porcentaje de germinación para cada dosis de radiación empleada.

En la evaluación de la supervivencia a los 30 días, se observó que la dosis de 200 Gy presentó un marcado descenso en el número de plantas que aún continuaban con su desarrollo. La reducción a esta dosis fue del 25.2% (Figura 2). Un resultado similar se observó al irradiar semillas de haba por sobre los 200 Gy [16].

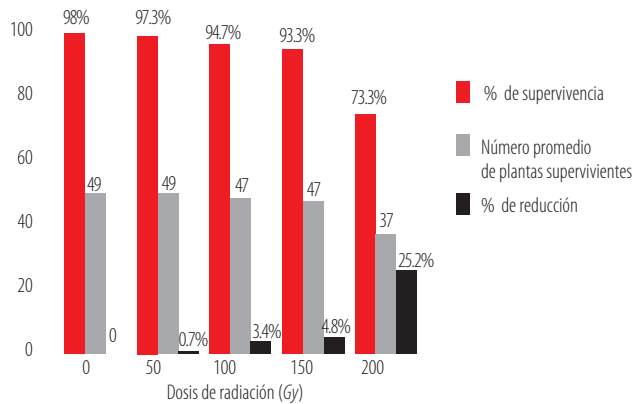


FIGURA 2. Número promedio de plantas supervivientes, porcentaje de supervivencia y porcentaje de reducción con respecto al tratamiento testigo, observados para cada dosis de radiación gamma aplicada.

La altura promedio de las plántulas hasta el punto de inserción del segundo foliolo, se redujo conforme se incrementó la dosis de rayos gamma (Figura 3). Esto puede deberse a que en los meristemas de las plantas irradiadas se presentan tres tipos de cambios

citológicos: retraso en el ciclo celular, formación de aberraciones cromosómicas y pérdida de la capacidad proliferativa debido a una diferenciación temprana o a muerte celular. Se sugiere que este último cambio es el principal responsable de la reducción en el crecimiento [17]. En base a esta información se procedió a determinar la dosis óptima de radiación, para lo cual, se determinó la curva y la ecuación de regresión:

$$y = 2 \times 10^{-6} x^3 - 0.0005x^2 + 0.0043x + 10.988$$

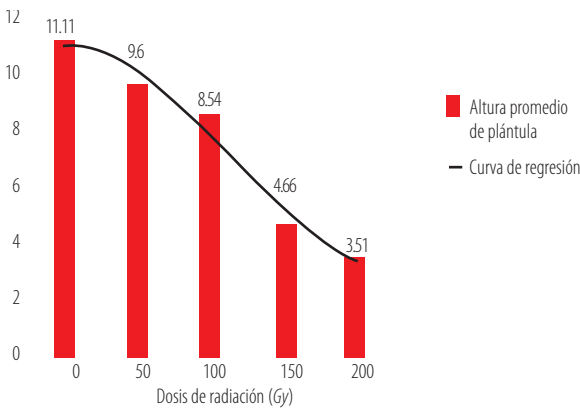


FIGURA 3. Reducción en la altura promedio de las plántulas como efecto de las dosis de radiación aplicadas.

Dado que la altura promedio de las plántulas en el tratamiento testigo fue de 11.11 cm (Figura 3), la dosis buscada fue aquella que produjese una reducción del 30% , es decir, 7.78 cm. Una vez resuelta la ecuación cúbica, se encontró que la dosis óptima de radiación es de 119.66 Gy, valor que se redondeó a 120 Gy. De acuerdo a diversos trabajos [9 , 10], para inducir mutaciones en semillas de arveja con rayos gamma, el rango de dosis recomendadas se ubica entre los 100 a 150 Gy [6].

Etapa II. Generación M₁

Los porcentajes de emergencia observados en la población irradiada y la población testigo fueron diferentes. En la primera la emergencia fue del 31.4% y en la segunda del 65%. Resultados similares se obtuvieron al irradiar semillas de arveja de las variedades "Amarilla" y "Alderman", con dosis de 140 y 180 Gy de rayos gamma incluyendo poblaciones testigo [18].

Se observaron plantas con sectores mutantes clorofílicos solo en la población irradiada. Pero, el porcentaje de estas alteraciones se redujo en los folíolos más



jóvenes de la parte superior de la planta (Tabla 1). La presencia de sectores mutantes clorofílicos en las plantas M_1 es un indicio del daño causado por la radiación sobre genes que regulan la capacidad fotosintética de las células vegetales, el cual está regulado por genes presentes tanto en el núcleo como en los cloroplastos [19].

La pérdida de los sectores mutantes clorofílicos conforme se desarrolla la planta se puede explicar mediante los procesos de deriva y selección diplóntica; la primera se debe a las condiciones ambientales como la temperatura y fotoperiodo que afectan la estabilidad de las células en el ápice de una planta. Si una célula mutante es desplazada del ápice, deja de generar tejidos que conforman nuevos órganos y el sector se pierde. Esta pérdida se da al azar [20]. La selección diplóntica, consiste en la competencia entre tejidos con diferente genoma dentro de una misma planta. Por lo general los sectores mutantes, al acarrear alteraciones genéticas, pueden estar en desventaja competitiva y, en consecuencia, desaparecer [21]. En otro estudio solamente se encontró evidencia de “selección diplóntica” en donde, existen varios meristemas potenciales, de los cuales solo unos pocos pueden desarrollarse. Esto sucede durante la formación de yemas axilares y adventicias [20]. Otra causa para la presencia de un número menor de sectores con pigmentación en hojas de la parte superior de la planta, se debe a que están representadas por un número menor de células en el momento de la irradiación.

El porcentaje de plantas con vainas vacías dentro de la población M_1 irradiada fue del 13%, mientras que en la población testigo no se encontraron este tipo de alteraciones. Esto se debería a un daño fisiológico general ocasionado en la semilla, debido a la letalidad de los tratamientos con rayos gamma (Tabla 1). De acuerdo a [22] y [23], posiblemente estas alteraciones también pueden atribuirse a disturbios producidos durante la meiosis.

TABLA 1. Resultados observados en las variables medidas durante la generación M_1

Variables	Poblaciones		
	Irradiada	Testigo	
Porcentaje de emergencia	31.40	65.00	
Porcentaje de plantas con sectores mutantes clorofílicos.	Cuarto foliolo	91.36	0
	Quinto foliolo	71.16	0
	Sexto foliolo	39.03	0
Letalidad	Plantas con vainas con granos	87.00	100.00
	Plantas con vainas sin granos	13.00	0

Etapa III. Generación M₂

Aunque se observaron ligeras diferencias entre los porcentajes de emergencia de la población irradiada y el testigo en las dos localidades (Figura 4), el análisis de varianza realizado con los datos transformados demostró que no existieron diferencias significativas entre los valores observados (Tabla 2).

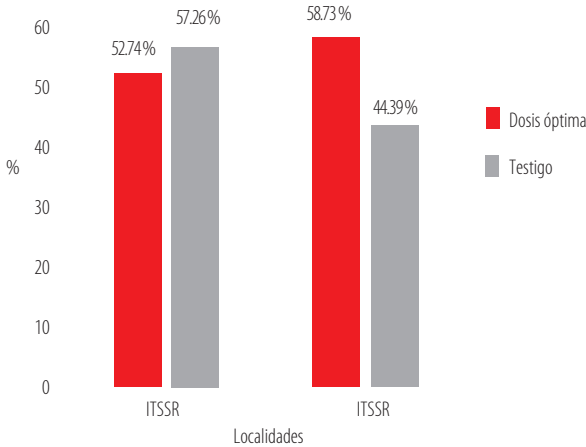


FIGURA 4. Porcentajes de emergencia en la Etapa III de las poblaciones “Dosis óptima” y “Testigo” en dos localidades.

TABLA 2. Análisis de varianza de la emergencia de plantas observada en las poblaciones irradiadas y testigo en dos localidades.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F
Total	3	41.29		
Población	1	7.97	7.97	0.27ns
Localidad	1	3.88	3.88	0.13ns
Error	1	29.44	29.44	

En la población M₂, se observaron plántulas con sectores mutantes clorofílicos de tipos: *Albina*, *Xantha* y *Viridis*. La frecuencia de mutación de la población irradiada fue de 0.22% en ambas localidades (Tabla 3). Esta frecuencia de mutación también fue observada por otros investigadores en arveja [18]; en dichos trabajos hallaron que en la M₂ las frecuencias de mutaciones clorofílicas se encontraban entre 0.20 y 0.35% para dosis de radiación gamma entre 140 y 180 Gy. En contraste a los resultados mencionados, en otros trabajos reportan frecuencias de mutaciones clorofílicas de hasta el 6.27% al irradiar semillas de arveja de las variedades indias DDR-53 y DMR-55 con rayos gamma



a dosis de 50, 70 y 100 Gy [8]. El origen de deficiencias clorofílicas en plantas se debe, principalmente, a mutaciones en genes que codifican para la síntesis de pigmentos fotosintéticos o en genes de mitocondria [8]. Es necesario señalar que otros genes que determinan atributos de interés agronómico pueden mutar con menor frecuencia que aquellos que controlan la elaboración de clorofila [6].

TABLA 3. Número de plántulas mutantes clorofílicas observadas dentro de las poblaciones irradiadas en la Generación M₂ en cada localidad y sus correspondientes frecuencias de mutación

			LOCALIDADES	
			EESC	ITSSR
Número de plántulas con sectores mutantes clorofílicos	Categorías	<i>Albina</i>	16	8
		<i>Xantha</i>	4	2
		<i>viridis</i>	44	55
	TOTAL		64	65
Número estimado total de plántulas analizadas			29631	28975
FRECUENCIAS DE MUTACIÓN			0.22%	0.22%

Todas las plantas fueron susceptibles a *Ascochyta* sp , debido posiblemente a que la arveja tiene una base genética sumamente compleja y que la resistencia genética puede estar determinada por varios genes y su herencia es cuantitativa [24].

Efectividad y eficiencia del tratamiento mutagénico

Los valores de la efectividad y eficiencia del agente mutagénico aplicada en la variedad Liliانا fueron de 0.0018 y 0.0169, respectivamente. Al comparar estos valores con lo observado en las variedades DDR-53 y DDR-55 [8] son sustancialmente superiores a los valores encontrados en la presente investigación; lo cual lleva a indicar que la variedad INIAP Liliانا posiblemente posee una radiosensibilidad menor que las variedades indias.

CONCLUSIONES

La dosis óptima para inducir mutaciones en la variedad INIAP 436 Liliانا fue de 120 Gy. Esta dosis de rayos gamma originó una disminución del 30% en altura de plántulas comparándola con un tratamiento testigo, sin exposición a radiación.

La presencia de sectores deficientes en clorofila y esterilidad en plantas adultas M₁ son indicios de que se produjeron cambios genéticos en la semilla irradiada.

A pesar de que la frecuencia de mutaciones clorofílicas observada en la generación M_2 fue baja, el tratamiento con rayos gamma indujo mutaciones que lograron pasar a la segunda generación. Sin embargo, se podría aumentar las dosis pero sin exceder la letalidad.

No fue posible aislar mutaciones en la variedad de arveja INIAP 436 Liliana que confieran resistencia a *Ascochyta* sp, mediante el uso de rayos gamma a la dosis de 120 Gy debido que esta característica posiblemente es poligénica.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

Ángel Murillo, Eduardo Peralta y Pablo Álvarez concibieron la investigación; Pablo Álvarez y Ángel Murillo desarrollaron la metodología y realizaron el trabajo en campo; Pablo Álvarez y Emilio Basantes y Álvaro Yépez realizaron los análisis estadísticos; Pablo Álvarez y Ángel Murillo redactaron el manuscrito; Eduardo Peralta, Ángel Murillo, Emilio Basantes y Álvaro Yépez revisaron críticamente el contenido intelectual del manuscrito; Ángel Murillo realizó la revisión, corrección y edición final del manuscrito.

REFERENCIAS

- [1] Prina, A., Landau, A., Pacheco, M., & Hopp, E. (2010). Mutagénesis, TILLING y EcoTILLING. In: G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp, & L. Mronginski (Edits.), *Biocología y Mejoramiento Vegetal* (Segunda edición ed., pp. 217-228). Castelar, Argentina: Argenbio INTA.
- [2] Prina, A. R., Pacheco, M. G., Landau, A. M. (2012). Mutation Induction in Cytoplasmic Genomes. In: Shu QS, Foster BP, Nakagawa H (Eds), *Plant Mutation Breeding and Biotechnology* (pp. 201–206). Rome: FAO-IAEA.
- [3] Lagoda, P. (2012). Effects of Radiation on Living Cells and Plants. In: Q. Shu, B. Foster, & H. Nakagawa (Edits.), *Plant Mutation Breeding and Biotechnology* (pp. 123-133). Vienna: S.L. CABI (Centre for Agriculture Bioscience International). Joint FAO IAEA.
- [4] Curtis, M. (2012). DNA Repair Pathways and Genes in Plant. In: Q. Shu, B. Foster, & H. Nakagawa (Edits.), *Plant Mutation Breeding and Biotechnology* (pp. 57-59). Vienna, Austria: S.L. CABI (Centre for Agriculture Bioscience International). Joint FAO IAEA.
- [5] FNCA (Forum for Nuclear Cooperation in Asia). (2004). *Mutation Breeding Manual*. (F. Medina, E. Amano, & T. S, Edits.) FNCA.
- [6] Maluszynski, M., Szarejko, I., Chittaranjan, B., Nichterlein, K., & Lagoda, P. (2009). Methodologies for generating variability Part 4: Mutation techniques. In: S. Ceccarelli, E. Guimarães, & E. Weltzien (Edits.), *Plant Breeding and Farmer Participation* (pp. 160-173). Roma, Italia: FAO.
- [7] Prina A. R., Pacheco M. G., Landau A. M. (2012). Mutation Induction in Cytoplasmic Genomes. In: Shu QS, Foster BP, Nakagawa H (Eds). *Plant Mutation Breeding and Biotechnology* () Rome: FAO-IAEA.
- [8] Dhulgande, G., Dhale, D., Pachkore, G., & Satpute, R. (2011). Mutagenic Effectiveness and Efficiency of Gamma Rays and Ethyl Methanesulphonate in Pea (*Pisum sativum* L.). *Journal of Experimental Sciences*, 3(2), 7-8.
- [9] Peralta, E., Murillo, A., Mazón, N., Monar, C., Pinzón, J., & Rivera, M. (2010). *Manual Agrícola de Fréjol y otras Leguminosas. Cultivos, variedades y costos de producción*. (Segunda ed.) Quito, Ecuador: Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos. Estación Experimental Santa Catalina. INIAP
- [10] McDonald, J. (2009). *Handbook of Biological Statistics*. Recuperado el 20 de enero de 2013, de <http://udel.edu/~mcdonald/stattransform.html>.
- [11] Castellanos, G., Jara, C., & Mosquera, G. (2011). *Guías Prácticas de Laboratorio para el Manejo de Patógenos del Frijol*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- [12] Wani, A. (2009). Mutagenic Effectiveness and Efficiency of Gamma Rays, Ethyl Methane Sulphonate and their combination treatments in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Asian Journal of Plant Science*, 1(4).
- [13] Çiftçi, Y., Divalin Türkan, A., & Khawar, K. (2006). Use of Gamma Rays to Induce Mutations in four Pea (*Pisum sativum* L.) Cultivars. *Turk J Biol*, 29-37.
- [14] Kon, E., Ahmed, O., Saamin, S., & Majid, N. (2007). Gamma Radiosensitivity Study on Long Bean (*Vigna sesquipedalis*). *Am. J. Applied Sci*, 12(4), 1090-1093.
- [15] Borzouei, A., Kafi, M., Khazaei, H., Naseriyan, B., & y Majdabadi, A. (2010). Effects of gamma radiation on germination and physiological aspects of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Pak. J. Bot*, 42(4), 2281-2290.
- [16] Mejri, S. M., Voisin, M., Delavault, P., Simier, P., Saidi, M., & y Belhadj, O. (2012). Variation in quantitative characters of faba bean after seed irradiation and associated molecular changes. *Afr. J. Biotechnol*, 11(33).
- [17] Evans, H. (1965). Effects of radiations on meristematised cells. *Radiation Botany*, 5(2), 171-182.
- [18] Gómez, L., Torres, M., & Romero, M. (1984). Inducción de mutaciones en arveja (*Pisum sativum* L.) para la Sierra del Perú. (FAO/IAEA, Ed.) *Induced mutations for crop improvement in America*, 356
- [19] Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología Vegetal*. Castello de la Plana, España: Publicacions de la Universitat Jaume I.
- [20] Balkema, G. (1971). Chimerism and diploptic selection. *PhD Tesis Landlouw hogeschool*. Wageningen, Holanda

- [21] Prina, A., Landau, A., & Pacheco, M. (2012). Chimeras and Mutant Gene Transmission. In. Q. Shu, P. Foster, & H. Nakagawa (Edits.), *Plant Mutation Breeding and Biotechnology* (pp. 184-188). S.L. CABI (Centre for Agriculture Bioscience International) Joint FAO/IAEA.
- [22] Demchenko, S. & Avrutskaya, T. (1979). On the nature of the induced sterility of plants. *Arabidopsis information service*, (16) 84-88.
- [23] Ekberg, I. (1969). Different types of sterility induced in barley by ionizing radiations and chemical mutagens. *Hereditas*. 63, 255-278.
- [24] Timmerman-Vaughan, G., Frew, T., Russell, A., Khan, T. Butler, R., Gilpin, M., Murray, S & Falloon, K. (2002). QTL Mapping of Partial Resistance to Field Epidemics of Ascochyta Blight of Pea. *Crop Sci.* 42:2100–2111.

Generación y selección de mutantes de papa (*Solanum tuberosum*) con resistencia al tizón tardío (*Phytophthora infestans*)

Jorge Rivadeneira^{1*}, Roberto López², María Villavicencio³, Xavier Cuesta¹

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental Santa Catalina (EESC), Programa Nacional de Raíces y Tubérculos. Mejía, Ecuador.

²Universidad Estatal de Bolívar, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Medio Ambiente. Guaranda, Ecuador.

³Escuela Politécnica Nacional, Departamento de Ciencias Nucleares, Quito, Ecuador.

*Autor para correspondencia/ Corresponding autor, e-mail: jorge.rivadeneira@iniap.gob.ec

Generation and selection of potato mutants (*Solanum tuberosum*) with resistance to late blight (*Phytophthora infestans*)

Resumen

El objetivo de esta investigación fue generar y seleccionar mutantes con resistencia al tizón tardío, provenientes de la variedad Superchola, mediante radiaciones con fuente ⁶⁰Co. Los ensayos se implementaron en la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP, para lo cual, se irradiaron explantes de yemas axilares y apicales de papa in vitro de 45 días de crecimiento. La dosis óptima de irradiación para explantes provenientes de yemas apicales fue de 35 Gy y para explantes de yemas axilares fue de 30 Gy. En laboratorio se realizaron tres micropropagaciones sucesivas para generar y estabilizar las mutaciones. Los mutantes sólidos se inocularon con una suspensión de 0.5×10^4 zoosporas ml⁻¹ de *P. infestans* y se evaluaron ocho días después de la inoculación. En campo se midió la respuesta de 116 mutantes al ataque de tizón tardío. Se incluyeron cinco controles, las variedades resistentes INIAP-Santa Catalina, INIAP-Fripapa y las susceptibles Superchola, INIAP-Gabriela y Uvilla. Se utilizó un diseño experimental de látice parcialmente balanceado 11x11 con tres repeticiones. La prueba de separación de medias utilizada fue Tukey al 5%. Las variables evaluadas fueron: área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE), calculada con base en las 12 lecturas de severidad y el rendimiento expresado en kilogramos por planta. Los individuos seleccionados como mutantes sólidos correspondieron al 75% originados de yemas apicales (1319 mutantes) y el 69% originados de yemas axilares (2145 mutantes). El 80% de mutantes de origen axilar y el 62% de origen apical mostraron reacción de susceptibilidad a *P. infestans*. El porcentaje de mutantes sólidos que mostraron una respuesta de resistencia fue reducido en relación a la población inicial, el 20% de mutantes de origen axilar y 38 % de mutantes de origen apical mostraron resistencia a *P. infestans*. En campo para ABCPE se encontraron ocho rangos, las variedades INIAP-Santa Catalina, INIAP-Fripapa y los mutantes m67, m92, m39 se ubicaron en los primeros rangos con valores menores a 2536.24 unidades de ABCPE. Con respecto al rendimiento se



Editado por /
Edited by:
Gabriela Albán

Recibido /
Received:
28/09/2020

Aceptado /
Accepted:
13/10/2020

Publicado en línea /
Published online:
01/04/2021

establecieron tres rangos, los mutantes m42 y m65 se ubicaron en el primer rango con 1.15 kg planta⁻¹. Bajo condiciones de laboratorio se seleccionaron 938 mutantes con resistencia *P. infestans* y 18 en condiciones de campo.

Palabras clave: Explantes, Rendimiento, Severidad, Yemas apicales, Yemas axilares.

Abstract

To generate and select potato mutants from Superchola potato variety with resistance to late blight, an experiment was implemented at the Santa Catalina Research Station of INIAP. It consisted of ⁶⁰Co irradiated explants from axillary and apical buds from 45 old-day *in vitro* potato plants. The optimal irradiation dose for explants from apical buds was 35 Gy and from axillary buds explants was 30 Gy. Three successive micropropagations were performed to generate and stabilize the mutations. Solid mutants were inoculated with a suspension of 0.5 x 10⁴ zoospores ml⁻¹ of *P. infestans*. They were evaluated eight days later. Under field conditions, 116 mutants were assessed for resistance to late blight. Five controls were included, the resistant varieties INIAP-Santa Catalina, INIAP-Fripapa, and the susceptible controls Superchola, INIAP-Gabriela, and Uvilla. A partially balanced 11x11 lattice experimental design with three replications was used. Tukey test at 5% was applied. The variables evaluated were area under the disease progress curve (AUDPC), based on 12 severity readings and the yield expressed in kilograms per plant. The individuals selected as solid mutants corresponded to 75% originating from apical buds (1319 mutants) and 69% originating from axillary buds (2145 mutants). Eighty percent of mutants of axillary origin and 62% of apical origin showed a susceptibility reaction to *P. infestans*. The percentage of solid mutants that showed a resistance response was reduced in relation to the initial population, 20% of mutants were resistant of axillary origin and 38% of mutants of apical origin. For AUDPC, eight ranges were found. INIAP-Santa Catalina, INIAP-Fripapa, m67, m92, m39 were in the first ranges, with AUDPC lower than 2536.24. Regarding yield, three ranges were established. The m42 and m65 mutants were in the first range with 1.15 kg plant⁻¹. In the laboratory, 938 mutants with resistance *P. infestans* were selected. In the field, 18 mutants with resistance *P. infestans* were selected.

Keywords: Apical buds, Axillary buds, Explants, Severity, Yield.

INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los cultivos alimenticios más importantes del mundo después del arroz, trigo y maíz en términos de consumo humano [1]. Más de mil millones de personas en todo el mundo consumen papas y la producción mundial del cultivo superó los 368 millones de toneladas en 2018 [2].

En Ecuador, la producción nacional de papa en el 2018 fue de 269 201 toneladas, cultivadas en 23 974 hectáreas, con un rendimiento promedio de 16.28 t ha⁻¹ [3]. Esta presentó una reducción del 29% respecto al año 2017. Una de las causas se debió al efecto de las plagas que ocasionaron pérdidas en la producción del 13% [4].



El cultivo de papa se ve afectado por factores bióticos (plagas y enfermedades) y abióticos (sequía, bajas temperaturas, calor, entre otros) que afectan la producción y calidad [5,6]. Una de las principales enfermedades que afecta al cultivo es el tizón tardío, causada por un Oomicete denominado *Phytophthora infestans*. Esta enfermedad puede causar pérdidas en el rendimiento superiores al 70% [7,8,9].

La mayoría de variedades de papas cultivadas en Ecuador son susceptibles a tizón tardío y para combatir esta enfermedad una de las estrategias utilizada por los agricultores es el uso de fungicidas. Los agricultores ecuatorianos realizan hasta 23 aplicaciones en variedades susceptibles como es Superhola [10]. Otra alternativa es el mejoramiento genético mediante cruzamientos, selección clonal, selección por pedigrí, mutaciones inducidas entre los principales. La presente investigación tuvo como objetivo generar y seleccionar mutantes de papa con resistencia a *P. infestans* provenientes de la variedad Superchola, obtenidas mediante radiaciones con ^{60}Co .

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

La investigación se efectuó en la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Cantón Mejía, Provincia de Pichincha, ubicada a una altitud de 3050 metros sobre el nivel del mar.

Generación de mutantes

A partir de plántulas de papa de la variedad Superchola cultivadas in vitro, se obtuvieron explantes de yemas apicales y axilares que fueron colocadas en 20 cajas Petri con agua desionizada estéril. Cada caja Petri contenía 50 explantes. En total se utilizaron 500 explantes provenientes de yemas axilares y 500 explantes de yemas apicales. El proceso de irradiación se efectuó con una fuente de ^{60}Co , perteneciente al Departamento de Ciencias Nucleares de la Escuela Politécnica Nacional. Los explantes fueron sometidos a la dosis óptima determinada de 35 Gy para los explantes de yemas apicales y 30 Gy para los explantes de yemas axilares. Posteriormente, los explantes irradiados seleccionados se colocaron en un medio básico de cultivo Murashige & Skoog (M&S) [11]. Se realizaron tres micropropagaciones sucesivas cada 45 días. Los mutantes sólidos (libres de quimeras), provenientes de yemas axilares y apicales identificados, fueron sembrados en frascos de vidrio de un diámetro de 10 cm con medio básico de cultivo M&S. Cada frasco contenía cinco cortes de yemas separados de 2 a 3 cm entre cortes. Las condiciones de crecimiento in vitro fueron de 24 °C, 16 horas de luz.

Inóculo de *Phytophthora infestans*

Para las inoculaciones se utilizó un aislamiento de una raza compleja con 11 genes *R* obtenida de la colección de aislamientos del INIAP. La activación, multiplicación, preparación y aplicación del inóculo de *P. infestans* se lo realizó de acuerdo a la metodología establecida por Gamboa, Pérez, Andrade-Piedra & Forbes (2019) [12].

Selección in vitro

Los mutantes sólidos se inocularon cuando las plántulas presentaron entre tres a cuatro hojas completamente desarrolladas en frascos de vidrio (cinco plántulas por frasco), con una suspensión de 0.5×10^4 zoosporas ml^{-1} de inóculo de *P. infestans*. Después de ocho días de la inoculación, las plántulas fueron evaluadas por su respuesta al aislamiento para lo cual se utilizó la escala utilizada por Huang, Vleeshouwers, Visser & Jacobsen (2005) [13] donde: 1 = lesión extendida con una esporulación masiva; 2 = poca extensión de la lesión o poca esporulación; 3 = lesión sin extensión con poca esporulación; 4 = lesión sin extensión, rastros de necrosis, sin esporulación; y 5 = sin síntomas.

Evaluación en campo

Se evaluaron 116 plantas mutantes que presentaron resistencia a tizón tardío en condiciones de laboratorio. Se utilizaron cinco variedades testigo: INIAP-Santa Catalina, INIAP-Fripapa, como resistentes, e INIAP-Gabriela, Superchola y Uvilla como susceptibles. El diseño experimental utilizado fue látice parcialmente balanceado 11x11 con tres repeticiones. Se utilizó la prueba de Tukey al 5% para los tratamientos que presentaron diferencias estadísticas. Las variables evaluadas fueron severidad a tizón tardío expresada en valores de área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) y rendimiento en kilogramos por planta [14]. La severidad se evaluó cada 7 días a libre infección a partir de los 45 días después de la siembra, en total se realizaron 12 lecturas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mutantes sólidos

Los individuos seleccionados como mutantes sólidos, correspondieron al 75% originados de yemas apicales (1319 mutantes), mientras que un 25 % fueron deformes (434 mutantes); y 69% seleccionados de yemas axilares (2145 mutantes), con 31% de deformes (976 mutantes). En total se generaron 3464 mutantes sólidos y 1410 mutantes deformes. Las yemas apicales y axilares provenientes de Superchola in vitro irradiadas con fuente ^{60}Co generaron una población de mutantes sólidos. Bado *et al.*, (2016) [15] menciona que este método de cultivos in vitro de papa irradiados con una fuente de ^{60}Co es una alternativa eficaz para generar variación genética.

Reacción a *Phytophthora infestans* de mutantes in vitro

Se evaluaron 1319 mutantes sólidos provenientes de yemas apicales. Se identificó que el 38% presentaron una respuesta de resistencia a *P. infestans* ubicándose en la escala 4 y 5 con 316 y 182 mutantes, respectivamente; mientras que el 62% de los mutantes mostraron una reacción de susceptibilidad ubicándose en la escala 1 y 2, con 451 y 370 mutantes, respectivamente. Los mutantes sólidos provenientes de yemas axilares evaluados fueron 2145, de los cuales el 20% mostraron una respuesta de resistencia a *P. infestans* y se ubicaron en la escala 4 y 5, con 179 y 261 mutantes, respectivamente. El 80% de las yemas axilares mostraron susceptibilidad y se ubicaron en la escala 1 y 2, con 1044 y 1482 mutantes, respectivamente. En total, se evaluaron 3464 mutantes sólidos provenientes de yemas apicales y axilares y solo el 27.08%



(938 mutantes) presentaron resistencia a *P. infestans*. Gosal *et al.*, (2001) [16] en su evaluación in vitro de mutantes provenientes de dos variedades presentaron valores similares con 42% y 36% de mutantes con resistencia a *P. infestans*, mientras Al-Safadi & Arabi (2003) [5] en su evaluación in vitro a *P. infestans* en mutantes provenientes de tres variedades obtuvo menos del 5% de mutantes con resistencia a tizón tardío.

El análisis de la varianza para ABCPE y rendimiento por planta (RP) estableció diferencias significativas al 1% de probabilidad. El promedio general fue de 3261.31 y 0.60 para ABCPE y kg planta⁻¹, respectivamente. El coeficiente de variación (CV) fue de 15.92% y 45.60% para ABCPE y para RP, respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis de varianza para ABCPE y RP en la evaluación de mutantes con resistencia a *P. infestans* en la variedad Superchola, EESC, Ecuador.

Fuente de Variación	GL	Cuadrados Medios	
		ABCPE	RP
Total	362	-	-
Repetición	2	5.82 ^{ns}	38.96 ^{ns}
Mutantes	120	2.51**	2.10**
Bloque ajustado	10	2.01**	4.59**
Error Intrabloque	132	2.52**	2.84**
Error	230		
CV (%)		15.92	45.60
PG		3261.31	0.60

**Significativa al 1%;^{ns} no significativo; CV=coeficiente de variación; PG= promedio general; ABCPE=área bajo la curva de progreso de la enfermedad; RP=rendimiento por planta (kg).

Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE)

Al realizar la prueba de Tukey al 5% para ABCPE se encontraron ocho rangos. Las variedades INIAP-Santa Catalina, INIAP-Fripapa y los mutantes m67, m92, m39 se ubicaron en los primeros tres rangos con valores menores a 2536.25 unidades de ABCPE; mientras que el mutante m75 se ubicó en el último rango con 4829.52 unidades de ABCPE (Tabla 2). Los tres mutantes (m67, m92, m39) mostraron la mayor resistencia a *P. infestans* lo que representan el 2.59% de los mutantes evaluados (116 mutantes). Kowalski & Cassells (1999) [17] obtuvieron un porcentaje mayor de mutantes con resistencia a tizón tardío (7%) provenientes de una variedad comercial. Dentro de las variedades testigo, Superchola y Uvilla fueron los más susceptibles a *P. infestans* con valores de 3716.86 y 4237.14 unidades de ABCPE, respectivamente. A pesar de que existió variación en la respuesta de los mutantes a *P. infestans*, no se encontraron mutantes con mayor resistencia a la mostrada por la variedad testigo INIAP-Santa Catalina.

Rendimiento por planta (RP)

Al realizar la prueba de Tukey al 5% para RP se establecieron tres rangos, los mutantes m42, y m65 se ubicaron en el primero con 1.15 kg planta⁻¹. La variedad INIAP-Santa Catalina y el

mutante m49 se ubicaron en el segundo con rendimientos entre 1.09 y 1.12 kg planta⁻¹, respectivamente; mientras que los mutantes m115, m37, m69 y m24 se encontraron en el último rango con rendimientos inferiores a 0.24 kg planta⁻¹. Las variedades susceptibles Superchola, Uvilla e INIAP-Gabriela presentaron rendimientos de 0.85, 0.40 y 0.30 kg planta⁻¹, respectivamente (Tabla 2). Al comparar el rendimiento de los mutantes m42, m65 y m49 con Superchola (variedad de la que provienen los mutantes), se observó un incremento en el rendimiento de entre el 24.11% al 26.09%. Resultados similares lo obtuvo Salomón, González, Castillo & Varela (2017) [18] al evaluar mutantes provenientes de una variedad irradiada con fuente ⁶⁰Co (30 Gy), que reportó un incremento promedio del rendimiento por planta de 43.86% comparado con la variedad de origen de los mutantes. Se identificó mutantes con rendimientos similares o superiores a las variedades resistentes, los cuales tienen potencialidad para seguir sus evaluaciones dentro del esquema de mejoramiento del Programa Nacional de Raíces y Tubérculos, rubro papa, del INIAP establecido en Cuesta, Rivadeneira & Monteros (2015) [14].

Tabla 2. Promedio y prueba de Tukey al 5% para ABCPE, RP en materiales mutantes y variedades testigo en la EESC, Ecuador.

Genotipos	ABCPE	RP	Genotipos	ABCPE	RP	Genotipos	ABCPE	RP
I-Sta. Catalina	1638.88a	1.09 ab	m32	3084.74 a-g	0.57 abc	m116	3401.96 b-h	0.38 abc
I-Fripapa	2304.69 ab	0.72 abc	m63	3086.54 a-g	0.63 abc	m70	3404.18 b-h	0.52 abc
m67	2373.31 abc	0.70 abc	m107	3089.55 a-g	0.50 abc	m1	3436.73 b-h	0.72 abc
m92	2522.07 a-d	0.73 abc	m52	3097.66 a-g	0.32 abc	m74	3443.41 b-h	0.72 abc
m39	2536.24 a-d	1.02 abc	m103	3110.44 a-g	0.56 abc	m35	3450.19 b-h	0.70 abc
m57	2583.76 a-e	0.30 abc	m110	3113.40 a-g	0.73 abc	m51	3466.42 b-h	0.85 abc
m113	2610.05 a-f	1.00 abc	m16	3117.79 a-g	0.50 abc	m104	3479.71 b-h	0.60 abc
m25	2626.14 a-f	0.82 abc	m86	3132.67 a-g	0.72 abc	m80	3501.92 b-h	0.52 abc
m8	2661.35 a-f	0.45 abc	m41	3141.97 a-g	0.58 abc	m17	3508.03 b-h	0.37 abc
m58	2692.00 a-f	0.82 abc	m81	3148.38 a-h	0.27 bc	m56	3510.17 b-h	0.78 abc
m117	2709.69 a-f	0.27 bc	m47	3148.99 a-h	0.90 abc	m53	3531.11 b-h	0.53 abc
m77	2716.60 a-f	0.40 abc	m96	3171.58 a-h	0.79 abc	m48	3568.36 b-h	0.78 abc
m11	2723.96 a-f	0.72 abc	m4	3176.69 a-h	0.57 abc	m15	3569.84 b-h	0.28 abc
m89	2736.12 a-f	1.05 abc	m38	3178.65 a-h	0.30 abc	m98	3631.96 b-h	0.63 abc
m112	2757.30 a-f	0.82 abc	m65	3200.22 a-h	1.15 a	m105	3642.09 b-h	0.52 abc
m49	2757.30 a-f	1.12 ab	m30	3200.61 a-h	0.42 abc	m40	3654.79 b-h	0.97 abc
m13	2778.92 a-f	0.81 abc	m62	3201.52 a-h	0.62 abc	m19	3703.32 b-h	0.32 abc
m111	2790.44 a-f	0.55 abc	m12	3226.16 a-h	0.47 abc	m85	3712.00 b-h	0.37 abc
m43	2798.96 a-f	0.62 abc	m9	3229.18 a-h	0.47 abc	m109	3716.49 b-h	0.28 abc
m55	2806.70 a-f	1.03 abc	I-Gabriela	3235.66 a-h	0.30 abc	Superchola	3716.86 b-h	0.85 abc
m120	2809.37 a-f	0.65 abc	m26	3248.74 a-h	0.78 abc	m6	3717.94 b-h	0.58 abc
m73	2814.27 a-f	0.75 abc	m66	3252.00 a-h	0.70 abc	m28	3731.48 b-h	0.41 abc
m7	2830.67 a-f	0.80 abc	m45	3260.23 a-h	0.98 abc	m95	3749.01 b-h	0.75 abc
m100	2885.27 a-f	0.37 abc	m64	3263.34 a-h	0.78 abc	m68	3761.29 b-h	0.38 abc
m82	2889.57 a-f	0.60 abc	m44	3263.46 a-h	0.60 abc	m106	3762.99 b-h	0.63 abc
m83	2915.43 a-f	0.65 abc	m37	3275.50 a-h	0.22 c	m76	3778.66 b-h	0.47 abc
m46	2933.25 a-f	0.77 abc	m36	3286.74 a-h	0.47 abc	m18	3780.87 b-h	0.27 bc



Genotipos	ABCPE	RP	Genotipos	ABCPE	RP	Genotipos	ABCPE	RP
m23	2939.61 a-f	0.70 abc	m34	3298.76 a-h	0.60 abc	m31	3837.26 b-h	0.90 abc
m10	2942.65 a-f	0.72 abc	m2	3299.64 a-h	0.62 abc	m60	3899.86 b-h	0.33 abc
m94	2963.57 a-f	0.45 abc	m72	3304.09 a-h	0.68 abc	m115	3965.68 b-h	0.23 c
m22	2985.89 a-f	0.50 abc	m119	3321.96 b-h	0.50 abc	m69	3972.43 b-h	0.20 c
m79	2992.32 a-f	0.49 abc	m21	3326.85 b-h	0.67 abc	m33	4001.49 c-h	0.67 abc
m97	3000.48 a-f	0.80 abc	m24	3335.11 b-h	0.20 c	m121	4067.44 d-h	0.26 bc
m59	3022.15 a-f	0.80 abc	m42	3349.73 b-h	1.15 a	m108	4103.35 d-h	0.35 abc
m71	3024.59 a-f	0.38 abc	m61	3363.10 b-h	0.73 abc	m88	4154.72 d-h	0.25 bc
m5	3032.32 a-f	0.39 abc	m14	3364.03 b-h	0.40 abc	Uvilla	4237.14 e-h	0.40 abc
m29	3036.12 a-f	0.38 abc	m20	3375.94 b-h	0.63 abc	m93	4286.72 fgh	0.77 abc
m91	3041.42 a-g	0.77 abc	m27	3380.96 b-h	0.53 abc	m114	4723.74 gh	0.33 abc
m87	3049.65 a-g	0.72 abc	m101	3382.33 b-h	0.68 abc	m75	4829.52 h	0.47 abc
m54	3061.45 a-g	0.63 abc	m90	3393.50 b-h	0.32 abc			
m3	3074.96 a-g	0.45 abc	m50	3400.01 b-h	0.60 abc			

¹Letras diferentes indican diferencias estadísticas según Tukey al 5%; RP = rendimiento por planta; ABCPE = área bajo la curva de progreso de la enfermedad; RP=rendimiento por planta (kg). I= INIAP.

CONCLUSIONES

El uso de radiación con fuente ⁶⁰Co es una alternativa válida para generar variación para resistencia a tizón tardío. La evaluación de mutantes in vitro para *P. infestans* es una opción para una selección preliminar cuando existen grandes poblaciones. Las evaluaciones en campo permitieron identificar 18 mutantes que mostraron características de resistencia a *P. infestans* y buenos rendimientos.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se ejecutó en el marco del proyecto del Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) "Inducing Mutation in Agriculture with the Aid of Radiation". Un resumen de este trabajo se presentó en el II Simposio Latinoamericano de Aplicaciones Nucleares en la Agricultura realizado en marzo de 2020 en la ciudad de Quito, Ecuador.

Al Laboratorio de Tecnología de Radiaciones del Departamento de Ciencias Nucleares de la Escuela Politécnica Nacional por el apoyo y colaboración en los procesos de irradiación al material vegetal con la fuente de ⁶⁰Co.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

Jorge Rivadeneira y Xavier Cuesta concibieron la investigación; Roberto López y María Villavicencio desarrollaron la metodología, análisis estadístico y realizaron el trabajo de laboratorio y campo; Jorge Rivadeneira y Xavier Cuesta redactaron el manuscrito; Xavier Cuesta revisó críticamente el contenido del manuscrito.

REFERENCIAS

- [1] Zhang, S., Zheng, X., Reiter, R., Feng, S., Wang, S., Liu, S., Jin, L., Li, Z., Datla, R. & Ren, M. (2017). Melatonin Attenuates Potato Late Blight by Disrupting Cell Growth, Stress Tolerance, Fungicide Susceptibility and Homeostasis of Gene Expression in *Phytophthora infestans*. *Frontier in Plant Science*. 8:1993. Doi: 10.3389/fpls.2017.01993
- [2] FAO. (2020). FAOSTAT Statistics Database 2018. Consultado abril del 2020. Disponible en: [<http://www.fao.org/faostat/en/#data>].
- [3] Instituto Nacional de estadística y censos - INEC. (2019). Encuesta y superficie y producción agropecuaria continua. <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/>
- [4] Ministerio de Agricultura y Ganadería - MAG. (2019). "Sistema de Información Pública Agropecuaria. <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/papa>
- [5] Al-Safadi, B. & Arabi, M. (2003). In vitro induction, isolation and selection of potato mutants resistant to late blight. *J.Genet & Breed.*, 57:364-359.
- [6] Gabriel, J., Ruiz, I. & Cuesta, X. (2018). Ampliando la frontera agrícola de la papa (*Solanum tuberosum* L.) para disminuir los efectos del cambio climático. *Universidad y Sociedades*. 10(1):46-51.
- [7] Sedláková, V., Dejmálová, J., Hausvater, E., Sedlák, P., Doležal, P. & Mazáková, J. (2011). Effect of *Phytophthora infestans* on potato yield in dependence on variety characteristics and fungicide control. *Plant, Soil and Environment*. 57:486-491.
- [8] Fry, W., Birch, P., Judelson, H., Grünwald, N., Danies, G., Everts, K., Gevens, A., Gugino, B., Johnson, D., Johnson, S. et al. (2015). Five reasons to consider *Phytophthora infestans* a Reemerging Pathogen. *Phytopathology*, 105: 966-981.
- [9] Lenman, M., Ali, A., Mühlenbock, P., Carlson-Nilsson, U., Liljeroth, E., Champouret, N., Vleeshouwers, V. & Andreasson, E. (2015). Effector-driven marker development and cloning of resistance genes against *Phytophthora infestans* in potato breeding clone SW93-1015. *Theor Appl Genet*. 129: 105–115. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2613>
- [10] Unda, J., Suquillo, J., Sevillano, C., Pumisacho, M., Ochoa, J. & Barrera, V. (2013). Diagnóstico del manejo de Tízón tardío en la provincia del Carchi, Ecuador. V Congreso Ecuatoriano de la papa.
- [11] Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum*, (15), 473-497.
- [12] Gamboa, S., Pérez, W., Andrade-Piedra, J. & Forbes, G. (2019). Laboratory manual for *Phytophthora infestans* work at CIP. Lima, Perú: International Potato Center. 78pp.
- [13] Huang, S., Vleeshouwers, V., Visser, R. & Jacobsen, E. (2005). An accurate in vitro assay for high-throughput disease testing of *Phytophthora infestans* in potato. *Plant Dis*. 89:1263-1267.
- [14] Cuesta, X., Rivadeneira, R. & Monteros, C. (2015). *Mejoramiento genético de papa: conceptos, procedimientos, metodologías y protocolos*. Quito, Ecuador. Insituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. 62 p.
- [15] Bado, S., Rafiri, M., El-Achouri, K., Sapey, E., Nielen, S., Ghanim, A., Forster, B. & Laimer, M. (2016). In vitro methods for mutation induction in potato (*Solanum tuberosum* L.). *African Journal of Biotechnology*, 15, 39.
- [16] Gosal, S.S., Das, A., Gopal, J., Minocha, J.L., Chopra, H.R., & Dhaliwal, H.S. (2001). *In vitro induction of variability through radiation for late blight resistance and heat tolerance in potato* (IAEA-TECDOC--1227). International Atomic Energy Agency (IAEA)
- [17] Kowalski, B. & Cassells, A. (1999). Mutation breeding for yield and *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary folia resistance in potato (*Solanum tuberosum* L: cv Golden Wonder) using computerized image analysis in selection. *Potato Research*. 42:121-130.
- [18] Salomón, J., González, M., Castillo, J. & Varela, M. (2017). Comportamiento de "Barna", cultivar de papa (*Solanum tuberosum* L.) ante diferentes dosis de rayos gamma de Fuente cobalto 60. *Cultivos Tropicales*, 38(4):127-130.

Determinación de la dosis letal media (DL50) para mutaciones inducidas con rayos gamma en dos variedades de cebada (*Hordeum Vulgare* L.)

Javier Garófalo Sosa*¹, Luis Ponce-Molina¹, Patricio Noroña Zapata¹, Diego Campaña Cruz¹

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias – INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Mejía, Ecuador

*Autor para correspondencia/ Corresponding autor, e-mail: javier.garofalo@iniap.gob.ec

Determination of the medium lethal dose (LD50) for gamma rays induced mutations in two barley varieties (*Hordeum Vulgare* L.)

Resumen

La cebada es un cultivo de importancia económica, social y alimentaria en la Sierra ecuatoriana. La cebada es el segundo cereal más cultivado en Ecuador y el cuarto a nivel mundial. La inducción de mutaciones es una técnica de mejoramiento que permite generar variabilidad genética; es por ello, que el INIAP está empleando esta técnica en el cultivo de cebada en busca de germoplasma con características deseables. El objetivo principal de esta investigación fue determinar la dosis letal media (LD50) de irradiación para inducir mutaciones en dos variedades de cebada, usando para ello cinco dosis de rayos gamma (0, 100, 150, 200 y 250 Gy). Los parámetros evaluados fueron: germinación (en invernadero); emergencia, altura de plántula y vigor (en campo). Los resultados mostraron que las variedades respondieron de diferente forma en las distintas dosis empleadas; sin embargo, fue evidente que a medida que la dosis aumentaba, la emergencia, altura de plántula y vigor, se afectaban y mermaban. Se determinó que la dosis letal media se encuentra entre los 150 y 200 Gy. Sin embargo, la dosis que produjo ligeros cambios morfológicos en los materiales y que se la considera como la dosis óptima es la de 150 Gy.

Palabras clave: Cereales, DL50, Irradiación, Mejoramiento, Mutantes.

Abstract

Barley is a crop of economic, social and food importance in the Ecuadorian highlands. Barley is the second most cultivated cereal in Ecuador and the fourth in the world. Induced mutation is an improvement technique that allows generates genetic variability; that's why, INIAP is applying this technique in the barley crop in search of germplasm with desirable characteristics. The main objective of this research was to determine the medium lethal dose (LD50) of irradiation to induce mutations in two barley varieties, using five doses of gamma rays (0, 100, 150, 200 and 250 Gy). The parameters evaluated

Editado por /
Edited by:
Gabriela Albán

Recibido /
Received:
04/10/2020

Aceptado /
Accepted:
12/11/2020

Publicado en línea /
Published online:
01/04/2021

were: germination (in greenhouse); emergency, seedling height and vigor (in the field). The results showed that the varieties responded in different ways to the distinct doses used, however, it was evident that as the dose increased, the emergency, seedling height and vigor were affected and diminished. The medium lethal dose was determined to be between 150 and 200 Gy. However, the dose that produced slight morphological changes in the materials and is considered like the optimal dose is 150 Gy.

Keywords: Cereals, Irradiation, LD50, Mutants, Plant breeding.

INTRODUCCIÓN

En Ecuador el cultivo de cebada (*Hordeum vulgare* L.) es el segundo cereal de más amplia distribución en la Sierra ecuatoriana, después del maíz, y se ha difundido entre los 2400 y 3500 m.s.n.m. [1]. En el año 2019, la superficie dedicada al cultivo de cebada fue 9715 hectáreas, distribuidas entre las 10 provincias de la sierra, con una producción de 13450 toneladas, mientras que las importaciones superaron las 72 mil toneladas [2]. Alrededor de 10 mil familias de los sectores marginales de la región andina cultivan este cereal para su alimentación básica, por lo que es considerado un cultivo de seguridad alimentaria [3].

Los problemas que afectan a la cebada son los factores bióticos (enfermedades) y abióticos (condiciones climáticas y de suelo) [4]. En Ecuador, el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), es el encargado de buscar soluciones a través del desarrollo de nuevas tecnologías, como la generación de variedades mejoradas que presenten precocidad, resistencia a enfermedades, calidad y alto rendimiento. Para ello, uno de los métodos de mejoramiento utilizado son las mutaciones inducidas [5].

Las mutaciones inducidas han sido usadas para el mejoramiento genético de cultivos reproducidos por semillas como trigo, cebada, entre otros [6]. El uso de las mutaciones en el mejoramiento de especies agronómicas es mejorar uno o varias características de variedades adaptadas a diferentes condiciones edafoclimáticas, como altura de planta [7], tolerancia a factores biótico y abióticos [8].

Las mutaciones inducidas son provocadas por agentes exógenos (físicos, químicos y biológicos) conocidos como mutágenos, que modifican el ADN, causando mutaciones de tipo puntual, deleciones y aberraciones en los cromosomas, provocando cambios importantes en la estructura genómica de los individuos [9]. Los mutágenos físicos, específicamente las radiaciones de tipo gamma, penetran los tejidos vivos [10]. La mutación inducida por mutágenos físicos (rayos X y rayos gamma) es una fuente importante de creación de variación genética al ampliar los acervos genéticos en una especie y lograr asociarlo con la mejora de cultivos [11]. Adicionalmente, los rayos gamma son amigables para el medio ambiente y la humanidad [12].

La magnitud de las alteraciones cromosómicas depende de las dosis e intensidad de los rayos gamma [11,13]. En las mutaciones inducidas, lo más importante es determinar



primero la dosis letal media (DL50) de cada radiación en relación con una especie vegetal en particular [14,15]. Una vez que se determina la DL50, sobre la base de diferentes cambios, especialmente morfológicos, es posible determinar el nivel máximo permisible de exposición a la radiación de un cultivo en particular, ya que existen posibilidades de fracaso de los experimentos si las dosis no son precisas. Las dosis más bajas no crean variabilidad; pero pueden generar hormesis (aumento de división celular, crecimiento y desarrollo en el organismo) [16] y dosis más altas pueden inducir letalidad [17]. Para que un programa de mutaciones inducidas sea eficiente, es necesario generar un apreciable número de variaciones (eventos mutacionales) y poblaciones grandes que permitan un adecuado *screening* de los genotipos deseados [18].

El acame se lo denomina al desplazamiento del tallo de la planta de su posición vertical, provocando que el cultivo se tienda al nivel del suelo, afectando al rendimiento y calidad de grano de la cebada. Este problema está relacionado con la altura de la planta [19].

El objetivo de esta investigación fue determinar la DL50 de la irradiación con rayos gamma de semillas de dos variedades de cebada, a través de la evaluación en laboratorio y campo; del porcentaje de emergencia, altura y vigor de plántulas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se implementaron en la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) ubicada en la parroquia Cutuglagua, cantón Mejía, provincia de Pichicha. Latitud: $-0,369794^{\circ}$, Longitud: $-78,553326^{\circ}$.

Las variedades de cebada que se utilizaron en el estudio fueron: la variedad mejorada INIAP-Cañicapa 2003 de dos hileras (díctica) de grano cubierto; y la variedad criolla Rita Pelada de seis hileras (hexástica) de grano desnudo. Las características morfológicas a mejorar en las variedades fueron: para INIAP-Cañicapa 2003 reducir altura de planta y para Rita Pelada la resistencia al acame. Las semillas empleadas fueron de alta calidad física como biológica, con porcentajes de germinación superiores a 90% y con una humedad del 12%.

Para la irradiación de las semillas se usó rayos gamma, a través de un irradiador categoría I con una fuente de cobalto 60 de la Subsecretaría de Control y Aplicaciones Nucleares (SCAN) del Ministerio de Energía y Recursos Naturales No Renovables (MERNNR). Para calcular los tiempos de irradiación según la dosis, se basó en la calibración del irradiador con un valor $14.13 \text{ Gy min}^{-1}$.

Los factores en estudio incluyeron las dos variedades de cebada (INIAP-Cañicapa 2003 y Rita Pelada) y cinco dosis de irradiación (d1: 0 Gy - testigo, d2: 100 Gy, d3: 150 Gy, d4: 200 Gy y d5: 250 Gy), dando en total 10 tratamientos (Tabla 1). Los tiempos de irradiación según la dosis fueron: 7.08 minutos para 100 Gy, 10.62 minutos para 150 Gy: 14.15 minutos para 200 Gy y 17.69 minutos para 250 Gy.

Tabla 1. Tratamientos determinados en estudio de pruebas de determinación de DL50 en cebada.

Tratamiento	Codificación
t1	INIAP-Cañicapa 2003 (testigo)
t2	INIAP-Cañicapa 2003 a 100 Gy
t3	INIAP-Cañicapa 2003 a 150 Gy
t4	INIAP-Cañicapa 2003 a 200 Gy
t5	INIAP-Cañicapa 2003 a 250 Gy
t6	Rita Pelada (testigo)
t7	Rita Pelada a 100 Gy
t8	Rita Pelada a 150 Gy
t9	Rita Pelada a 200 Gy
t10	Rita Pelada a 250 Gy

La determinación de la dosis letal media (DL50) en cebada se realizó en dos fases: en laboratorio y en campo. En laboratorio, se determinó el porcentaje de germinación de las semillas irradiadas en cuatro repeticiones: se colocaron 100 semillas por cada tratamiento en papel secante y se dejó en una cámara de germinación a una humedad de 90% y temperatura de 22°C. La implementación se realizó en base a un Diseño Completamente al Azar (DCA). A los ocho días después de la siembra se contabilizó el número de semillas germinadas y se las expresó en porcentaje de germinación.

Para la fase de campo, en camas de 7.50 m² (1.50 m x 5 m), se sembró los diferentes tratamientos, conformado por 50 semillas. La siembra se realizó bajo un Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA) en cuatro repeticiones. Después de 11 días, se contabilizó la cantidad de semillas germinadas y se lo expresó en porcentaje de emergencia. A los 19 días posteriores a la siembra se determinó la altura de las plántulas en centímetros, desde la base hasta la parte terminal de las mismas; adicionalmente se evaluó de forma visual el vigor de las plántulas por cada tratamiento, empleando una escala cualitativa: MB= muy bueno, B= bueno, R= regular y M= malo. Con todas las variables evaluadas, se procedió a realizar el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de separación de medias de Tukey al 5 %, utilizando para el efecto el programa estadístico InfoStat Versión Profesional 2019.

RESULTADOS

En el ANOVA (Tabla 2) para porcentaje de germinación en laboratorio, se observó diferencias altamente significativas entre variedades, diferencias significativas entre dosis de irradiación y ninguna significación estadística para repeticiones y la interacción



variedades por dosis. El promedio general de germinación en laboratorio fue de 82.2%, con un coeficiente de variación de 0.5%, que demuestra la confiabilidad de los resultados obtenidos.

Tabla 2. ANOVA para porcentaje de emergencia en laboratorio en estudio de determinación de DL50 en cebada.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Cuadrados medios
Total	39	
Repeticiones	3	57.2
Variedades (V)	1	2160.9 **
Dosis irradiación (D)	4	122.0 *
V x D	4	39.4 n.s.
Error	27	28.4

Promedio: 82.2%

CV: 0.5%

Nivel de significancia 5%: (**) altamente significativo, (*) significativo, (n.s.) no significativo.
CV: coeficiente de variación.

La alta significancia estadística para variedades (Tabla 3), indicó que el porcentaje de germinación no se expresó por igual entre ellas, influyendo las dosis de irradiación. INIAP-Cañicapa 2003 obtuvo un valor de 89.6% y Rita Pelada un valor de 74.9% (Fig. 1).

Tabla 3. Prueba Tukey al 5% para variedades en el porcentaje de emergencia en laboratorio en estudio de determinación de DL50 en cebada.

Variedad	Germinación (%)	Rangos de significación*
INIAP-Cañicapa 2003	89.6	a
Rita Pelada	74.9	b

* Promedios con diferente letra son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

Figura 1. Germinación de semillas en laboratorio de dos variedades de cebada en pruebas de determinación de DL50 en cebada.



A = INIAP-Cañicapa 2003 y B = Rita Pelada

A pesar de la significancia estadística para el factor dosis de irradiación, la prueba Tukey al 5%, detectó un solo rango de significación estadística (Tabla 4) con valores entre 79.0 a 88.8% de porcentaje de germinación.

Tabla 4. Prueba Tukey al 5% para porcentaje de emergencia en laboratorio por dosis de irradiación en pruebas de determinación de DL50 en cebada.

Dosis (Gy)	Porcentaje de germinación (%)	Rangos de significación
0	88.8	a
100	82.5	a
150	81.5	a
200	79.5	a
250	79.0	a

* Promedios con diferente letra son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

Para las variables de campo, el ANOVA (Tabla 5) para porcentaje de emergencia, se observó diferencias altamente significativas para variedades y dosis y ninguna significancia estadística para repeticiones e interacción variedades por dosis. El promedio para porcentaje de germinación en campo fue de 53.8%, con un coeficiente de variación de 10.8%, que demuestran la confiabilidad de los resultados obtenidos.

Tabla 5. ANOVA para porcentaje de emergencia y altura de planta en campo en pruebas de determinación de DL50 en cebada.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Cuadrados medios			
		Emergencia (%)		Altura planta (cm)	
Total	39				
Repeticiones	3	45.6	n.s.	1.4	n.s.
Variedades	1	3027.6	**	240.6	**
Dosis	4	1455.8	**	28.3	**
V x D	4	11.4	n.s.	6.5	**
Error	27	33.7		0.7	
Promedio		53.8		8.3	
CV (%)		10.8		10.4	

Nivel de significancia 5%: (**) altamente significativo, (*) significativo, (n.s.) no significativo.
CV: coeficiente de variación.

En la variable porcentaje de emergencia, la prueba Tukey al 5% para variedades (Tabla 6) detectó dos rangos de significación estadística, ubicándose en el primer rango la variedad INIAP-Cañicapa 2003 con 62.5% y en el último rango la variedad Rita Pelada con 45.1%.

Tabla 6. Prueba Tukey al 5% para variedades en el porcentaje de germinación en campo en pruebas de determinación de DL50 en cebada.

Variedades	Germinación (%)	
INIAP-Cañicapa 2003	62.5	a
Rita Pelada	45.1	b

* Promedios con diferente letra son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

La prueba Tukey al 5% para el factor dosis de irradiación (Tabla 7) detectó tres rangos de significación estadística, ubicándose en el primer rango los niveles 0, 100 y 150 Gy con los mejores porcentajes de emergencia: 68.0, 61.5 y 58.5%, respectivamente. En el segundo rango el nivel de 200 Gy con un valor promedio de 47.2 % de emergencia y en el último rango se ubicó el nivel de 250 Gy con porcentajes de emergencia de 33.8% (Fig. 1).

Tabla 7. Tukey al 5% para dosis de irradiación en porcentaje de germinación en campo en pruebas de determinación de DL50 en cebada.

Nivel	Dosis (Gy)	Promedio (%)	Rango de significación
n1	0	68.0	a
n2	100	58.5	ab
n3	150	61.5	a
n4	200	47.2	b
n5	250	33.8	c

* Promedios con diferente letra son estadísticamente diferentes (P < 0.05).

En el ANOVA (Tabla 5), la variable altura de plantas mostró una alta significancia estadística para variedades, dosis de irradiación e interacción variedades por dosis de irradiación; y ninguna significancia estadística para repeticiones. El promedio general de altura de planta fue 8.3 cm con un coeficiente de variación de 10.4%.

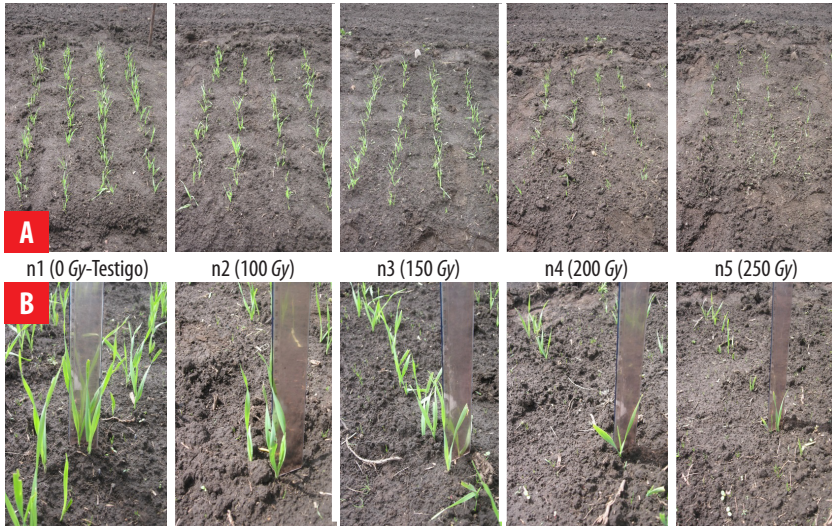
En la variable altura de planta, la alta significancia estadística para la interacción variedades por dosis, indicó que existe una relación entre los factores en estudio. En la Tabla 8, se observó que la variedad INIAP-Cañicapa 2003 en las diferentes dosis de irradiación presentó valores y rangos altos de altura de planta en comparación a la variedad Rita Pelada, que presentó valores y rangos bajos, debido posiblemente al tipo de grano de cada variedad (Fig. 2).

Tabla 8. Prueba Tukey al 5% para la interacción variedades por dosis para altura de planta en campo de irradiación en pruebas de determinación de DL50 en cebada.

Dosis (Gy)	INIAP-Cañicapa 2003		Rita Pelada	
0	14.5	a*	7.0	de
100	11.8	b	7.0	de
150	10.1	bc	6.2	e
200	8.5	cd	5.8	e
250	8.6	cd	3.1	f

* Promedios con diferente letra son estadísticamente diferentes (P < 0.05).

Figura 2. Germinación de semillas y altura de planta en campo de dos variedades de cebada en pruebas de determinación de DL50.



A = Rita Pelada y B = INIAP-Cañicapa 2003

En la variable vigor de planta (Tabla 9), se observa que en las variedades INIAP-Cañicapa 2003 y Rita Pelada, a partir de las dosis de irradiación de 150 Gy a 250 Gy existió una pérdida de vigor de planta, en comparación al testigo (0 Gy).

Tabla 9. Vigor de planta en campo en pruebas de determinación de DL50 de cebada.

Dosis (Gy)	INIAP-Cañicapa 2003	Rita Pelada
0	MB	B
100	B	B
150	B	R
200	R	M
250	M	M

MB= muy bueno, B= bueno, R= regular y M= malo

Con base a los resultados obtenidos, se determinó que la DL50 se encuentra entre los niveles de 150 y 200 Gy, que provocaron daños menores en las plantas, con ligeras diferencias fenotípicas, comparadas con el testigo, tanto en porcentaje de germinación, como en altura de planta y vigor, para las dos variedades.

DISCUSIÓN

En el porcentaje de germinación en laboratorio, pese a que no se pudo evidenciar diferencias estadísticas en los promedios, existió una disminución gradual en el porcentaje de germinación al incrementarse la dosis; siendo el tratamiento con el menor promedio la dosis de 250 Gy. De acuerdo a Mayta [20], la disminución en la germinación se debe al daño fisiológico que produce el mutágeno a la semilla y depende mucho de los grados de radio sensibilidad de las especies.

Rozman [21], realizó una investigación en cebada bajo condiciones contraladas y determinó diferencias estadísticas de germinación al utilizar una dosis de 400 Gy (70.5 %, a), mientras que los otros tres tratamientos (testigo, 100 y 200 Gy) no mostraron diferencias estadísticas (90.5%, b; 90.6%, b; y 86.8%, b, respectivamente), coincidiendo con los resultados encontrados en el presente estudio [21].

Sin embargo, Sarduié-Nasab, Sharifi-Sirchi, & Torabi-Sirchi [22], encontraron en su estudio realizado con la variedad de cebada Nosrat, diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos frente al testigo, empleando un rango más amplio para las irradiaciones (testigo, 200, 700 y 1200 Gy). Estos resultados, a pesar de ser diferentes variedades, no concuerdan con los obtenidos en este estudio, obteniéndose diferencias significativas con el testigo y la dosis de irradiación con 200 Gy (97%, a y 66% b, respectivamente) al determinar la germinación en condiciones de laboratorio [22].

El porcentaje de emergencia observado en todos los tratamientos en campo fue menor al que se obtuvo en condiciones de laboratorio, siendo el tratamiento de 250 Gy, aquel que presentó los menores promedios (33.8%); los cuales concuerdan con los reportados por Sarduié-Nasab et al. [22], quienes determinaron que los porcentajes de emergencia de semilla irradiada del cultivar de cebada Nosrat, presentaron diferencias significativas entre el testigo y las diferentes dosis de irradiación con rayos gama, siendo comparable a los resultados encontrados en este estudio, donde el testigo presentó un 81 % de emergencia y el tratamiento a 200 Gy un 56 %. En el presente estudio, el testigo presentó un 68% de emergencia y el tratamiento con 200 Gy un 47.2 % [22].

Para la altura de plántula se observó diferencias significativas para las dosis de irradiación, a mayor dosis menor altura de plántula, debido al efecto de la irradiación en las variedades en estudio; lo que concuerda con el trabajo de Sarduié-Nasab et al. [22], que mencionan que a mayor dosis las plantas presentan una disminución en la altura de planta, cantidad de raíces, tamaño y ancho del tallo. Wang, Ma, Cao, Shan, & Jiao [23] en su estudio con la variedad de cebada de altura "Kunlun 15", irradiadas a diferentes dosis de rayos gamma (testigo, 50, 100, 150, 200, 250 y 300 Gy), indica que a medida que incrementa la dosis de irradiación disminuye la altura en plántula (testigo 14.3 cm; 300 Gy 7 cm), similares a los datos obtenidos en este estudio con la variedad INIAP Cañicapa (testigo 14.5 cm; 250 Gy 8.6 cm) [23]. Varias investigaciones mencionan que la variación en altura no solamente puede presentarse en una disminución del tamaño, sino también puede darse un incremento del crecimiento comparado con el testigo [20, 21, 24, 25].

Con relación al vigor Sarduié-Nasab et al. [22] mencionan que conforme aumenta la dosis de irradiación las plantas muestran características que no favorecen su normal desarrollo,



afectando su vigor. El mismo trabajo concluye que 200 Gy es la dosis adecuada para irradiar semillas de cebada, resultado muy similar a la dosis identificada en el presente estudio de 150 a 200 Gy. Al respecto Datta [17] menciona que la determinación de la radiosensibilidad y la dosis de DL50 en las etapas de desarrollo de la investigación de mutación varían de un investigador a otro. Varios investigadores informaron diferentes tipos de resultados, por lo expuesto no es aconsejable comenzar el experimento de mutación sobre la base de la literatura disponible. Es mejor hacer un experimento piloto para determinar la dosis óptima.

CONCLUSIONES

Las pruebas de germinación realizadas en laboratorio no permitieron determinar el nivel de irradiación recomendado para tratar las semillas de cebada; entre tanto que, las pruebas de emergencia en campo permitieron observar diferencias significativas entre los tratamientos, denotando que a mayor dosis de irradiación mayor son los efectos negativos sobre el fenotipo de las variedades.

En laboratorio se obtuvo un porcentaje de germinación promedio de 89.6% y 74.9% para INIAP- Cañicapa y Rita Pelada, respectivamente; mientras en campo, INIAP- Cañicapa alcanzó un porcentaje de emergencia promedio de 62.5% y la variedad Rita Pelada un porcentaje de emergencia promedio de 45.1%.

La variedad Rita Pelada de grano desnudo, presentó la mayor variación fenotípica en campo, tanto en germinación, altura de planta y vigor, especialmente en los niveles n4 (200 Gy) y n5 (250 Gy), respecto al testigo.

La dosis óptima de irradiación según los resultados presentados es 150 Gy, que provocó el menor daño en las plantas, pues no se detectó mayores diferencias fenotípicas, comparado con el testigo, tanto en porcentaje de emergencia, altura y vigor, para las dos variedades estudiadas.

RECOMENDACIONES

Con los resultados obtenidos, se recomienda utilizar la dosis de 150 Gy (n3) para irradiar las semillas de las dos variedades de cebada empleadas en este trabajo. Adicionalmente, al momento de formar la población M_1 , ajustar la densidad de siembra para las dos variedades objeto del estudio, tomando en cuenta los porcentajes de germinación obtenidos, con el fin de obtener la cantidad de individuos necesarios, 50000 plantas, en la población a evaluar.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen por su apoyo al: Organismo Internacional de Energía (OIEA) con los proyectos: ECU/5/023 "Inducing Mutations in Agriculture with the Aid of Radiation", y RLA/5/068 "Improving Yield and Commercial Potential of Crops of Economic

Importance (ARCAL CL)”. A la Subsecretaría de Control y Aplicaciones Nucleares (SCAN) del Ministerio de Energía y Recursos Naturales No Renovables (MERNNR), por las facilidades prestadas para el uso del irradiador tipo I, ubicado en las instalaciones de Aychapicho, y al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) por todo el apoyo recibido en la investigación.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

Javier Garófalo y Luis Ponce propusieron la investigación, evaluaron, registraron y analizaron los datos de laboratorio y campo; Javier Garófalo redactó el manuscrito; Luis Ponce, Patricio Noroña y Diego Campaña proveyeron bibliografía, aportaron en la discusión y análisis de los resultados.

REFERENCIAS

- [1] Falconi, E., Garófalo, J., Llangari, P., & Espinoza, M. (2013). *El cultivo de cebada: Guía para la producción de semilla de calidad*. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Boletín Divulgativo N° 390. Quito, Ecuador.
- [2] Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2019). Cifras Agroproductivas 2019. Recuperado de <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/cifras-agroproductivas>. Consultado septiembre 2020.
- [3] Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. (2010). Convenio de Cooperación Técnica Interinstitucional Corpoiñay y Cervecería Nacional. Quito, Ecuador.
- [4] Ponce-Molina, L., Garófalo, J., Campaña, D., Noroña, P. (2019). *Parámetros de Evaluación y Selección en Cereales*. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Manual N° 116. Quito, Ecuador.
- [5] Ponce-Molina, L., Noroña, P., Campaña, D., Garófalo, J., Coronel, J., Jiménez, C., & Cruz, E. (2020). *La Cebada (Hordeum vulgare L.): Generalidades y variedades mejoradas para la Sierra Ecuatoriana*. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Quito, Ecuador.
- [6] Ahloowalia, B. S., & Maluszynski, M. (2001). Induced mutations - A new paradigm in plant breeding. *Euphytica*, 118(2), 167–173. Doi: <https://doi.org/10.1023/A:1004162323428>
- [7] Irfaq, M., & Nawab, K. (2001). Effect of Gamma Irradiation on Some Morphological Characteristics of Three Wheat (*Triticum aestivum* L.) Cultivars. *Journal of Biological Sciences*, 1(10), 935–937. Doi: <https://doi.org/10.3923/jbs.2001.935.937>
- [8] Soraluz Cubas, L. E. (2015). *Inducción de mutaciones en centeno (Secale cereale Linneo) empleando radiación gamma*. Universidad Nacional Agraria La Molina. Recuperado de <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/1421>. Consultado agosto 2020.
- [9] Solano S., J., Barriga B., P., Krarup H., A., & Figueroa S., H. (1998). Estabilidad Temporal Del Rendimiento De Genotipos Mutantes De Trigo, Mediante El Modelo De Interaccion Multiplicativa Y Efectos Principales Aditivos (Ammi: Additive Main Effect and Multiplicative Interaction Model). *Agro Sur*, 26(2), 19–32. Doi: <https://doi.org/10.4206/agrosur.1998.v26n2-03>
- [10] Hernández Muñoz, S., Pedraza Santos, M. E., López, P. A., De la Cruz Torres, E., Fernández Pavía, S. P., Martínez Palacios, A., & Martínez Trujillo, M. (2017). Determinación de la DL 50 y GR 50 con rayos gamma (60 Co) en protocormos de *Laelia autumnalis* in vitro. *Agrociencia*, 51, 507–524.
- [11] Gupta, S., Kumar Datta, A., Pramanik, A., Biswas, J., & Karmakar, R. (2019). X-ray and gamma irradiation Induced chromosomal Aberrations in plant species as the consequence of induced mutagenesis - an overview. *Plant Archives*, 19(2), 1973–1979.
- [12] Ulukapi, K., & Nasircilar, A. G. (2015). *Developments of Gamma Ray Application on Mutation Breeding Studies in Recent Years*. International Conference on Advances in Agricultural, Biological & Environmental Sciences. London. Doi: <https://doi.org/10.15242/iicbe.c0715044>
- [13] Di Pane, F. J., Lopez, S. C., Cantamutto, M. Á., Domenech, M. B., & Castro-Franco, M. (2018). Effect of different gamma radiation doses on the germination and seedling growth of wheat and triticale cultivars. *Australian Journal of Crop Science*, 12(12), 1921–1926. Doi: <https://doi.org/10.21475/ajcs.18.12.12.p1251>
- [14] Cheema, A. Al., & Manzoor Atta, B. (2003). RADIOSENSITIVITY STUDIES IN BASMATI RICE. *Pak. J. Bot.*, 35(2), 197–207.
- [15] Jain Mohan, S. (2005). Major mutation-assisted plant breeding programs supported by FAO / IAEA. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82, 113–123.
- [16] Cortés Conget, C. A. (2017). Estimación de dosis letal 50 en dos explantes de *Alstroemeria* spp. irradiados con rayos gamma (Tesis de pre grado). Universidad de Chile, Santiago.
- [17] Datta, S. K. (2019). Determination of Radiosensitivity : Prerequisite Factor for Induced Mutagenesis. En C. P. Malik and P.C. Trivedi, *Harnessing Plant Biotechnology and Physiology to Stimulate Agricultural Growth*. Agrobios, India.
- [18] Bhan, A. K. (1979). Towards a more efficient mutation breeding programme in Barley. *Genetics Newsletter*, 3(II), 11–12.

- [19] Mathías R., M., & Fernández, F. (2019). *Recomendaciones para reducir el riesgo de tendadura en avena*. Biblioteca Digital. Santiago de Chile.
- [20] Mayta, M. E. (2016). Dosimetría de Rayos Gamma para la Inducción de Mutación en Cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) (Tesis de pre grado Universidad Nacional Agraria La Molina). Lima.
- [21] Rozman, L. (2014). The effect of gamma radiation on seed germination of barley (*Hordeum vulgare* L .). *Acta agriculturae Slovenica*, 103(2), 307–311. Doi: <https://doi.org/10.14720/aas.2014.103.2.15>
- [22] Sarduié-Nasab, S., Sharifi-Sirchi, G. R., & Torabi-Sirchi, M. H. (2010). Assessment of dissimilar gamma irradiations on barley (*Hordeum vulgare*). *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 2(4), 59–063.
- [23] Wang, X., Ma, R., Cao, Q., Shan, Z., & Jiao, Z. (2018). Enhanced tolerance to salt stress in highland barley seedlings (*Hordeum vulgare* ssp . *vulgare*) by gamma irradiation pretreatment. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(174), 1–11. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2736-2>
- [24] Geras'kin, S., Churyukin, R., & Volkova, P. (2017). Radiation exposure of barley seeds can modify the early stages of plants' development. *Journal of environmental radioactivity*, 177, 71-83. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2017.06.008>
- [25] Obare, I. J., Kinyua, M. G., & Kiplagat, O. K. (2014). Effects of Induced Mutagenesis on Agronomic Traits in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *American Journal of Experimental Agriculture*, 4(12), 1536–1543. Doi: <https://doi.org/10.9734/AJEA/2014/11115>

Evaluación in vivo del efecto genotóxico y citotóxico de los extractos acuosos de dos variedades mutantes de *Hibiscus sabdariffa* L.

Kristha Paredes Branda¹, Héctor Nakayama¹, María Caridad González² y Edith Segovia*¹

¹Universidad Nacional de Asunción, Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica, Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (UNA, DGICT, CEMIT), Laboratorio de Biotecnología, San Lorenzo, Paraguay.

² Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Mayabeque, Cuba.

*Autor para correspondencia/ Corresponding autor, e-mail: edaluz@gmail.com

In vivo evaluation of the genotoxic and cytotoxic effect of the aqueous extracts of two mutant varieties of *Hibiscus sabdariffa* L.

Resumen

El *Hibiscus sabdariffa* (flor de Jamaica, grosella o rosella), conocida además como rosa piola en Paraguay, tiene uso medicinal en gran parte del mundo; en Paraguay se utiliza como antiescorbútico, mientras que en otros países se utiliza como antihipertensivo, antiespasmódico o en el tratamiento de la obesidad, entre otros usos. La radiación gamma es utilizada para la obtención de variedades mejoradas de diferentes especies vegetales; las variedades de grosella Ana Delia y Dogo fueron obtenidas por irradiación Gamma como parte del programa de mejoramiento genético del Instituto Nacional Ciencias Agrícolas (Cuba). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto genotóxico y citotóxico del extracto acuoso de cálices de ambas variedades de grosella sobre células de médula ósea de ratones tratados con tres concentraciones de cada extracto, vía oral, durante 15 días. El efecto genotóxico fue evaluado mediante la aplicación del ensayo de Micronúcleos. El efecto citotóxico se verifica por el índice obtenido entre la frecuencia de Eritrocitos Policromáticos (eritrocitos jóvenes) y la frecuencia de Eritrocitos Normocromáticos (eritrocitos adultos). Los resultados mostraron que los extractos evaluados, en las concentraciones utilizadas, no tienen un efecto genotóxico o citotóxico en células de médula ósea de ratones tratados por 15 días con los extractos descritos.

Palabras clave: Citotoxicidad, Eritrocitos Normocromáticos, Eritrocitos Policromáticos, Irradiación gamma, Micronúcleos.

Abstract

The *Hibiscus sabdariffa* (Jamaica flower, grosella or rosella), also known as rosa piola in Paraguay, has medicinal use in much of the world; in Paraguay it is used as an antiscorbutic, while in other countries it is used as an antihypertensive, antispasmodic

Editado por /
Edited by:
Gabriela Albán

Recibido /
Received:
12/08/2020

Aceptado /
Accepted:
24/10/2020

Publicado en línea /
Published online:
01/04/2021

or in the treatment of obesity, among other uses. Gamma irradiation is used to obtain improved varieties of different plant species; the Ana Delia and Dogo varieties were obtained by Gamma irradiation as part of INCA genetic improvement program. The objective of this work was to evaluate the genotoxic and cytotoxic effect of the aqueous extract of calyces of both varieties of currant on bone marrow cells of mice treated with three concentrations of each extract, orally, for 15 days. The genotoxic effect was evaluated by applying the Micronucleus test. The cytotoxic effect is verified by the index obtained between the frequency of Polychromatic Erythrocytes (young erythrocytes) and the frequency of Normochromatic Erythrocytes (adult erythrocytes). The results showed that the extracts evaluated, in the concentrations used, do not have a genotoxic or cytotoxic effect on bone marrow cells of mice treated for 15 days with the extracts.

Keywords: Erythrocytes, Gamma radiation, Micronucleus, Normochromatic, Polychromatic erythrocytes.

INTRODUCCIÓN

El *Hibiscus sabdariffa* (flor de Jamaica, grosella o rosella), es originaria de Asia [1], aunque otros autores sostienen que es originaria de África y es consumido en varios países de la región, así como el Latinoamérica [2]. En Paraguay es conocido como rosa piola, la infusión del cáliz de la flor se utiliza como antiescorbútico [3] y también se la utiliza para preparar mermeladas [4].

En una descripción del perfil fitoquímico de los cálices de *H. sabdariffa* se describen la presencia de antocianinas, ácidos orgánicos, polisacáridos y flavonoides, entre otros [2]. En un estudio fitoquímico realizado en dos variedades de *H. sabdariffa* cultivadas en Cuba, se evaluaron la presencia del contenido de los cálices y se registró la presencia de saponinas, compuestos fenólicos, flavonoides, azúcares reductores, aminoácidos, antraquinonas, terpenoides y alcaloides [5].

Se describen varias propiedades medicinales de extracto de esta especie. Se evaluó el extracto acuoso del cáliz en células de tumor de mama y se observó que presenta un efecto citotóxico sobre las mismas [6], en otro ensayo in vitro con células de carcinoma de hígado, pulmón y cáncer colorectal no se observó ningún efecto citotóxico [7]. Se utiliza para el tratamiento de la obesidad [8], tratamiento de la hipertensión e hiperlipidemia [9] y la infusión del cáliz se utiliza como antiescorbútico en Paraguay [3].

El uso de radiación para la obtención de nuevas variedades de especies vegetales es de gran importancia [10]. Las variedades mutantes de *H. sabdariffa* Ana Delia y Dogo fueron obtenidas por radiación gamma de ^{60}Co (150 Gy y 100 Gy, respectivamente) a partir de semillas de la variedad Yersy. La nueva variedad Ana Delia presentó diferencias en las hojas, tallos, flores y frutos con mejores características y en la selección durante tres años se mantuvieron las características [11]; la variedad Dogo presentó diferencias en el número de ramas, forma de las hojas, cantidad de frutos por planta y peso de los mismos con relación a la variedad de origen [12].



Las plantas de uso medicinal deben ser evaluadas en sus posibles efectos secundarios para establecer su inocuidad o su potencial de genotoxicidad [13,14]. Los efectos secundarios de agentes químicos o físicos se pueden evaluar por la técnica de análisis de micronúcleos [15], donde se evalúa la pérdida del material genético por ruptura en el cromosoma (efecto clastogénico) o pérdida de un cromosoma entero (efecto aneugénico), los cuales quedan rezagados en el citoplasma y pueden ser visualizados en una evaluación por microscopía de inmersión; es rápida y relativamente de bajo costo [16,17]. En el ensayo de variaciones en las frecuencias de células micronucleadas (MNs) para evaluar el potencial genotóxico, donde se comparan las frecuencias de micronúcleos en las muestras tratadas con las testigo y se evalúan su significancia. También en las muestras obtenidas se evalúa el efecto citotóxico mediante las comparaciones de los ratio entre los eritrocitos jóvenes y adultos observadas o por el porcentaje de eritrocitos jóvenes en el total de eritrocitos [18,19].

El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos genotóxicos y citotóxicos de los extractos acuosos de las nuevas variedades de *H. sabdariffa* descritas, en células de médula ósea de ratones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Plantas y extractos

Extracto acuoso de hojas de *H. sabdariffa*, variedades Ana Delia y Dogo y los cálices de los frutos fueron obtenidos en el INCA. Se sembraron las variedades en suelo ferralítico rojo compactado, y al ponerse las hojas de las planas amarillas se cosecharon los cálices de los frutos y estos se pusieron a secar en una sala a 24°C por 10 días (comunicación oral de la Dra. Caridad González). Se utilizaron 20 cálices deshidratados de cada variedad (Ana Delia 16.4g y Dogo 11.5g). Por separado, los cálices se trituraron y se llevaron a ebullición en 2000 ml de agua potable. Se procedió a filtrar cada infusión con algodón y papel de filtro Whatman, se liofilizó y se conservó a -20°C hasta el momento de su uso. Se utilizaron 20 flores de cada variedad.

Animales y tratamientos

Los ratones fueron adquiridos al Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS) de la UNA y fueron aclimatados por 7 a 10 días. Se utilizaron ratones Swiss albinos, machos, de entre 8 a 12 semanas de vida, que fueron mantenidos en la Sala de Mantenimiento de Animales del laboratorio de Biotecnología del CEMIT- UNA, con temperatura controlada y con agua y comida *ad libitum*, con 12 horas de luz y 12 horas a oscuras. Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en grupos de cinco animales por tratamiento. El tratamiento consistió en administrar por vía oral, mediante el uso de una cánula intragástrica, tres concentraciones diferentes 0.53 mg; 0.8 mg y 1.6 mg de Ana Delia por kg de animal; 0.4 mg, 0.6 mg y 0.12 mg por kg de animal del extracto acuoso de la variedad Dogo, durante 15 días. Para calcular las concentraciones, se consideró el uso de los cálices para una persona de 60 kg de peso y estimando el peso de los animales de 33 gramos, en promedio. Las concentraciones utilizadas de cada variedad fueron diferentes debido a que las flores de la variedad Dogo eran de tamaño

menor y se tomó como referencia la cantidad de flores por litro de agua, no el peso de las mismas. Para el control positivo se utilizó el antineoplásico ciclofosfamida (CP) y se utilizaron los mismos datos para evaluar ambas variedades.

Ensayo de micronúcleos (MNs)

Para este ensayo se utilizó el método de Schmid, 1975[15]. Los animales fueron tratados vía oral, por 15 días, luego fueron sacrificados por dislocación cervical. Se extrajo la médula ósea de los fémures de cada animal, se lavaron con Suero Bovino Fetal y se prepararon las muestras haciendo el frotis en portaobjetos limpios y secos. Se fijaron las muestras con metanol 100%, por cinco minutos y se tiñeron las mismas con colorante Giemsa al 5%, diluido en agua destilada estabilizada con tampón. Se analizaron las muestras en microscopio óptico de inmersión y se contaron 1000 eritrocitos policromáticos (EPCs) incluyendo los que presentaron micronúcleos (EPCMN), por animal tratado. Para el análisis de citotoxicidad se analizaron las mismas muestras del ensayo de MNs, donde 500 eritrocitos fueron contados por animal tratado, incluyendo los eritrocitos maduros (eritrocitos normocromáticos-ENC) y jóvenes (eritrocitos policromáticos-EPC) y se analizaron las proporciones de los mismos en cada muestra; las desviaciones en las proporciones son indicativos de toxicidad.

Análisis estadístico

Los datos fueron procesados mediante el software de análisis estadístico EpiInfoTM versión 3.5.1. Ensayo estadístico ANOVA ($p < 0.05$).

RESULTADOS

En la evaluación del extracto acuoso de la variedad Ana Delia se observó que la frecuencia de células micronucleadas en médula ósea de ratones tratados con el extracto no fue significativa, comparada con la frecuencia del control negativo. Tampoco fue significativo el efecto citotóxico, evaluado por la ratio entre eritrocitos jóvenes y maduros. El control positivo ciclofosfamida (50mg kg^{-1}) utilizado resultó significativo en los análisis de genotoxicidad y citotoxicidad (Tabla 1).

Tabla 1. Frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados, en médula ósea de ratones machos tratadas con tres concentraciones de *H. sabdariffa* de la variedad mutante Ana Delia.

Grupo experimental	Total EPC	Total EPCMN	Ratio EPC/ENC
CTL-	5.000	3	1.60
0.53 mg	5.000	5	1.61
0.8mg	5.000	4	1.57
0.16mg	5.000	4	1.62
CP	5.000	38*	1.16*

EPC: eritrocito policromático; EPCMN: eritrocitos policromático micronucleado; ENC: eritrocito normocromático; CP: ciclofosfamida. Datos procesados por el software de análisis estadístico EpiinfoTM versión 3.5.1. *Ensayo estadístico ANOVA ($p < 0.05$).



Al evaluar la frecuencia de micronúcleos en las células de médula ósea de los ratones con los tratamientos realizados con el extracto acuoso de la variedad Dogo por 15 días, no se encontró un aumento significativo del número total de micronúcleos. Los tratamientos no presentaron un efecto genotóxico. Al evaluar las ratios entre eritrocitos jóvenes y maduros en células de médula ósea de los ratones tratados, no fueron significativos cuando fueron comparados con los resultados obtenidos en los ratones del control negativo. Los resultados obtenidos en los ratones del control positivo fueron estadísticamente significativos tanto en la evaluación de genotoxicidad como de citotoxicidad (Tabla 2).

Tabla 2. Frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados, en médula ósea de ratones machos tratadas con tres concentraciones de *H. sabdariffa* de la variedad mutante Dogo.

Grupo experimental	Total EPC	Total EPCMN	Ratio EPC/ENC
CTL-	5.000	3	1,60
0,4mg	5.000	4	1,55
0,6mg	5.000	5	1,63
012mg	5.000	5	1,59
CP	5.000	38*	1,16*

EPC: eritrocito policromático; EPCMNs: eritrocitos policromático micronucleado; ENC: eritrocito normocromático; CP: ciclofosfamida. Datos procesados por el software de análisis estadístico EpiinfoTM versión 3.5.1.*Ensayo estadístico ANOVA ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

Las especies vegetales utilizadas como alimentos o de uso medicinal pueden ser mejoradas con el uso de la energía atómica, como en el mejoramiento de patata, donde irradiaron enredaderas de *Ipomoea batatas* Lam. (Patata dulce) con rayos gamma, con 2 y 10 Gy, por 20 horas; y, aunque no obtuvieron el número esperado de ejemplares con la característica fenotípica deseada, el estudio pudo ser la base para otros ensayos [20]. Irradiando semillas de *Cicer arietinum* L con ^{60}Co (280 Gy) se obtuvieron poblaciones mutantes con características fenotípicas, como días de floración, altura de la planta y otros, con diferencias significativas [21], también se utilizó en el mejoramiento de cítricos [22].

La especie vegetal *H. sabdariffa* tiene amplio uso como planta medicinal [1]. Se ha descrito su efecto protector en células de médula ósea de ratones tratados con el extracto acuoso de la planta y sodio arsenito, reduciendo la frecuencia de micronúcleos en los animales tratados con el extracto [23]. Las evaluaciones de genotoxicidad se realizan en varios agentes, para determinar su inocuidad, como fármacos [24], extractos de especies agronómicas como el *Allium* sp. [25], principios activos de plantas [16] o extractos de plantas de uso medicinal [14]. No se ha encontrado en la literatura especializada evaluaciones de los efectos secundarios de variedades mutantes de plantas medicinales. En este trabajo se evaluó el extracto acuoso de dos variedades mutantes de *H. sabdariffa* mediante el ensayo de micronúcleos [15], ensayo más utilizado en la evaluación de la genotoxicidad de extractos de plantas [14]. Considerando el uso como planta medicinal de la *H. sabdariffa* no modificada y con el fin de evaluar si estas nuevas variedades no

presentan un potencial genotóxico, se evaluaron tres concentraciones de cada variedad citada. Al comparar las frecuencias de micronúcleos en células de médula ósea de ratones de los grupos tratados con los extractos de Ana Delia y Dogo, estas frecuencias no fueron significativas. En la evaluación de citotoxicidad los resultados no fueron significativos, los tratamientos no indujeron citotoxicidad en las células de médula ósea.

CONCLUSIÓN

Los extractos acuosos de las variedades mutantes Ana Delia y Dogo de *H. sabdariffa* no presentaron efectos genotóxicos o citotóxicos en células de médula ósea de ratones, en las condiciones utilizadas. Se sugieren otros ensayos con estas variedades para determinar su inocuidad o el potencial tóxico o genotóxico, como parte de las medidas preventivas en el uso de una planta consumida en varias regiones del mundo.

AGRADECIMIENTOS

Al Ing Agr. Carlos Emilio Mussi, por su invaluable apoyo constante y disposición a colaborar desinteresadamente. Este trabajo experimental fue aprobado por el Departamento de Investigación del Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT, DGICT, UNA).

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

Kristha Noemí Paredes Branda: adquisición de datos de laboratorio (tratamiento de los animales, obtención de las muestras y análisis citogenético) y análisis estadístico de los mismos. Validación de los resultados y revisión del manuscrito. María Caridad González Cepero obtuvo las muestras de cáliz de *H. sabdariffa* y concibieron con Héctor Nakayama la investigación. Edith Segovia coordinó el trabajo de laboratorio, proveyó los reactivos y redactó el manuscrito.

REFERENCIAS

- [1] Riaza, G., & Choprab, R. (2018) A review on phytochemistry and therapeutic uses of *Hibiscus sabdariffa* L. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 102 (2018) 575–586. Doi: doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.023
- [2] Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Ivo Pischel, I., & Heinrich, M. (2014) *Hibiscus sabdariffa* L. – A phytochemical and pharmacological review. *Food Chemistry* 165 (2014) 424–443.
- [3] Pin, A., González, G., Marín, G., Céspedes, G., Cretton, S., Christen, P., & D. Roguet, (2009). *Plantas Medicinales del Jardín Botánico de Asunción*. 1ª edición. Asunción. p. 157-339.
- [4] ABC 2011. <https://www.abc.com.py/articulos/rosella-268323.html>. Consultado en junio 2020.
- [5] Brown, F., González, J., & Monan, M. (2019) Pharmacognostic, Physicochemical and Phytochemical Analysis of Two Cultivars from *Hibiscus sabdariffa* L. in Cuba. *Open Access Library Journal*, 6, 1-8. Doi: 10.4236/oalib.1105894.
- [6] Nguyen, C., Baskaran, K., Pupulin, A., Ruvinov, I., Zaitoon, O., Grewal, S., Scaria, B., Mehadli, A., Vegh, C., & Pandey, S. (2019). *Hibiscus* flower extract selectively induces apoptosis in breast cancer cells and positively interacts with common chemotherapeutics. *BMC complementary and alternative medicine*, 19(1), 98. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2505-9>.
- [7] Maciel, L. G., do Carmo, M. A. V., Azevedo, L., Daguer, H., Molognoni, L., & de Almeida, M.M. (2018). Granato. *Food Chem Toxicol.* 2018 Mar;113:187-197. Doi: 10.1016/j.fct.2018.01.053.
- [8] Ojulari, O.V., Lee, S.G., & Nam, J. O. (2019). Beneficial Effects of Natural Bioactive Compounds from *Hibiscus sabdariffa* L. on Obesity. *Molecules*. Jan 8;24(1):210. Doi: 10.3390/molecules24010210.
- [9] Hopkins, A.L., Lamm, M. G., Funk, J. L., & Ritenbaugh, C. (2013). *Hibiscus sabdariffa* L. in the treatment of hypertension and hyperlipidemia: a comprehensive review of animal and human studies. *Fitoterapia*, 85:84-94. Doi: 10.1016/j.fitote.2013.01.003.
- [10] Kuranouchi, T., Kumazaki, T., Kumagai, T., & Nakatani, M. (2016). Breeding erect plant type sweetpotato lines using cross breeding and gamma-ray irradiation. *Breed Sci.* (3):456-61. doi: 10.1270/jsbbs.15134.
- [11] González Cepero, M. C., Trujillo Gil, D., Terán Vidal, Z., & Valentín, S.A. (2011). Informe de nuevas variedades ANA DELIA, mutante de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) obtenido en Cuba mediante el empleo de inducción de mutaciones con rayos Gamma de ⁶⁰Co. *Cultivos Tropicales*, 32 (4), p. 27.
- [12] González Cepero, M. C. (2015). Reporte de nuevo cultivar Dogo, nuevo cultivar cubano de Flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*, L) obtenido por inducción de mutaciones con rayos Gamma ⁶⁰Co. *Cultivos Tropicales*, 36 (4), pp. 133.
- [13] OECD: 2016 [https://one.oecd.org/document/C\(2016\)103/en/pdf](https://one.oecd.org/document/C(2016)103/en/pdf). Consultado en junio 2020.
- [14] Sponchiado, G., Adam, M.L., Silva, C. D., Soley, B. S., de Mello-Sampayo, C., Cabrini, D. A., Correr, C. J., & Otuki, M. F. (2016). Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. *J Ethnopharmacol*, 178:289-96. Doi: 10.1016/j.jep.2015.10.026.
- [15] Schmid, W. (1975). The micronucleus test for cytogenetic analysis. *Chemical Mutagens* 4.31.
- [16] Chen, R., Zhou, C., Cao, Y., Xi, J., Ohira, T., He, L., Huang, P., You, X., Liu, W., Zhang, X., Ma, S., Xie, T., Chang, Y., & Luan, Y. (2020) Assessment of Pig-a, Micronucleus, and Comet Assay Endpoints in Tg.RasH2 Mice Carcinogenicity Study of Aristolochic Acid I. *Environ Mol Mutagen*, 61(2):266-275. doi: 10.1002/em.22325.
- [17] Ortega, Y. H., Mosquera, D.M., Galapththi, S., Santos, B.T., González, G.S., Foubert, K., Pieters, L., Calderon, P.B., & Apers, S. (2016). Safety assessment of a traditionally used extract from leaves of *Boldoa purpurascens*. *Ethnopharmacol*, 192:302-308. Doi: 10.1016/j.jep.2016.07.009.
- [18] Attia, S.M. (2007). Chromosomal composition of micronuclei in mouse bone marrow treated with rifampicin and nicotine, analyzed by multicolor fluorescence in situ hybridization with pancentromeric DNA probe. *Toxicology*, 235, 112–118. Doi:10.1016/j.tox.2007.03.011.
- [19] Otabea, A., Ohtaa, F., Takumia, A., & Lynch, B. (2019). Mutagenicity and genotoxicity studies of aspartame. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 103, 345-35. Doi: 10.1016/j.yrtph.2018.01.023.
- [20] Kuranouchi, T., Kumazaki, T., Kumagai, T., & Nakatani, M. (2016). Breeding erect plant type sweet potato lines using cross breeding and gamma-ray irradiation. *Breed Sci.*, 66(3):456-61. Doi: 10.1270/jsbbs.15134.

- [21] Amri-Tiliouine, W., Laouar, M., Abdelguerfi, A., Jankowicz-Cieslak, J., Jankuloski, L., & Till, B.J. (2018). Genetic Variability Induced by Gamma Rays and Preliminary Results of Low-Cost TILLING on M₂ Generation of Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Front. Plant Sci*, 9:1568. Doi: 10.3389/fpls.2018.01568.
- [22] Talón, M., López-García, A., Terol, J., Cercós, M., Ibañez, V., Herrero-Ortega, A., Muñoz-Sanz, J.V., Colmenero-Flore, J.M., Arbona, V., Estormell, L.H., Carbonell, J., Concesa, A., Dopazo, J., & Tadeo, F.R. (2011). Citrusseq: una aproximación genómica a la mejora de los cítricos. *Levante Agrícola* 405: 73-78.
- [23] Adetutu, A., Odunola, O. A., Owoade, A., Adeleke, O. A., & Amuda, S. A. (2004). Anticlastogenic Effects of Hibiscus sabdariffa Fruits against Sodium Arsenite-induced Micronuclei Formation in Erythrocytes in Mouse Bone Marrow. *Phytotherapy Research*, 18, 862–864. Doi: 10.1002/ptr.1554.
- [24] Brock, W. J., & Bell, T. A. (2012). The in vitro and in vivo genotoxicity of benzocaine: a brief communication. *J Toxicol.*, 31(3):222-7. Doi: 10.1177/1091581812442230.
- [25] Mellado-García, P., Puerto, M., Prieto, A. I., Pichardo, S., Martín-Cameán, A., Moyano, R., Blanco, A., & Cameán, A.M. (2016). Genotoxicity of a thiosulfonate compound derived from *Allium* sp. intended to be used in active food packaging: In vivo comet assay and micronucleus test. *Mutation Research* 800, 1–11.

Eficiencia del uso de abonos verdes y urea en el cultivo de maíz de valles altos

Yamil E. Cartagena^{1*}, Rafael A. Parra¹, Soraya P. Alvarado², Franklin M. Valverde¹, José L. Zambrano¹

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental Santa Catalina, Mejía, Ecuador.

²Universidad Central del Ecuador (UCE), Facultad de Ciencias Agrícolas, Quito, Ecuador.

*Autor para correspondencia/ Corresponding autor, e-mail: yamil.cartagena@iniap.gob.ec

Efficiency of the use of green manures and urea in the cultivation of corn in the highlands

Resumen

En la actualidad, la agricultura es cada vez más dependiente de fertilizantes nitrogenados por la necesidad de producir más para satisfacer la gran demanda de alimentos en el mundo. En este sentido, la incorporación de abonos verdes puede ayudar a aumentar la bio-disponibilidad de Nitrógeno (N), elemento fundamental para el desarrollo de las plantas. El grado de aprovechamiento de N, o eficiencia del fertilizante aportado al suelo se puede medir utilizando el método convencional (diferencial) y el isotópico (¹⁵N). En este contexto, se implementó esta investigación para evaluar mediante el método convencional la eficiencia agronómica de la incorporación al suelo de abono verde de: chocho (*Lupinus mutabilis*), vicia (*Vicia sp.*) y avena (*Avena sativa*); con cinco niveles de nitrógeno (0, 45, 90, 135 y 180 kg ha⁻¹) sobre la biomasa (forraje) y el rendimiento de grano de maíz de valles altos. Adicionalmente, mediante el método isotópico ¹⁵N se evaluó la eficiencia de recuperación del N con la incorporación de los abonos verdes y la aplicación de N en tres momentos: a la siembra, a los 35 y 70 días después de la siembra (dds). En ambos experimentos se utilizó un diseño experimental de parcela dividida, donde la parcela grande correspondió al cultivo incorporado al suelo y en las parcelas pequeñas los niveles o tiempo de aplicación del nitrógeno, con tres repeticiones. La incorporación de abonos verdes no produjo ningún efecto significativo sobre el rendimiento de maíz, excepto en el ensayo isotópico, donde la incorporación de chocho incrementó significativamente la producción de follaje a 22.69 t ha⁻¹. El mayor rendimiento de grano de maíz (6.76 t ha⁻¹) se obtuvo con la dosis de 135 kg ha⁻¹ de nitrógeno, diferenciándose estadísticamente de la dosis de 0 y 45 kg ha⁻¹. El método isotópico con el uso de ¹⁵N permitió diferenciar los niveles de absorción de nitrógeno entre las épocas de aplicación, observándose que la mayor absorción de este elemento y la mayor eficiencia de la fertilización nitrogenada se obtuvieron a los 70 dds (V6-V7). Estos resultados demuestran la importancia de las técnicas isotópicas para estudios de nutrición vegetal y permitirá ajustar las recomendaciones de fertilización nitrogenada para el cultivo de maíz de la sierra del Ecuador.

Palabras clave: Maíz, Nitrógeno 15, Isótopos, Rendimiento.

Editado por /
Edited by:
Gabriela Albán

Recibido /
Received:
24/10/2020

Aceptado /
Accepted:
08/12/2020

Publicado en línea /
Published online:
01/04/2021

Abstract

Currently, agriculture is increasingly dependent on nitrogenous fertilizers due to the need to produce more to satisfy the great food demand in the world. In this sense, incorporation of green manures can help to increase the bioavailability of Nitrogen (N), a fundamental element for the development of plants. The N use efficiency can be measured using the conventional (differential) and the isotopic (^{15}N) method. In this context, a research was implemented to evaluate the effect of two green manure species: (*Lupinus mutabilis* and *Vicia* sp.) and a cereal species (*Avena sativa*); and five nitrogen levels (0, 45, 90, 135 and 180 kg ha⁻¹) on the biomass (forage) and grain yield of corn in the highlands of Ecuador. Additionally, efficiency of the nitrogen fertilizer was evaluated at three times: at sowing, 35 and 70 days after sowing (das). In both experiments, a split plot design was used, where the large plot contained the crop incorporated into the soil, and the small plots had the levels of N or application time, with three replications. Incorporation of green manures did not produce any significant effect on corn yield, except in the isotopic test, where the incorporation of lupine significantly increased the production of forage to 22.69 t ha⁻¹. The highest yield of corn grain (6.76 t ha⁻¹) was obtained with dose of 135 kg ha⁻¹ of N, differing statistically from the dose of 0 and 45 kg ha⁻¹. The isotopic method with the use of ^{15}N allowed to differentiate the levels of N absorption among the application times, observing that the highest absorption of this element and the highest efficiency of N occurred at 70 das (V6-V7). These results demonstrate the importance of isotopic techniques for plant nutrition studies and will allow to adjust the nitrogen fertilization recommendations for the cultivation of corn in the Ecuadorian highlands.

Keywords: Maize, Nitrogen 15, Isotopes, Yield.

INTRODUCCIÓN

El Nitrógeno (N) es uno de los elementos que requiere la planta en grandes cantidades seguido por el Fósforo (P) y el Potasio (K). El N está presente en procesos metabólicos de suma importancia para el desarrollo de la planta directamente relacionado con la formación de ácidos nucleicos y proteínas, además de ser un componente fundamental de la clorofila que es vital para la fotosíntesis [1].

En la actualidad, la agricultura es cada vez más dependiente de fertilizantes y especialmente de los nitrogenados por la necesidad de producir más para satisfacer la gran demanda de alimentos en el mundo [2]. En el mercado de los fertilizantes nitrogenados se puede apreciar la gran demanda que existe por el monofosfato de amonio (MAP) (11-52-0), difosfato de amonio (DAP) (18-46-0), nitrato de amonio (33-0-0), sulfato de amonio (21-0-0-24 S) y urea (46-0-0); ésta última supera en demanda a todos los fertilizantes juntos antes mencionados, siendo el Ecuador muy dependiente de la importación de estos fertilizantes [3, 4].

La eficiencia del uso del N se refiere a la cantidad de N que la planta absorbió del fertilizante que fue aplicado al suelo. En el cultivo de maíz se ha observado mediante la



experimentación que un 34% del N aplicado al suelo fue absorbido por la planta. Esta eficiencia del N se obtuvo en sistemas de producción convencionales y en aquellos con cero labranza y quema de rastrojo [5]. La eficiencia agronómica del uso del N refiere al rendimiento del cultivo en relación a la cantidad de nitrógeno aplicado, habiéndose reportado eficiencias agronómicas de hasta 23% en un híbrido de maíz evaluado en zonas bajas del Litoral ecuatoriano [6].

El N y su eficiencia han recibido especial atención por ser el nutriente más móvil dentro de la relación atmósfera, suelo y planta. El grado de aprovechamiento de N del fertilizante aportado al suelo ha sido medido utilizando diferentes métodos: el diferencial (convencional) y el isotópico. El primero, el más sencillo y menos costoso, se basa en estimar la diferencia de N absorbido entre las plantas fertilizadas y las no fertilizadas. Puede ocurrir que las plantas fertilizadas absorban más N del suelo que las plantas testigo, debido a un mayor desarrollo radical inducido por la fertilización. El método isotópico utiliza ^{15}N y permite conocer la cantidad de N absorbido por la planta que vino del fertilizante aplicado, bajo el supuesto que no se produce intercambio isotópico entre el N del fertilizante y el del suelo [7, 8].

Se conoce que el fraccionamiento de las aplicaciones de N durante el ciclo de cultivo permite incrementar la eficiencia del uso del fertilizante y consecuentemente las cosechas; ya que la planta recibe lo que necesita a medida que aumenta su desarrollo, en lugar de realizar una sola aplicación antes de la siembra, práctica con la que la mayor parte del fertilizante no es aprovechado por la planta [9].

La práctica de la agricultura sin la utilización de fertilizantes nitrogenados se hace imposible cuando se requiere la generación de alimentos en gran cantidad para una población que crece cada día; sin embargo, es posible la utilización de nuevas tecnologías como la incorporación de abonos verdes, siembra de leguminosas, adiciones constantes de materia orgánica, mismas que ayudan a aumentar la bio-disponibilidad de N [10].

El uso de abonos verdes mediante el empleo de especies leguminosas es una técnica que aporta N al suelo y al cultivo siguiente de manera considerable, el N que aportan las leguminosas es fijado principalmente de la atmósfera, debido a la capacidad de fijación biológica que poseen mediante la simbiosis con bacterias *Rhizobium* spp [11]. Se estima que la incorporación de abonos verdes al suelo permite incorporar entre 50 a 80 kg N ha⁻¹ para la avena (*Avena sativa*) mientras que para la vicia la cantidad está entre 150 y 250 kg ha⁻¹. Para el caso del frijol (*Phaseolus vulgaris*) el aporte es de 30 a 60 kg N ha⁻¹, para el cultivo de chocho (*Lupinus mutabilis*) la cantidad es mayor siendo entre 300 a 600 kg N ha⁻¹ [12].

La materia orgánica del suelo es la principal fuente de N para las plantas. De esta se derivan el nitrato y el amonio. Una vez que el nitrato es absorbido por la planta, es reducido con un gasto energético que proviene de la fotosíntesis. En cambio, el amonio no se reduce y se incorpora inmediatamente a las aminas y amidas de la planta [7]. El objetivo de esta investigación fue evaluar la eficiencia agronómica del uso de abonos verdes y la fertilización nitrogenada sobre la biomasa y el rendimiento del cultivo de maíz de valles altos (>2000 msnm), y estimar la mejor época de aplicación de nitrógeno que permita incrementar rendimiento y la eficiencia de recuperación del nitrógeno aplicado en el cultivo de maíz de altura.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el Campo Académico Docente Experimental La Tola (CADET) de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central del Ecuador (UCE), cuya ubicación política, geográfica y clima, se presenta en la Tabla 1. Las propiedades químicas y físicas del suelo donde se realizó la investigación se detallan en la Tabla 2.

TABLA 1. Ubicación política, geográfica y clima del Campo Académico Docente Experimental La Tola (CADET), Pichincha.

Ubicación	Localidad
Provincia	Pichincha
Cantón	Quito
Parroquia	Tumbaco
Sitio	CADET
Altitud (m.s.n.m.)	2460
Latitud	78° 21' 18'' S
Longitud	00° 13' 49'' O
Temperatura (°C)	15
Precipitación (mm)	927
Humedad relativa (%)	76
Heliofanía (h)	1957
Nubosidad (octas)	6

Fuente: [28].

TABLA 2. Reporte del análisis químico de suelos donde se evaluó el efecto del uso de abonos verdes, dosis y tiempo de aplicación de N en el cultivo de maíz de valles altos. Campo Académico Docente Experimental La Tola, Pichincha.

Nutriente	Valor	Interpretación	Unidad
pH	6.40	LA	
MO	3.00	M	%
N-NH ₄ ⁺	31.00	M	mg kg ⁻¹
P	18.00	M	mg kg ⁻¹
S	13.00	M	mg kg ⁻¹
K	0.65	A	meq 100ml ⁻¹
Ca	7.30	M	meq 100ml ⁻¹
Mg	3.60	A	meq 100ml ⁻¹
Zn	0.30	B	mg kg ⁻¹
Cu	6.70	A	mg kg ⁻¹
Fe	78.00	A	mg kg ⁻¹
Mn	9.50	M	mg kg ⁻¹



Nutriente	Valor	Interpretación	Unidad
B	0.90	B	mg kg ⁻¹
Textura	Franco Arenoso		

A=Alto, M=Medio, B=Bajo y LA=Ligeramente ácido.

Determinación de la eficiencia agronómica en la incorporación de abonos verdes y dosis de N

En el CADET se implementó un experimento para evaluar el efecto de tres especies de abono verde incorporadas al suelo. Se sembró dos especies leguminosas fijadoras de nitrógeno como chocho (*Lupinus mutabilis*) y vicia (*Vicia* sp.) y se utilizó la avena (*Avena sativa*), como especie no fijadora de nitrógeno y fue el testigo. Se incorporaron como biomasa luego de la floración (6.44, 6.87 y 7.49 t ha⁻¹ de chocho, vicia y avena, respectivamente). En el siguiente ciclo de cultivo se sembró maíz de valles altos con cinco niveles de nitrógeno (0, 45, 90, 135 y 180 kg ha⁻¹), siendo urea (46% de N) la fuente del fertilizante utilizado. El fertilizante nitrogenado se aplicó fraccionadamente en partes iguales a la siembra, 35 y 70 días después de la siembra; que corresponden a las etapas vegetativas del maíz V3-V4 y V6-V7, respectivamente.

El diseño experimental utilizado fue de parcela dividida [13], con 15 tratamientos en total. La parcela grande (208 m², 26 surcos de 10 m de largo) correspondió a las especies de leguminosas y al cereal incorporados, y en las parcelas pequeñas (16 m², 5 surcos de 4 m de largo) los niveles de nitrógeno, con tres repeticiones.

El rendimiento de la biomasa seca se determinó en la etapa R3 (madurez fisiológica), en la cual se incluyó los órganos vegetativos y reproductivos de la planta de maíz. El rendimiento de grano se evaluó a la cosecha en seco, pesando las mazorcas cosechadas luego de la madurez fisiológica, y ajustando el rendimiento del grano al 14% de humedad [14].

La eficiencia agronómica del uso del N (EAN) se estimó mediante la diferencia entre el rendimiento del tratamiento con fertilizante y el rendimiento del tratamiento testigo (sin fertilizante), dividida para la cantidad de nitrógeno aplicado y el resultado se expresó en porcentaje [6, 15].

La absorción de N se la estimó en toda la planta, para lo cual se tomaron cuatro plantas del surco central por cada parcela. Luego de un proceso de picado y secado en estufa a 60°C, la muestra se analizó mediante el método de semimicro-Kjeldahl [16] en el laboratorio del Departamento de Manejo de Suelos y Aguas de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP.

Eficiencia de la recuperación de N en la incorporación de abonos verdes y el tiempo de aplicación del fertilizante nitrogenado, mediante la técnica isotópica ¹⁵N

En un diseño de parcela dividida con tres repeticiones, se evaluó la eficiencia de la incorporación de abonos verdes (las mismas especies indicadas en el experimento

anterior) y la aplicación de N (dosis de 90 kg ha⁻¹) en tres épocas de aplicación: siembra, 35 y 70 días después de la siembra. El tamaño de las parcelas fue el mismo que se utilizó en el experimento anterior. Los tratamientos correspondientes a las épocas de aplicación se ubicaron en las parcelas pequeñas. El fertilizante marcado fue urea ¹⁵N, que se aplicó según los tratamientos en estudio (Tabla 3). La urea marcada con ¹⁵N (concentración, 5.16% átomos en exceso) se aplicó diluida en agua destilada y con regadera a lo largo de los surcos de la parcela pequeña.

TABLA 3. Tratamientos con especies leguminosas y avena incorporados al suelo previo al cultivo de maíz, con diversas épocas de aplicación de nitrógeno utilizando la técnica isotópica de ¹⁵N.

Tratamientos	Abono verde incorporado al suelo (parcela grande)	Época y dosis N (kg ha ⁻¹)		
		Siembra	35 dds [†]	70 dds
T1	Chocho	30*	30	30
T2	Chocho	30	30*	30
T3	Chocho	30	30	30*
T4	Vicia	30*	30	30
T5	Vicia	30	30*	30
T6	Vicia	30	30	30*
T7	Avena	30*	30	30
T8	Avena	30	30*	30
T9	Avena	30	30	30*
T10	Control sin abono verde	30*	30	30

* = Urea marcada con el isótopo ¹⁵N.

[†]dds = Días después de la siembra.

Para la siembra de ambos experimentos se utilizó la distancia de siembra de 0.80 m entre surcos y 0.25 m entre plantas, obteniéndose una densidad de población de 50000 plantas ha⁻¹. Se utilizó semilla de maíz (*Zea mays*, L.) de la variedad INIAP-180 [17]. Los experimentos se sembraron el 24 de mayo del 2016 (45 días después de la incorporación del abono verde) y se cosechó en seco (a la madurez fisiológica) el 31 de enero del 2017. Se realizaron cuatro aplicaciones de riego de auxilio con láminas de 4 mm cada una, mientras que el resto del manejo agronómico se lo realizó según las recomendaciones técnicas para cultivar maíz en la sierra del Ecuador [18].

Para evaluar la eficiencia de uso del fertilizante (EUN), según la metodología isotópica (EU¹⁵N), se determinó la cantidad del nitrógeno absorbido por la planta del tratamiento con fertilizante marcado con ¹⁵N, y este resultado se dividió entre la dosis de nitrógeno aplicado y el resultado se expresó en porcentaje [19]. Para el análisis isotópico de ¹⁵N, se enviaron muestras secas, molidas y envasadas a la Universidad de Florida, para su determinación por la técnica de espectrometría de masas [20]. La EUN total se estimó sumando la eficiencia obtenida en las tres aplicaciones, realizando el ANOVA solo para los tratamientos de la parcela grande (incorporación de abonos verdes).



Análisis estadísticos

En ambos experimentos se realizaron Análisis de Varianza (ANOVA) para todas las variables evaluadas y en caso de existir diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) se realizó la prueba de Fisher LSD para diferencia de medias. Previo al ANOVA, los datos de cada variable fueron sometidos a la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks, y en caso de datos no normalizados se procedió con la transformación logarítmica de los mismos. Se utilizó el programa estadístico Infostat [21].

RESULTADOS

Determinación de la eficiencia agronómica de la incorporación de abonos verdes y dosis de nitrógeno

El análisis de la varianza para la absorción de N, encontró diferencias altamente significativas para niveles de nitrógeno ($p < 0.01$) y no tuvieron significancia estadística las especies leguminosas incorporadas y la interacción. El coeficiente de variación del 12.63% es confiable para esta investigación (Tabla 4). La prueba de LSD al 5% para la extracción de nitrógeno mostró tres rangos de significancia en las dosis de nitrógeno, encontrándose la menor extracción en el tratamiento sin N (dosis de 0 kg ha⁻¹) con 173.36 kg ha⁻¹ de N, y la mayor extracción con 233.84 kg ha⁻¹ de N para la dosis más alta del fertilizante (180 kg ha⁻¹). La absorción de nitrógeno con las especies de incorporadas lupinos, vicia y avena en el cultivo de maíz fueron similares (Tabla 4).

TABLA 4. Promedios y significación estadística del ADEVA de la absorción de nitrógeno (N) y eficiencia agronómica de la fertilización nitrogenada (EAN) utilizando la técnica convencional no isotópica en el cultivo de maíz de valles altos para diversos tipos de abonos verdes y dosis de N.

Abono verde (A) / Dosis N (D) (kg ha ⁻¹)	Absorción N (kg ha ⁻¹)	Biomasa (t ha ⁻¹)	Rendimiento grano (t ha ⁻¹)	EAN (kg kg N ⁻¹)
Chocho	231.78	20.17	6.06	19.74
Vicia	231.23	19.88	5.91	17.39
Avena	222.61	19.03	5.99	19.36
0	173.36 a [†]	16.32 a	4.14 a	-
45	229.77 b	19.42 b	6.12 b	39.99 a
90	244.42 bc	21.35 c	6.55 bc	24.82 b
135	261.29 c	21.34 c	6.76 c	18.08 c
180	233.84 b	20.05 bc	6.35 bc	11.25 d
Sig. ADEVA [†] (A)	Ns	Ns	Ns	Ns
Sig. ADEVA (D)	**	**	**	**
Sig. ADEVA (AxD)	Ns	Ns	Ns	Ns
CV (%)	12.63	8.31	8.10	33.01

[†]Medias seguidas con una letra común no son significativamente diferentes según LSD Fisher ($p > 0.05$).

[†] Ns = no significativo, ** = altamente significativo ($p < 0,001$).

El análisis de la varianza para la biomasa de las especies incorporadas de leguminosas y cereal, encontró diferencias altamente significativas para las dosis de nitrógeno ($p < 0.01$) y no tuvieron significación estadística las especies incorporadas y la interacción. El coeficiente de variación fue de 8.31%. La prueba de LSD al 5% para la biomasa de maíz con las dosis de nitrógeno encontró tres rangos de significancia, ubicándose con el mayor valor la dosis de 180 kg ha⁻¹ de N con 20.05 t ha⁻¹ de biomasa o forraje (Tabla 4 y Figura 1).

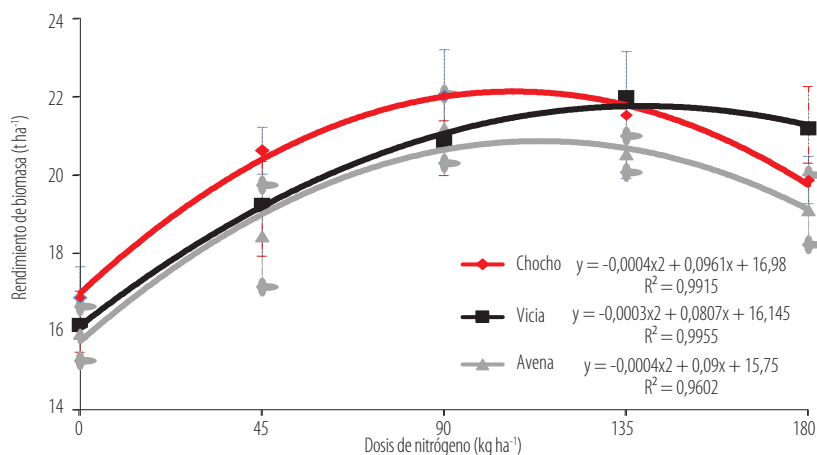


FIGURA 1. Efecto de las dosis de nitrógeno y la incorporación de abonos verdes en el rendimiento de biomasa en el cultivo de maíz de valles altos. Las barras representan el error estándar de la media.

El análisis de la varianza para el rendimiento de grano tuvo diferencias significativas para dosis de nitrógeno ($p < 0.001$) y no se encontró diferencias estadísticas por especies incorporadas y su interacción. El coeficiente de variación fue de 8.10%. La prueba de significación de LSD al 5%, tuvo tres rangos de significación, siendo el mayor la dosis de 135 kg ha⁻¹ con 6.55 t ha⁻¹ (Tabla 4).

El análisis de la varianza para la EAN, encontró diferencias altamente significativas para las dosis de nitrógeno; en tanto que, para las especies incorporadas y la interacción, no se encontraron diferencias estadísticas. Se tuvo un coeficiente de variación de 34.01%. La prueba de LSD al 5%, encontró tres rangos de significación, el mayor valor encontrado fue de 39.99 kg de grano kg N⁻¹ con la dosis de 45 kg ha⁻¹ (Tabla 4).

La dosis de nitrógeno aplicadas en el maíz con las especies incorporadas, tuvieron un efecto cuadrático, notándose que los mayores rendimientos se encuentran entre las dosis de 90 y 135 kg ha⁻¹ de nitrógeno (Figura 1).

Eficiencia de la recuperación de N en la incorporación de abonos verdes y el tiempo de aplicación del fertilizante nitrogenado, mediante la técnica isotópica ¹⁵N

El análisis de la varianza para la concentración de ¹⁵N no encontró diferencias estadísticas para la incorporación de las especies de leguminosas y cereal como abono verde. Sin embargo, se encontró alta significación estadística para el tiempo



de aplicación y ninguna significación estadística para la interacción entre tipo de abono verde y tiempo de aplicación. El coeficiente de variación fue de 4.92%. La prueba de LSD al 5% para el tiempo de aplicación del nitrógeno encontró tres rangos de significación, siendo la concentración más alta con 0.56% de ^{15}N a los 70 días después de la siembra (Tabla 5).

El análisis de la varianza para la concentración de N total, no tuvo significación estadística para la aplicación del abono verde, tiempo de aplicación y la interacción. El coeficiente de variación fue de 34.14% (Tabla 5).

TABLA 5. Promedios y significación estadística del ADEVA de la concentración de nitrógeno (N) y de la eficiencia de uso de la fertilización nitrogenada (EUN) utilizando la técnica isotópica ^{15}N en el cultivo de maíz de valles altos para diversos tipos de abonos verdes y tiempo de aplicación de urea.

Abono verde (A)/Tiempo de aplicación (T)	Concentración ^{15}N (%)	Concentración N total (%)	Biomasa (t ha^{-1})	Rendimiento grano (t ha^{-1})	EU ^{15}N (%)	EU ^{15}N acumulado (%)
Chocho	0.53	1.09	22.69 a	8.41	14.29	42.86
Vicia	0.52	1.12	22.04 ab	7.56	13.08	39.24
Avena	0.53	0.86	21.58 b	8.16	10.32	30.94
Sin residuo	0.52	0.87	19.63 b	8.27	8.64	25.91
0 dds [†]	0.50 a [‡]	0.96	21.48	8.08	8.92 a	
45 dds	0.53 b	1.05	22.83	7.99	13.80 ab	37.59
70 dds	0.56 c	1.03	21.40	8.13	14.87 b	
Sig. ADEVA [‡] (A)	Ns	Ns	*	Ns	Ns	Ns
Sig. ADEVA (T)	**	Ns	Ns	Ns	*	Ns
Sig. ADEVA (AxT)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
CV (%)	4.92	34.14	9.82	16.38	18.22	9.92

[‡]Medias seguidas con una letra común no son significativamente diferentes según Lsd Fisher ($p > 0.05$).
[†]dds = días después de la siembra, 45 dds (etapa vegetativa del maíz V3-V4), 70 dds (etapa vegetativa V6-V7).
 Ns = no significativo, * = significativo ($p < 0.05$), y ** = altamente significativo ($p < 0.001$).

El análisis de la varianza para la biomasa tuvo significación estadística para la aplicación de abono verde y no tuvo significancia estadística para tiempo de aplicación y la interacción. La prueba de significación del LSD al 5% obtuvo dos rangos de significación, siendo el mayor el cultivo de chocho con una biomasa de 22.69 t ha^{-1} (Tabla 5).

El análisis de la varianza para el rendimiento de grano no encontró significación estadística para la aplicación del abono verde, tiempo de aplicación y la interacción. El coeficiente de variación fue de 16.38% (Tabla 5).

El análisis de la varianza para la eficiencia de uso de ^{15}N (EU ^{15}N), mostró significación estadística para el tiempo de aplicación de nitrógeno y no encontró significación estadística para la aplicación de abono verde y la interacción. El coeficiente de variación del 18.22%. La prueba de LSD al 5% para el tiempo de aplicación del nitrógeno obtuvo dos rangos, siendo el mejor a los 70 días después de la siembra con 14.87% (Tabla 5).

El análisis de la varianza para la eficiencia de uso acumulado de ^{15}N (EU^{15}N acumulado), no tuvo significación estadística para la aplicación del abono verde, tiempo de aplicación y la interacción. El coeficiente de variación fue de 9.99% (Tabla 5).

DISCUSIÓN

La cantidad incorporada de abono verde está en función de la especie empleada, desarrollo vegetativo, tipo de suelo, condiciones climáticas y demás factores de la producción. La mejor época para realizar la incorporación del abono verde es en la floración de las especies debido a que en este estado los nutrientes están concentrados en los órganos vegetativos y aún no han sido trasladados hacia otros órganos como frutos, por lo que los nutrientes serán aprovechados en su totalidad [11].

La acumulación y re-movilización de N en la planta de maíz se expresa con el índice de cosecha, el cual tiene valores que varían entre 59 y 69%, considerando la relación fuente-demanda. Se estima que entre el 31 y 41% del N acumulado en la biomasa se queda en el rastrojo y es devuelto al suelo mediante la incorporación [7].

Otros estudios han reportado un efecto de la incorporación de abono verde sobre el rendimiento del cultivo [22, 23]. En este estudio no se observó un efecto significativo de la incorporación de abonos verdes, tanto en el método convencional como isotópico (Tabla 4). Esto pudo deberse a varios factores, como la disponibilidad de nitrógeno en el suelo donde se realizó el experimento (Tabla 2) y la incorporación del abono verde que fue muy cerca de la siembra (45 días); lo que no permitió que el nitrógeno incorporado por el abono esté disponible para el cultivo de maíz debido a los periodos de mineralización, que por las condiciones de altitud y temperatura se alargan en la Sierra del Ecuador [24].

Se observó un efecto significativo sobre el rendimiento del cultivo de maíz, en biomasa y de grano, con la aplicación del nitrógeno utilizando como fuente la urea. Estos resultados corroboran lo indicado por [25, 26], quienes reportaron un incremento de rendimiento de hasta 10% sobre el testigo. En este estudio, el mayor rendimiento de grano se observó con la dosis de 135 kg N ha^{-1} con 6.76 t ha^{-1} (grano seco, ajustado al 14% de humedad), lo que representó un incremento de 39% en referencia al testigo sin aplicación de nitrógeno (Tabla 4).

La eficiencia agronómica del nitrógeno (EAN) en el cultivo de maíz de altura fue mayor con la menor dosis de nitrógeno (45 kg N ha^{-1}), que correspondió a un rendimiento de 6.12 t ha^{-1} , lo que significa que con cada kilogramo de N aplicado se obtuvo 39.99 kg de maíz. Zamudio y colaboradores [27] reportaron EAN de 20.9 kg de grano kg de N^{-1} , con una dosis de 168 kg N ha^{-1} , que fue similar a la EAN obtenida en este estudio con la dosis de 180 kg N ha^{-1} (Tabla 4 y Figura 2).

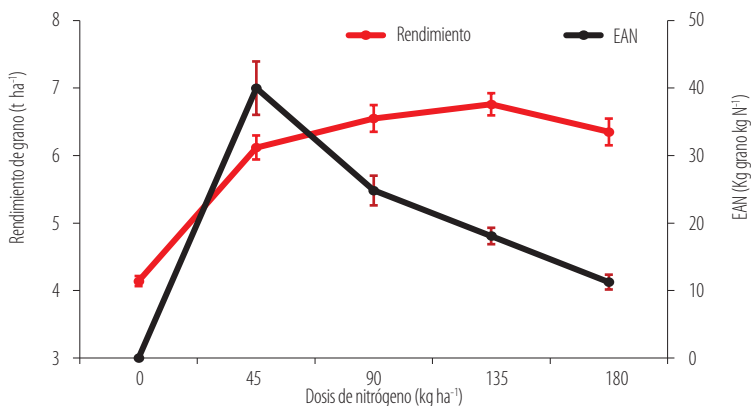


FIGURA 2. Efecto de cinco dosis de nitrógeno en el rendimiento de grano y la eficiencia agronómica del uso del nitrógeno (EAN) en el cultivo de maíz de valles altos. Las barras representan la desviación estándar de la media.

El uso de ¹⁵N permitió encontrar diferencias estadísticas significativas para el tiempo de aplicación del nitrógeno en el cultivo de maíz de altura, mientras que con el uso de la técnica convencional de N total no fue posible (Tabla 5). Este estudio reportó que la mayor absorción de nitrógeno (ER¹⁵N) se obtuvo a los 70 dds, con una eficiencia de 14.87%. Este resultado es diferente a la recomendación que realiza el Programa de Maíz del INIAP, que indica que el fertilizante se debe aplicar a la siembra y a los 45 días después de la siembra [18]. Esto implica que se deben revisar las recomendaciones sobre el tiempo de aplicación de la fertilización nitrogenada para el cultivo de maíz de altura.

La eficiencia de uso de la fertilización nitrogenada EU¹⁵N acumulada para la incorporación de abono verde en el cultivo de maíz de altura fue de 37.68%, 11.77% superior al testigo donde no se incorporó materia verde. Estos valores son muy similares a los reportados por otros autores [19].

CONCLUSIONES

La incorporación de abono verde (lupino) incrementó la biomasa (follaje) en el cultivo de maíz en un 15% con respecto al testigo; pero no influyó en el rendimiento de grano, que en promedio fue de 8.10 t ha⁻¹. La fertilización nitrogenada tuvo un efecto significativo sobre el rendimiento del cultivo. El mayor rendimiento de grano y follaje se observó con la dosis de 135 kg N ha⁻¹; mientras que la mayor eficiencia agronómica (EAN) se obtuvo con la dosis de 45 kg N ha⁻¹, lo que significa que con cada kilogramo de N aplicado se obtuvo 39.99 kg de maíz.

La técnica isotópica permitió diferenciar la época en la que el cultivo de maíz de valles altos de la región Andina del Ecuador realiza la mejor absorción de nitrógeno, observándose que la mayor eficiencia en el uso de nitrógeno (EUN) con 14.87% que se logró a los 70 dds. La EUN acumulada fue de 33.59%. Estos resultados reflejan la

importancia del uso de la técnica isotópica para trabajos de nutrición vegetal, que permitirán revisar las recomendaciones de manejo de la fertilización nitrogenada para el cultivo de maíz de altura.

RECONOCIMIENTO

Los autores agradecen el apoyo del Dr. Takashi Muraoka, profesor del Centro de Energía Nuclear para la Agricultura (CENA) de Piracicaba, Brasil, quien ayudó con el análisis de los resultados de laboratorio. Esta investigación se ejecutó en el marco del proyecto del Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) RLA/5/065 "Mejora de los sistemas de producción agrícola mediante la eficacia en el uso de los recursos (ARCAL CXXXVI)". Un resumen de este trabajo se presentó en el *II Simposio Latinoamericano de Aplicaciones Nucleares* en la Agricultura realizado en marzo de 2020 en la ciudad de Quito, Ecuador.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Soraya Alvarado y Franklin Valverde concibieron la investigación y metodología; junto a Rafael Parra desarrollaron y realizaron el trabajo de campo y laboratorio; Yamil Cartagena y José Luis Zambrano realizaron los análisis estadísticos y redactaron el manuscrito. Todos los autores revisaron críticamente el contenido intelectual del manuscrito.

REFERENCIAS

- [1] ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications) (2014). Nitrogen use efficient biotech crops. Pocket K No. 46. Available at: <https://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/46/default.asp>
- [2] Morales, E., Rubí, M., López, J., Martínez, A., & Morales, E. (2019). Urea (NBTP) una alternativa en la fertilización nitrogenada de cultivos anuales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 10 (8): 1875-1886.
- [3] Boaretto, A., Muraoka, T., & Trevelin, P. (2007). Uso eficiente del nitrógeno de los fertilizantes convencionales. *Informaciones agrónomicas*. 13-14.
- [4] Llive, F. M. (2016). Vulnerabilidad y dependencia internacional de fertilizantes en el Ecuador. *Revista Tecnológica - ESPOL*, 29(2): 69 – 88.
- [5] Rouanet, J., Pino, I., A. P., & Nairo, A. (1999). *Eficiencia de uso de fertilizante en el cultivo de trigo*. En J. Roanet, I. Pino, P. A., & A. Nairo, Nitrógeno en producción de trigo, eficiencia de uso de N-fertilizante por la planta y N-fertilizante por el suelo (págs. 23 - 30). Santiago de Chile.
- [6] Motato, N., Pincay, J., Avellán, M., Falcones, M., & Aveiga, E. (2016). Fertilización del híbrido experimental de maíz INIAP H-603, con base en la eficiencia agronómica del nitrógeno. *ESPAMCIENCIA* 7 (2): 109-116.
- [7] Uhart, S., & Echeverría, H. (2006). El rol del nitrógeno y el fósforo en la producción de maíz. Diagnóstico de la fertilización nitrogenada y fosforada. Semillas Híbridas Morgan, 5-8-16.
- [8] Stewart, W. (2007). Consideraciones en el uso eficiente de nutrientes. *Informaciones agrónomicas*, 67: 3.
- [9] Cassman, K., Dobermann, A., & Walters, T. (2002). Agroecosystems, nitrogen use efficiency and nitrogen management. *Agronomy and Horticulture Faculty Publications*. 2-4.
- [10] Barbieri, P., Echeverría, H., Sainz, H., & Maringolo, M. (2010). Fertilización de maíz con urea de liberación lenta: pérdida por volatilización y eficiencia de uso de nitrógeno. *Ciencia del suelo*. 28: 57-66.
- [11] Guzmán, G., & Mielgo, A. (2008). *Buenas prácticas en producción ecológica. Uso de abonos verdes*. Santa Fé de Granada - España: Ministerio de Ambiente, Rural y Marino.
- [12] Alvarado, S., Valverde, F., Quishpe, J., & Parra, R. (2014). Los abonos verdes. Proyecto PIC-12-INIAP-009 "Manejo adecuado de abonos verdes y microorganismos fijadores de nitrógeno dentro de sistemas de producción agroecológicos". Quito.
- [13] Clewer, A. G., & Scarisbrick, D.H. (2001). *Practical statistics and experimental design for plant and crop science*. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, England. 331p.
- [14] CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo) (1995). Manejo de los ensayos e informe de los datos para el Programa de Ensayos Internacionales de Maíz del CIMMYT. Disponible en: <https://repository.cimmyt.org/handle/10883/764>
- [15] Aguilar-Carpio, C., Salvador Escalante, J. A., Estrada, I. Aguilar Mariscal, J. A. Mejía Contreras, V. F. Conde Martínez, A., & Trinidad Santos. (2016). Eficiencia agronómica, rendimiento y rentabilidad de genotipos de maíz en función del nitrógeno. *Terra Latinoamericana* 34: 419-429.
- [16] Etchevers, J. (1988). Análisis químico de suelos y plantas. Centro de Edafología, Colegio de Posgraduados. Montecillo, Estado de México.
- [17] Caviedes, M. (1986). "INIAP-180": Nueva variedad de maíz de alto rendimiento. INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Programa de Maíz. (Boletín Divulgativo no. 180). Quito, Ecuador. Disponible en: <http://repositorio.iniap.gob.ec/jspui/handle/41000/255>
- [18] Yáñez, C., Velásquez, J., Peñaherrera, D., Zambrano, J., Caicedo, M., Heredia, J., Sangoquiza, C., & Quimbita, A. (2010). Guía de producción de maíz de altura. INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Programa de Maíz. (Guía no. 96). Quito, Ecuador: Disponible en: <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/2440>
- [19] Urquiaga, S. & Zapata, F. (2000). *Manejo eficiente de la fertilización nitrogenada de cultivos anuales en América Latina y el Caribe*. Porto Alegre; Génesis; Río de Janeiro. EMBRAPA Agrobiología 110 p.

- [20] Barrie, A. (1991). New methodologies in stable isotope analysis. p. 3-36. Proceedings of Symposium Stable Isotopes in Plant Nutrition, Soil Fertility and Environmental Studies, Vienna. 1-5 October 1991. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria.
- [21] Di Rienzo J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M., & Robledo, C.W. (2020). InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>
- [22] García, J., Murillo, B., Nieto, A., Fortis, M., Márquez, C., Castellanos, E., Quiñones, J., & Avila, N. (2010). Avances en investigación y perspectivas del aprovechamiento de los abonos verdes en la agricultura. *Terra Latinoamericana*, 28(4), 391-399.
- [23] Castro, E., Sierra, A., Mojica, J., Carulla, J., & Lascano, C. (2016). Uso múltiple de leguminosas como abono verde, en rotación con maíz y heno, para producción de leche. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 17. 17. 10.21930/rcta.vol17_num1_art:456.
- [24] Martín, G., & Espinosa, R. (2004). Mineralización del nitrógeno incorporado con los abonos verdes y su participación en la nutrición de cultivos de importancia económica. *Cultivos Tropicales*. 25. 89-96.
- [25] Salazar, E., Beltrán, F., Fortis, M., Leos, J., Cueto, J., & Vázquez, C. (2003). Mineralización de nitrógeno en el suelo y producción de maíz forrajero con tres sistemas de labranza. *Terra*. 21:561-567.
- [26] Boada, R., & Espinosa, J. (2016). Factores que limitan el potencial de rendimiento del maíz de polinización abierta en campos de pequeños productores de la Sierra de Ecuador. *Revista Siembra* 3: 067-082
- [27] Zamudio, B., Tadeo, M., Espinosa, A., Martínez, J., Celis, D., Valdivia, R., & Zaragoza, J. (2015). Eficiencia agronómica de fertilización al suelo de macro nutrientes en híbridos de maíz. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(7), 1557-1569.
- [28] INAMHI. (Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología). (2018). Anuario Meteorológico. Quito: INAMHI.

Tratamiento postcosecha con radiación gamma para extender la vida útil de papa chaucha amarilla (*Solanum phureja*)

Eddy Paul Anguisaca Totasig¹, María Cristina Cuesta Plúa¹, Marco Vinicio Sinche Serra^{1*}

¹Departamento de Ciencias Nucleares, Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria, Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador

*Autor para correspondencia/ Corresponding author, e-mail: marco.sinche@epn.edu.ec

Post-harvest treatment with gamma radiation to increase shelf life of yellow chaucha potato *Solanum phureja*

Resumen

Solanum phureja es una variedad andina de papa con un alto potencial de exportación, gracias a sus propiedades nutricionales, organolépticas y funcionales; sin embargo, su tiempo de vida en percha es muy reducido. Esta investigación tuvo como objetivo evaluar el tratamiento de este tubérculo con radiación gamma para retardar la brotación. Se empleó un diseño factorial 4x2 para seleccionar la mejor combinación de dosis (0, 80, 120 o 160 Gy) y tiempo después de la cosecha (uno o cinco días) del tratamiento. Asimismo, se utilizó un diseño factorial 3x2 para seleccionar la mejor combinación de dosis de clorprofam (CIPC) (0, 20 o 30 mg kg⁻¹) y tiempo después de la cosecha (uno o cinco días); este es un tratamiento químico común para retrasar la germinación de la papa. El mejor tratamiento físico correspondió a la irradiación con una dosis de 120 Gy, cinco días después de la cosecha; que produjo una pérdida de peso de 16.5%, una pérdida de firmeza de 17.2%, ausencia de brotes y 4.0% de pudrición, después de 40 días de almacenamiento a 19 ° C y 60% de humedad relativa. El mejor tratamiento químico correspondió a la aplicación de 30 mg de CIPC kg⁻¹ a los cinco días de la cosecha, y produjo una pérdida de peso del 17.4%, una pérdida de firmeza del 21.0 %, un 8.0% de podredumbre y la aparición de brotes después de 25 días. En las papas de la muestra control (sin ningún tratamiento), la pérdida de peso fue del 23.7%, la pérdida de firmeza del 20.9%, la pudrición del 7.0% y la aparición de brotes a los seis días. Los análisis sensoriales (apariciencia, color, textura y sabor) y proximal (contenido de humedad, cenizas, proteína, extracto etéreo, fibra cruda y carbohidratos totales) revelaron que los tratamientos aplicados no afectaron las características organolépticas y nutricionales de las papas. Estos resultados sugieren que la irradiación de chaucha amarilla permite incrementar su vida útil en aproximadamente 33 días, conservando su calidad.

Palabras clave: Clorprofam, Pudrición, Radiaciones ionizantes, Tubérculo.

Editado por /
Edited by:
Gabriela Albán

Recibido /
Received:
05/10/2020

Aceptado /
Accepted:
24/10/2020

Publicado en línea /
Published online:
01/04/2021

Abstract

Solanum phureja is an andean potato variety with a high export potential, thanks to its nutritional, organoleptic and functional properties; however, its shelf life is very short. The aim of this research was to evaluate the treatment of this tuber with gamma radiation to delay sprouting. A 4x2 factorial design was used to select the best dose (0, 80, 120 or 160 Gy) and time after harvest (one or five days) of the treatment. Similarly, a 3x2 factorial design was used to select the best chlorpropham (CIPC) dose (0, 20 or 30 mg kg⁻¹) and time after harvest (one or five days). This is a common chemical treatment to delay sprouting in potato. The best physical treatment corresponded to the irradiation with a dose of 120 Gy, five days after harvest; it produced a weight loss of 16.5%, a firmness loss of 17.2%, no sprouts and 4.0% of rotteness after 40 days of storage at 19 °C and 60% relative humidity. The best chemical treatment corresponded to the application of 30 mg CIPC kg⁻¹ five days after harvest, and it produced a weight loss of 17.4%, a firmness loss of 21.0%, 8.0% of rotteness and the appearance of sprouts after 25 days. In the potatoes of the control sample (without any treatment), weight loss was 23.7%, firmness loss was 20.9%, rotteness of 7.0% and the appearance of sprouts after six days. Sensory analysis (appearance, color, texture and flavor) and proximal analysis (moisture, ashes, protein, lipids, crude fiber and carbohydrates content) showed that the applied treatments did not significantly affect the organoleptic or nutritional content of the potatoes. These results suggest that irradiation of *Solanum phureja* could increase its shelf life and keep the quality by approximately 33 days.

Keywords: Chlorpropham, Ionizing radiations, Rotteness, Tuber.

INTRODUCCIÓN

La papa *Solanum tuberosum* se originó y domesticó en los Andes. Es el cuarto producto agrícola de mayor consumo a nivel mundial, luego del trigo, maíz y arroz [1]. Por su alto consumo y distribución global, fue definida con el lema "Papa, alimento ayer, hoy y siempre" en el XXVI Congreso de la Asociación Latinoamericana de la Papa-ALAP en el 2014 [2]. Un 50% de la producción mundial de papa se consume en fresco, el resto se destina a la elaboración de productos e ingredientes alimenticios procesados, piensos de animales, semillas, industria farmacéutica y de combustibles [1]. En Ecuador, el porcentaje de papa que se destina al consumo en fresco es mayor al promedio mundial, aunque se ha observado una tendencia a la baja, de un 90% en 2002 a un 74% en 2012 [3, 4]. En los Andes de Perú, Bolivia y Ecuador crecen más de 4000 variedades nativas, entre ellas se encuentra la papa chaucha amarilla *Solanum phureja* [1]. Esta variedad se caracteriza por una corta vida postcosecha, debido a la aparición de brotes entre cinco y ocho días luego de la cosecha [5, 6], o inclusive antes [7, 8], pero tiene un corto ciclo vegetativo (110 a 120 días) que permite establecer de tres a cuatro ciclos de siembra-cosecha por año [9, 10].

Por su corta vida útil, la comercialización de chaucha amarilla se torna difícil y los productores sufren altas pérdidas económicas. No se reportan datos en Ecuador, pero en el vecino país de Colombia la variedad chaucha amarilla registra pérdidas



postcosecha de hasta un 50% en el almacenamiento, transporte e industrialización [11]. Por lo tanto, la inhibición de brotes durante el período de dormancia de los tubérculos es de gran importancia económica. Para ello, se utiliza el almacenamiento refrigerado a temperatura entre 4 y 10 °C y humedad relativa (HR) de 85 a 90%, y la aplicación de reguladores de crecimiento; en países tropicales se utiliza la combinación de ambos [12].

Por más de 50 años, el isopropil 3-clorocarbanilato [13, 14], clorprofam, CIPC o N-3-clorofenil isopropil carbamato ha sido utilizado como el principal inhibidor de brotes en papas, pero en la actualidad existen preocupaciones por el alto grado de toxicidad que exhiben los metabolitos presentes o formados en los tubérculos tratados con él [12]. Por su extensivo uso, además, se presenta el riesgo de contaminación de los tubérculos que se usan como semilla, lo que provoca un retraso en el crecimiento de las plantas y una baja producción de tubérculos [15]. La Organización de Protección de Plantas de Norte América (NAPPO por sus siglas en inglés) establece como límite máximo de residuos de CIPC en papas frescas para consumo humano el valor de 15 mg kg⁻¹ para Canadá y de 30 mg kg⁻¹ para Estados Unidos [12]. Con el fin de asegurar la seguridad alimentaria y satisfacer la demanda de los consumidores por alimentos naturales, frescos, con mejor calidad nutricional y con una vida útil amplia, existe la necesidad de aplicar nuevas tecnologías o de modificar o combinar las técnicas tradicionales de conservación [16].

Paul Ezekiel y Pandey [12] discutieron la necesidad de buscar alternativas más seguras y efectivas que el CIPC y señalaron al tratamiento con radiación gamma como una opción. El Organismo Internacional de Energía Atómica (IAEA, por sus siglas en inglés) manifiesta que la irradiación de alimentos constituye una tecnología multipropósito y comprende un proceso mediante el cual un producto alimenticio se expone a radiaciones ionizantes con el fin de mantener su calidad e inocuidad [17]. La radiación ionizante actúa en tres fases: (1) acción física primaria sobre los átomos, la cual provoca la formación de moléculas ionizadas y radicales libres; (2) cambios químicos, que forman compuestos radioquímicos estables, de constitución determinada por la composición y estructura molecular del material tratado; (3) efectos biológicos, que incluyen la modificación en la membrana celular, reducción de la actividad enzimática y, por consecuencia, la reducción de la síntesis de ácidos nucleicos, lo cual afecta el metabolismo energético de la fosforilación y altera la composición del ADN [18].

La irradiación se utiliza a escala comercial para esterilizar, favorecer el control de plagas, prevenir enfermedades transmitidas por alimentos y retardar la germinación y maduración de frutas y vegetales [19]. Cada año se incrementan a nivel mundial los centros multipropósito de irradiación y, por ende, el número de alimentos procesados y productos agrícolas tratados principalmente con irradiación gamma [20, 21]. El IAEA ha propuesto dosis entre 0.1 y 1.0 kGy para la inhibición de brotes y el retraso en la maduración de bulbos y tubérculos [17].

En 1958, la ex Unión Soviética autorizó el consumo de papas irradiadas, desde entonces se han llevado a cabo numerosos estudios acerca de la aplicación de radiación gamma sobre este producto [22]. La irradiación es una técnica postcosecha eficaz para el almacenamiento de papas en condiciones no refrigeradas; se han reportado también valores de 0.08 y 0.12 kGy como las mejores dosis para mantener las propiedades físicas y mecánicas en la variedad "Kufri Sindhuri", almacenada a 22 °C durante 120 días [23].

Otros estudios en la variedad "Ágata", almacenada por 35 días a 21 °C y 39% de HR, reportaron 0.15 kGy como la mejor dosis para reducir pérdidas postcosecha [24].

Para el caso de la variedad chaucha amarilla, Zavala [25] evaluó los efectos de diferentes dosis de radiación gamma (0.025; 0.050; 0.075 y 0.10 kGy) sobre la expresión fenotípica; la dosis de 0.050 kGy indujo el retraso en la brotación y existieron cambios morfológicos en la coloración y forma de hojas y flores. Guzman, [26] realizó la caracterización fenotípica empleando radiación gamma sobre papa chaucha amarilla y determinó que no se inhibe el proceso de germinación, solamente se retrasa el tiempo de emergencia de los brotes, al aplicar una dosis relativamente baja de 0.025 kGy.

El objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto del tratamiento con radiación gamma sobre la vida útil de la papa chaucha amarilla en condiciones de almacenamiento no refrigerado (19 °C y 60% de humedad relativa) en la ciudad de Quito y compararlo con la aplicación de CIPC, como tratamiento referencial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y equipos

Se utilizó como materia prima tubérculos de chaucha amarilla cosechados el 16 y 20 de julio de 2017 (Grado A; 10% con no más del 1% de pudriciones húmeda y parda, de tercera de acuerdo con su tamaño de entre 30 y 44 mm de diámetro) en la parroquia Toacazo, cantón Latacunga, provincia de Cotopaxi. Se consideraron los requisitos de calidad para consumo humano, establecidos en la Norma NTN INEN 1516 [27].

Los reactivos utilizados fueron clorprofam o CIPC (Sigma Aldrich; pureza > 98%) y alcohol industrial (WEIR; pureza > 96%) para diluir el CIPC.

Los equipos utilizados fueron un irradiador panorámico con una fuente de cobalto 60, una balanza digital BODECO BPS-51 y un penetrómetro (McCORMICK FT-11; con sonda plana de 6 mm de diámetro).

Selección de la mejor dosis de irradiación

Las papas cosechadas fueron lavadas con agua potable para eliminar residuos de tierra y se secaron a condiciones ambientales de la parroquia Toacazo (15 °C y 60% de humedad relativa (HR)). Luego, se realizó la clasificación, selección, empaqueo y etiquetado en saquillos de nylon de 1 kg cada uno. Las muestras se transportaron a la ciudad de Quito y se almacenaron a condiciones ambientales (en promedio 19 °C y 60% de HR), a fin de emular la forma en la que comúnmente se almacenan las papas en esta ciudad. Los tubérculos cosechados el 16 (después de un día o 1D) y el 20 de julio de 2017 (después de cinco días o 5D), fueron irradiados el 21 de julio de 2017, con la fuente de cobalto 60 ubicada en el Laboratorio de Tecnología de Radiaciones (LTR) que pertenece a la Escuela Politécnica Nacional (EPN). Los saquillos fueron ubicados a 0.3 m del contorno de la fuente y los tiempos de irradiación fueron de 56, 83 y 111 min, en función de la dosis requerida.



Se utilizó un diseño experimental 4x2, en el que las variables de diseño fueron la dosis de radiación gamma (0, 80, 120 y 160 Gy) y el número de días desde la cosecha hasta la irradiación (1D y 5D). Se realizaron tres repeticiones; las unidades experimentales fueron saquillos de 1 kg de tubérculos. En el producto tratado se evaluaron parámetros de calidad y se hizo un análisis proximal y un análisis sensorial, según se describe posteriormente.

Selección de la mejor dosis de CIPC

Las papas lavadas y seleccionadas fueron tratadas con clorprofam. Se utilizó un diseño experimental 3x2, en el que las variables de diseño fueron la dosis de CIPC (0, 20 y 30 mg de CIPC kg⁻¹ de papa) y el número de días desde la cosecha hasta la irradiación (1D y 5D); se realizaron tres repeticiones.

Para ambos diseños experimentales, las muestras control correspondieron a papas del mismo tiempo postcosecha sin ningún tratamiento.

Evaluación de los parámetros de calidad poscosecha

Las muestras irradiadas y tratadas con CIPC fueron almacenadas en un cuarto oscuro a condiciones ambientales. Los parámetros de calidad postcosecha: brotación externa, diámetro y longitud de los brotes, pérdida de peso, pudrición, pérdida de firmeza, apariencia general y tiempo de vida útil, fueron evaluados los lunes, miércoles y viernes durante 40 días luego de la irradiación o la aplicación de CIPC.

Brotación externa

Se determinó la brotación externa mediante el conteo del número de tubérculos con brotes visibles [28] y se reportó su valor como porcentaje, con respecto al número total (10) de tubérculos examinados por cada repetición [29]; es decir que, una brotación externa del 0% significaría que ninguna de las papas evaluadas presentó brotes visibles.

Diámetro y longitud de los brotes

La medición del diámetro y de la longitud de los brotes se realizó con ayuda de una regla de acetato; se registraron los valores de un total de 10 tubérculos examinados por cada repetición.

Pérdida de peso

Los saquillos con papas fueron pesados antes de la aplicación de los tratamientos y cada dos días durante el periodo de almacenamiento, en una balanza electrónica BODECO BPS-51 (4000 g ± 0.1 g). Los resultados se reportaron como porcentaje de peso perdido [24].

Pudrición

La pudrición fue determinada mediante el pesaje de los tubérculos afectados con síntomas de descomposición o desintegración de tejidos. El valor obtenido se reportó como porcentaje con respecto al peso total del saquillo de cada tratamiento [29].

Pérdida de firmeza

Para la valoración de la pérdida de firmeza, se midió este parámetro cada viernes, durante los 40 días de almacenamiento, con un penetrómetro McCORMICK FT-11 de sonda plana de 6 mm de diámetro; se realizaron tres lecturas en la zona ecuatorial de los tubérculos por cada tratamiento [24].

Apariencia general y tiempo de vida útil

Para valorar la apariencia general de las papas, se tomó en cuenta el encogimiento, la marchitez y daños físicos en la superficie de los tubérculos. Se utilizó una escala de uno a cinco, según los siguientes criterios: (de 4 a 5) los tubérculos mantienen las características iniciales, (de 3 a 4) los tubérculos presentan cierto deterioro y daño, pero aún son aptos para comercialización, (de 1 a 3) los tubérculos no son comercializables [30]. Para la valoración del tiempo de vida útil se marcó el día en el cual los brotes alcanzaron 2 mm de longitud, de acuerdo con la Norma NTN INEN 1516:2012 [27] y también se tomó en cuenta la aparición de pudriciones y necrosis en los tejidos de los tubérculos.

Análisis proximal

Para la caracterización química de los tubérculos se realizó el análisis proximal de las muestras tratadas que presentaron los mejores resultados de calidad postcosecha y una muestra fresca (cosechada dos días antes). Se tomaron como referencia los requisitos establecidos en las Normas AOAC, ICC y FAO para el contenido de: humedad (AOAC 925.10), cenizas (AOAC 923.03), proteína (AOAC 2001.11), extracto etéreo (AOAC 934.01), fibra cruda (ICC 113), carbohidratos totales (FAO) y valor calórico (FAO); los análisis fueron realizados por triplicado [9], con muestras de 100 g. El análisis proximal fue realizado en el Departamento de Ciencia de Alimentos y Biotecnología (DECAB) de la Escuela Politécnica Nacional.

Análisis sensorial

Se usó una prueba discriminativa de comparación múltiple para determinar la preferencia entre los tubérculos correspondientes al mejor tratamiento físico (irradiación), el mejor tratamiento químico (aplicación de CIPC), y una muestra fresca (cosechada dos días antes). Para la cocción se utilizaron 1.5 kg de papa por cada tratamiento y se llevó a cabo en tres cacerolas a 91 °C durante 8 min. En recipientes desechables codificados, se presentaron a los panelistas dos tubérculos cocidos por cada tratamiento, un vaso de agua y la respectiva hoja de evaluación. Se registró la calificación de un total de 14 panelistas de tipo juez consumidor, quienes evaluaron apariencia, color, textura y sabor [30]. Los panelistas recibieron una explicación teórica del análisis que debían realizar.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó con ayuda del programa Statgraphics Centurion XV.11, mediante un análisis multifactorial de varianza, y la prueba de rangos múltiples con el método de Fisher o LSD (diferencia mínima significativa), con el 95% de confianza [31].

RESULTADOS

Calidad postcosecha

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en la caracterización de las papas de la variedad chaucha amarilla tratadas con rayos gamma, con CIPC y sin tratamientos (control). En todos los casos, las papas fueron evaluadas al final de un período de almacenamiento por 40 días, a condiciones ambientales de la ciudad de Quito.

Brotación externa

En la Fig. 1 se muestran los porcentajes de brotación externa correspondientes a los tratamientos con radiación gamma y con CIPC de muestras de papa chaucha amarilla, luego de 40 días de almacenamiento. Los tratamientos que inhibieron la brotación en mayor medida fueron: la irradiación con dosis de 120 Gy y con 160 Gy y la aplicación de 30 mg CIPC kg⁻¹, todos a cinco días luego de la cosecha.

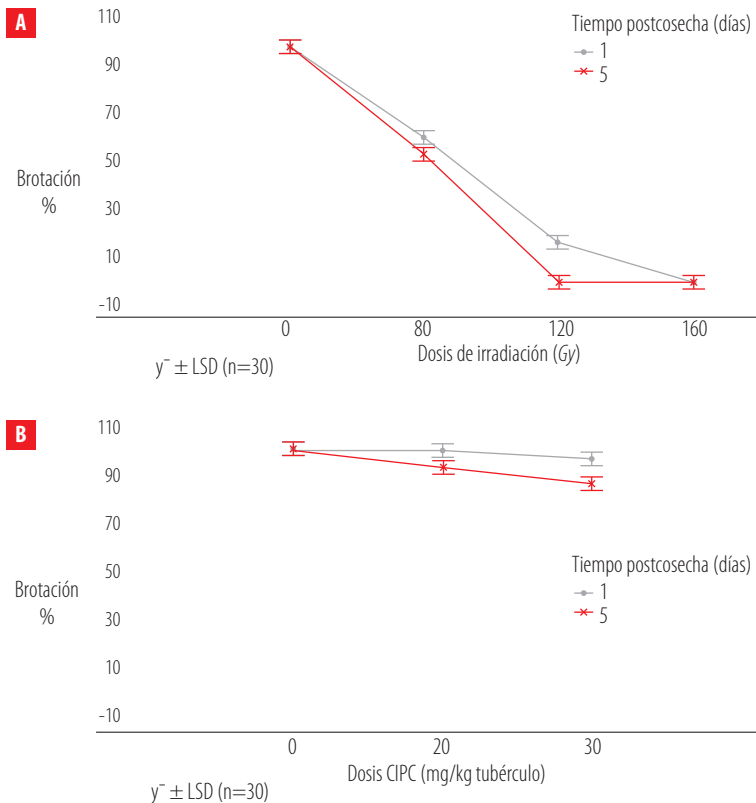


Figura 1. Porcentaje de brotación en tubérculos de *Solanum phureja* a) irradiados y b) tratados con CIPC, luego de 40 días de almacenamiento no refrigerado (media \pm LSD, n=30).

En la Fig. 2 se comparan el mejor tratamiento físico y el mejor tratamiento químico para inhibir brotes con respecto al control; se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) y valores de alrededor de 0% para la irradiación a 120 Gy, 90% para la aplicación de 30 mg CIPC kg^{-1} y 100% en la muestra control.

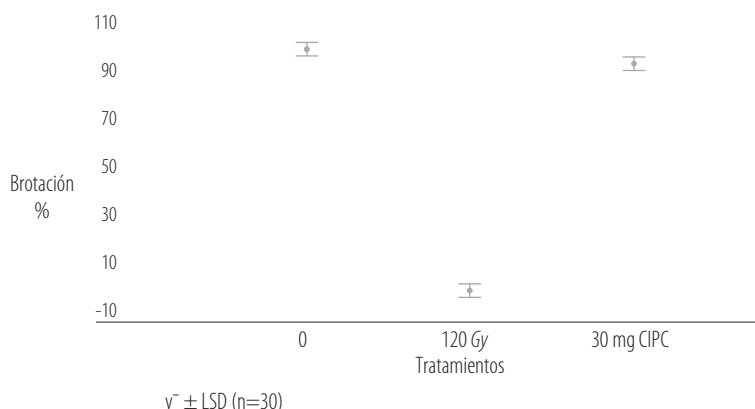


Figura 2. Porcentaje de brotación en tubérculos de *Solanum phureja* a) irradiados a 120 Gy y b) tratados con 30 mg CIPC kg^{-1} , luego de 40 días de almacenamiento no refrigerado (media \pm LSD, $n=30$).

Diámetro y longitud de los brotes

La muestra control presentó 100% de brotación, con brotes de 10 mm de diámetro y 17 mm de longitud. En el tratamiento con irradiación a 120 Gy y 5D no se presentaron brotes y, en el caso de la aplicación de 30 mg CIPC kg^{-1} , se presentaron brotes de 2 mm de diámetro y 2 mm de longitud.

En la Fig. 3 se presentan imágenes de la brotación externa en los tubérculos de chaucha amarilla. Se observa una gran cantidad de brotes en la muestra control, convirtiéndola en no apta para el consumo ni la comercialización; por el contrario, las papas irradiadas presentan un aspecto similar al de las papas de pocos días de cosecha.

Los resultados del análisis estadístico y visual de la brotación se encuentran en las Fichas técnicas I y II del material suplementario.

Pérdida de peso

En la Fig. 3 se evidencia una menor pérdida de peso en las papas irradiadas cinco días después de la cosecha (5D), con dosis de 120 y 160 Gy. También, se observó que el tratamiento químico con menor pérdida de peso fue la aplicación de 30 mg CIPC kg^{-1} y 5D.

La muestra control presentó un 23.7% de pérdida de peso frente a 16.5% en el tratamiento físico con 120 Gy y 17.4% en la aplicación de 30 mg CIPC kg^{-1} . El análisis estadístico determinó que existieron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre estos tres tratamientos, como se muestra en la Fig. 4.

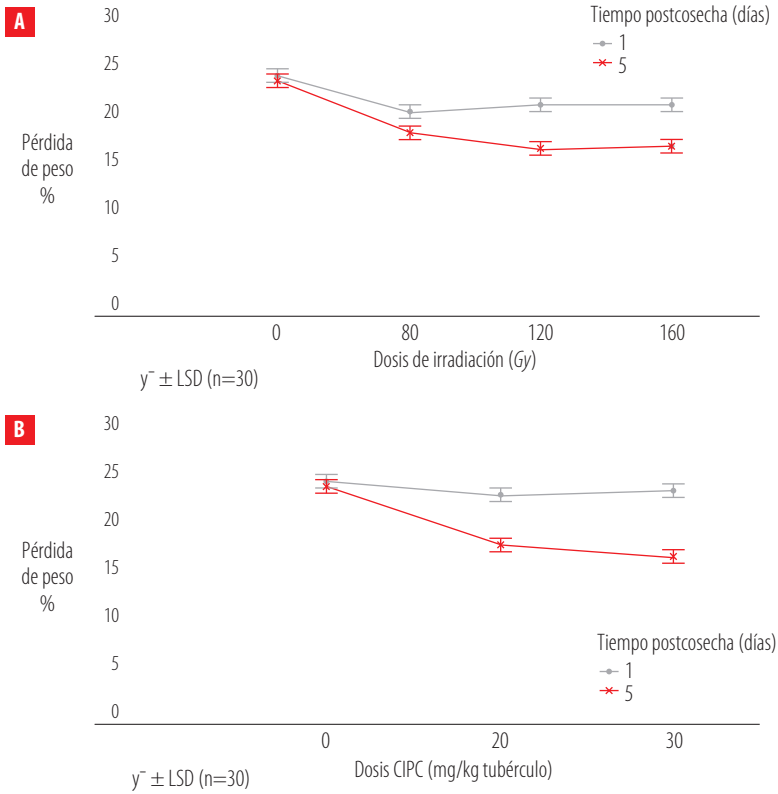


Figura 3. Porcentaje de pérdida de peso en tubérculos de *Solanum phureja* A) irradiados y B) tratados con CIPC, luego de 40 días de almacenamiento no refrigerado (media \pm LSD, n=30).

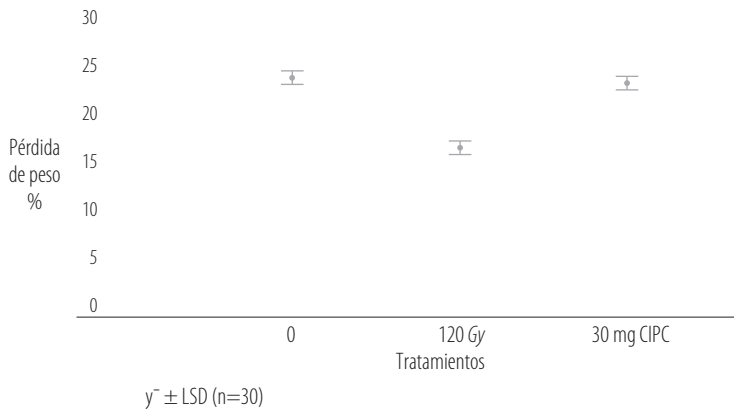


Figura 4. Porcentaje de pérdida peso en tubérculos de *Solanum phureja* a) irradiados a 120 Gy y b) tratados con 30 mg CIPC/kg, luego de 40 días de almacenamiento no refrigerado (media \pm LSD, n=30).

Los resultados detallados del análisis estadístico de la pérdida de peso se encuentran en la Ficha técnica III del material suplementario.

Pudrición

En la Fig. 5 se observan los porcentajes de pudrición en la papa correspondiente a cada tratamiento. Se evidencia que, tanto a mayor dosis de irradiación como a mayor concentración de CIPC, existió un aumento en el porcentaje de pudrición. Sin embargo, la pudrición en las papas irradiadas con 120 Gy y 5D fue significativamente menor ($p \leq 0.05$) frente a papas tratadas con 30 mg CIPC kg^{-1} y 5D. En la Fig. 6 se observa que la pudrición promedio fue de un 4% al aplicar el tratamiento con la dosis de 120 Gy, 8% al aplicar CIPC y 7% en las muestras control.

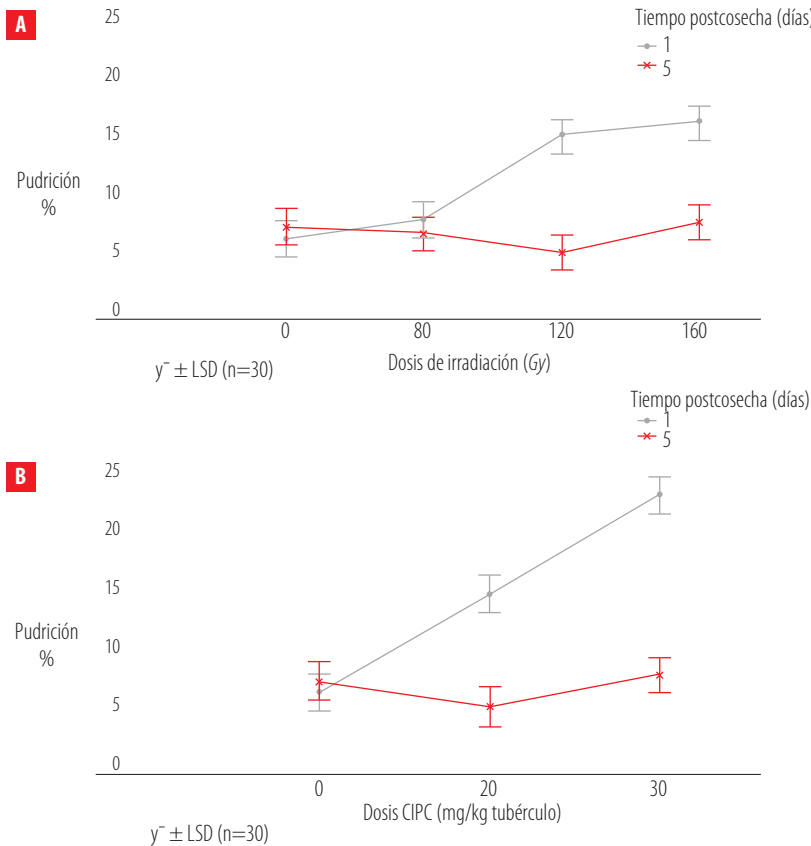


Figura 5. Porcentaje de pudrición en tubérculos de *Solanum phureja* A) irradiados y B) tratados con CIPC, luego de 40 días de almacenamiento no refrigerado (media \pm LSD, n=30).

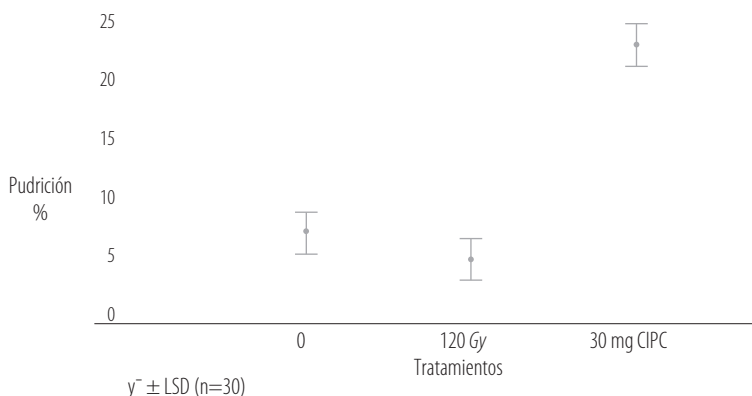


Figura 6. Porcentaje de pudrición en tubérculos de *Solanum phureja* a) irradiados a 120 Gy y b) tratados con 30 mg CIPC kg⁻¹, luego de 40 días de almacenamiento no refrigerado (media \pm LSD, n=30).

Los análisis estadístico y visual de la pudrición pueden encontrarse en las Fichas técnicas IV y V del material suplementario.

Pérdida de firmeza

En cuanto a la firmeza, también se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos. Se presentó una pérdida de firmeza del 20.9% para la muestra control, frente a 17.2% en el tratamiento con la dosis de 120 Gy y de 21% en el tratamiento con 30 mg CIPC kg⁻¹ y 5D. Los detalles del análisis estadístico referente a la firmeza se encuentran en la Ficha técnica VI del material suplementario.

Apariencia general y tiempo de vida útil

La muestra control presentó un tiempo de vida de útil de siete días y fue no apta para el consumo a los 40 días de almacenamiento por la presencia de brotes. El mejor tratamiento químico, correspondiente a la aplicación de 30 mg CIPC kg⁻¹ y 5D, generó un aumento en el tiempo de vida útil de 18 días. El mejor tratamiento físico, de 120 Gy y 5D, permitió incrementar la vida útil de la papa chaucha amarilla en aproximadamente 33 días.

Los detalles del análisis estadístico de la apariencia general y el tiempo de vida útil de los tubérculos se encuentran en las Fichas técnica VII y VIII del material suplementario.

Análisis proximal

Los resultados del análisis proximal de las muestras tratadas y la muestra control fresca se presentan en la Fig. 7. Se observa que no existieron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las papas del mejor tratamiento físico 120 Gy y 5D. El mejor tratamiento químico 30 mg CIPC kg⁻¹ y 5D y la muestra control fresca en cuanto al contenido de cenizas, proteína, extracto etéreo y fibra cruda. La humedad disminuyó en aproximadamente un 10% en las muestras tratadas, que fueron almacenadas por 40 días, mientras que el porcentaje de carbohidratos totales se incrementó también en un 10%.

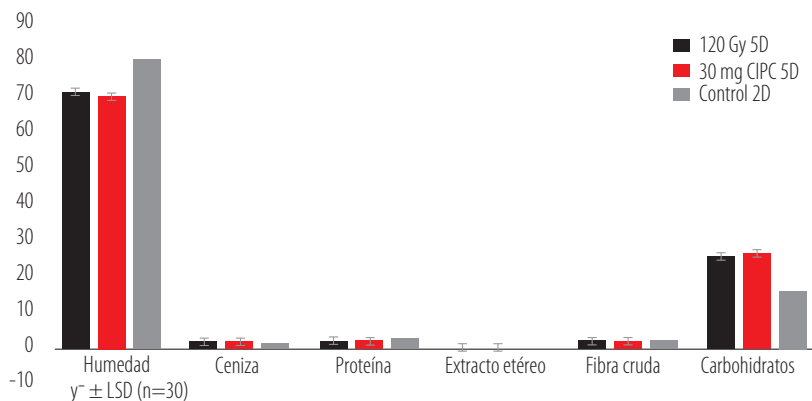


Figura 7. Análisis proximal (% g/100 g) en tubérculos cocidos de *Solanum phureja* irradiada a 120 Gy, tratada con 30 mg CIPC kg⁻¹ y muestra fresca (2D).

En la Ficha IX del material suplementario están colocados los resultados de los análisis proximales realizados.

Análisis sensorial

Los resultados del análisis sensorial realizado por un grupo de 14 panelistas se muestran en la Fig. 8, donde se observa que no existieron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las muestras de papa chaucha amarilla que corresponden al mejor tratamiento físico de conservación y la muestra control fresca, en los parámetros color de la pulpa y textura. En los parámetros apariencia y sabor, las muestras irradiadas tuvieron una mejor calificación que las muestras frescas. En la Ficha técnica IX del material suplementario se pueden observar las hojas entregadas a los panelistas.

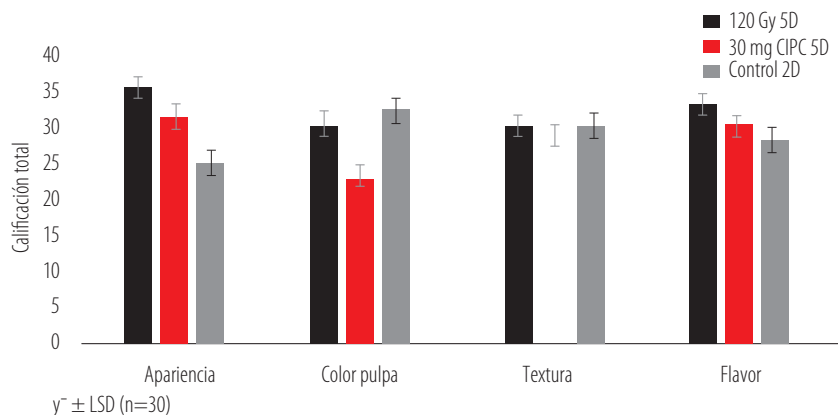


Figura 8. Análisis sensorial en tubérculos cocidos de *Solanum phureja*, irradiada a 120 Gy, tratada con 30 mg CIPC kg⁻¹ y muestra fresca (2D).

DISCUSIÓN

Brotación externa

El mejor tratamiento fue la irradiación gamma con dosis de 120 Gy, debido a la ausencia de brotes. Con la dosis de 160 Gy se obtuvo un similar efecto de inhibición, pero se eligió el primero porque una menor dosis tendría un menor costo; además, hubo ausencia de necrosis en los tubérculos tratados con la dosis de 120 Gy.

Diámetro y longitud de los brotes

La inhibición de brotes mediante irradiación se debe principalmente a los efectos sobre los tejidos meristemáticos; en primera instancia, se interrumpe la síntesis de ATP y por ello no se completa el proceso de respiración celular, esto provoca una disminución en la tasa de síntesis del ADN y ARN y el consecuente bloqueo de la división celular [32, 33].

El crecimiento de los brotes perjudica de forma directa a la calidad de la papa, además, provoca una pérdida de peso y de turgencia, una disminución de la firmeza y afecta sus propiedades nutricionales por la hidrólisis del almidón y de las proteínas, la acumulación de azúcares simples, y la disminución del contenido de vitamina C [12, 34]. Por lo tanto, la inhibición de brotes es un factor clave para el adecuado almacenamiento y la industrialización de papas. En el caso específico de la papa chaucha amarilla, se consideran tubérculos germinados a aquellos en los que los brotes miden 2 mm o más [5]. La Norma INEN 1516 acepta papas con brotes de hasta 3 mm de longitud para el consumo humano, mientras que dentro del comercio intereuropeo no se admiten brotes [27, 35].

Pérdida de peso

Todos los tubérculos perdieron peso durante el almacenamiento, lo cual se explica principalmente porque fueron almacenados a condiciones ambientales de la ciudad de Quito (en promedio 19 °C y 60% HR). La temperatura y humedad relativa óptimas para el almacenamiento a largo plazo de papas pueden cambiar en función de la variedad, pero se encuentran entre 8 y 12 °C, y entre 85 y 90%, respectivamente [12]. A temperaturas mayores o humedades relativas menores se incrementan la tasa de respiración y la brotación, lo que a su vez genera un aumento de la pérdida de peso.

La menor pérdida de peso en las muestras irradiadas se explica por la radiólisis del agua, que genera especies químicas muy reactivas ($H\cdot$, $\cdot OH$, H_2O_2 , H_2 y H_3O^+), las cuales reaccionan con moléculas aledañas en tiempos muy cortos, provocando que las moléculas de agua se reordenen o queden ligadas a nuevas estructuras bioquímicas [36]; como consecuencia, se inhabilita la síntesis de la enzima ácido indol acético (AIA) por activación de una proteasa que acelera su degradación [32], lo cual a su vez inhibe la respiración y transpiración celular, de modo que existe un menor consumo de glúcidos y, por ende, una mínima pérdida de peso [12].

Thomas y Sparks [32] concluyeron que aplicar dosis entre 50 y 200 Gy provocan una reducción de más del 50% en la pérdida de peso en todas las variedades de papa irradiadas, en comparación con sus respectivos controles.

Disminuir la pérdida de peso es de suma importancia, ya que se trata de un parámetro de calidad para la comercialización, por ejemplo, en las papas destinadas al consumo humano y a la industrialización dentro del comercio intereuropeo se tolera entre el 2 y 6% de pérdida de peso en los tubérculos [35].

Pudrición

Para la selección de los tubérculos, se consideró la normativa ecuatoriana (Norma NTN INEN 1516), que admite un 10% de los tubérculos con no más del 1% de pudriciones húmeda y parda [27]. Esta decisión tuvo el propósito de verificar si el tratamiento propuesto funcionaría con una muestra de papas similar al producto que se comercializa en los mercados locales.

Algunos autores manifiestan que la necrosis y la pudrición debidas a la irradiación de tubérculos se producen por daños en el ADN superiores al 3%, que disminuyen la síntesis del ácido nucleico [18, 32]. En el experimento se pudo constatar que dosis de 160 Gy provocaron la necrosis de los tubérculos en un 17%, lo cual muestra que dosis por encima del valor óptimo sobre papa chaucha amarilla provocan efectos indeseables.

Al considerarse entre los principales factores de pérdida postcosecha durante el almacenamiento y la comercialización, es de suma importancia mantener un bajo porcentaje de pudrición o necrosis. El comercio intereuropeo acepta como máximo el 3% (en peso y no más de 3.5 mm de profundidad) de pudrición en tubérculos para consumo humano [35], la Norma INEN 1516 tolera hasta 5% de daños fisiológicos para papa de consumo [27].

Pérdida de firmeza

La pérdida de firmeza en papas se debe a factores ambientales y al porcentaje de germinación de los tubérculos, esto debido a que la epidermis del brote es aproximadamente 100 veces más permeable al agua en comparación con el resto del tubérculo [12].

La pérdida de firmeza en tubérculos irradiados se debe a una disminución de hasta un 50% de glúcidos como el almidón, la celulosa y la pectina [33, 36]. En papa irradiada se ha reportado la degradación o debilitamiento de los gránulos de la membrana y la despolimerización o acortamiento de las cadenas de amilosa y/o amilopectina, debido a la ruptura de los enlaces glicosídicos [37].

En el presente estudio, las menores pérdidas de firmeza se presentaron en muestras irradiadas a 120 y 160 Gy, asociadas con una baja tasa de respiración, la no existencia de brotes y una menor pérdida de peso. Resulta clave mantener la firmeza de los tubérculos ya que repercute en su comercialización; así, el comercio intereuropeo no admite tubérculos marchitos y contraídos que han perdido su firmeza [35], mientras que la Norma INEN 1516 manifiesta como requisito tubérculos firmes y de aspecto fresco para papa de consumo [27].



Apariencia general y tiempo de vida útil

Los tubérculos tratados con 30 mg CIPC kg⁻¹ (5D) y aquellos expuestos a la mejor dosis de irradiación aumentaron su tiempo de vida útil, ya que mantuvieron por un mayor número de días su apariencia y fueron aptos para el consumo, con base en las características descritas en la Norma INEN 1516, que establece: “tubérculos limpios y firmes, libres de defectos fisiológicos y mecánicos, sin germinar o con brotes inferiores a 3 mm de longitud, se acepta hasta el 5% (en peso) en daños mecánicos y defectos fisiológicos” [27]. Para el comercio intereuropeo se establecen requisitos similares, pero la aceptación en daños mecánicos y defectos fisiológicos es del 3% en peso [35].

En un estudio similar en papa [23] se concluyó que la irradiación con dosis entre 0.08 y 0.12 kGy es una técnica postcosecha eficaz para conservar la apariencia y extender la vida útil de papas “Kufri Sindhuri”, almacenadas a 22 °C durante 120 días.

Análisis proximal

Los resultados permiten inferir que las características nutricionales de la papa chaucha amarilla se conservaron en ambos tratamientos durante el almacenamiento [38]. El incremento en el porcentaje de carbohidratos totales se debe a la pérdida de humedad, ya que dicho parámetro fue calculado por la diferencia del 100% y los porcentajes de los otros componentes.

En la actualidad, los consumidores buscan alimentos que beneficien su dieta y se tengan beneficios para la salud; el aporte nutricional de esta variedad de papa está representado por su alto contenido de carbohidratos (principalmente almidón), alto contenido de proteína (si se compara con otros tubérculos), bajo contenido de grasa y fitoquímicos bioactivos [9, 39].

La tecnología de irradiación gamma permitió conservar las características nutricionales en los tubérculos tratados por un tiempo más prolongado, en comparación con los tubérculos no irradiados [23, 39].

Análisis sensorial

Existió una buena aceptación de la papa chaucha amarilla irradiada por parte de los panelistas; algunas personas manifestaron que observaron un color amarillo más intenso en la pulpa y un sabor dulce agradable al momento de la degustación en ambas muestras tratadas (física o químicamente), lo cual indica que las características organolépticas no se vieron perjudicadas en ninguno de los dos casos [38].

La aceptabilidad por parte de los consumidores para productos irradiados es muy importante [39]. Un estudio similar al presente, llevado a cabo en Chile, evaluó la aceptación pública de tubérculos irradiados; se irradiaron 164 variedades de papa a 100 Gy y se almacenaron por ocho meses (a 6-10 °C y 80-85% HR). No se observaron cambios en las cualidades organolépticas o culinarias al momento de la cocción y los análisis sensoriales, en los que participaron un total de 4000 personas, revelaron una ligera preferencia por papas irradiadas en comparación con las muestras no irradiadas [23, 32].

La industria alimentaria ha realizado ensayos de comercialización de tubérculos irradiados en Hungría, Italia, Sudáfrica y Uruguay y los resultados revelan una aceptación positiva por parte de los consumidores al degustar papas irradiadas [32].

CONCLUSIONES

La muestra control (sin tratamientos) presentó 23.7% de pérdida de peso, pérdida de firmeza de 20.9%, 7.0% de pudrición y aparecimiento de brotes a los seis días de almacenamiento a 19 °C y 60% HR. El mejor tratamiento físico correspondió a la irradiación con una dosis de 120 Gy, cinco días después de la cosecha. Con este tratamiento se obtuvo una pérdida de peso de 16.5%, pérdida de firmeza de 17.2%, cero brotes luego de 40 días de almacenamiento; existió un 4% de pudrición y 3% de necrosis al final del período. El mejor tratamiento químico fue con 30 mg de CIPC kg⁻¹ de tubérculos, cinco días después de la cosecha. Los mismos parámetros de calidad obtuvieron valores de 16.4% a 21% y aparecimiento de brotes a los 25 días. Existió un 8% de pudrición y 5% de necrosis al final del período.

De acuerdo con el análisis proximal y el análisis sensorial realizado en papas cocidas, la papa chaucha amarilla irradiada con la mejor dosis tuvo una buena aceptación y sus propiedades organolépticas y nutricionales no resultaron perjudicadas con respecto a las muestras frescas, salvo por una pérdida de humedad y la aparición de un sabor dulce agradable que estarían relacionados con el tiempo de almacenamiento.

Estos resultados sugieren que la irradiación gamma de papa chaucha amarilla con la dosis adecuada permite incrementar su vida útil en aproximadamente 33 días. Esto resultaría de gran beneficio para los productores, industrializadores y consumidores.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los Departamentos de Ciencias Nucleares y de Ciencia de Alimentos y Biotecnología de la Escuela Politécnica Nacional por su apoyo para la investigación realizada.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

Eddy Anguisaca llevó a cabo la parte experimental y construyó las tablas y gráficos de resultados; María Cuesta contribuyó con la revisión bibliográfica y la discusión de resultados; Marco Sinche fue el director del proyecto, supervisó el análisis estadístico y corrigió el manuscrito.

REFERENCIAS

- [1] Centro Internacional de la Papa. (2015). Dato y cifras de la papa - International Potato Center. Recuperado de <https://web.archive.org/web/20180906073207/https://cipotato.org/es/lapapa/dato-y-cifras-de-la-papa/> Consultado el 27 de septiembre de 2020.
- [2] Asociación Latinoamericana de la Papa. (2014). XXVI Congreso ALAP 2014 – Bogotá, Colombia. Recuperado de <http://www.papaslatinas.org/alap2014/> Consultado el 29 de septiembre de 2020.
- [3] Pumisacho, M. y Sherwood, S. (2002). *El cultivo de la papa en el Ecuador*. Recuperado de [https://web.archive.org/web/20201031010112/https://cipotato.org/wp-content/uploads/Documentacion PDF/Pumisacho y Sherwood Cultivo de Papa en Ecuador.pdf](https://web.archive.org/web/20201031010112/https://cipotato.org/wp-content/uploads/Documentacion%20PDF/Pumisacho%20y%20Sherwood%20Cultivo%20de%20Papa%20en%20Ecuador.pdf) Consultado el 30 de octubre de 2020.
- [4] Mancero, L. (2012). *Estudio de la Cadena de la Papa en Ecuador FAO-ESA / CIP*. Recuperado de: https://web.archive.org/web/20150501104951/http://www.fao.org/fileadmin/templates/esa/LISFAME/Documents/Ecuador/cadena_papa.pdf Consultado el 30 de octubre de 2020.
- [5] Chalapud, M. A., Caicedo, C., Ruiz, E. M., & Valencia, M. F. (2016). Preservation properties: Chitosan-based coatings and aloe vera applied in creole potato (*Solanum phureja*). *Informador Técnico*, 80(1), 9–19.
- [6] Rodríguez, D. R., & Ramírez, L. N. (2011). La agroindustria de la papa criolla en Colombia. Situación actual y retos para su desarrollo. *Gestión y Sociedad*, 4(2), 17–30.
- [7] Solorzano, V., Rincón, A., Villacrés, E. y Arguello, P. F. (2015). Recubrimiento comestible para látex de sande (*Brosimum utile*) como alternativa en la inhibición de brotes en papa chaucha (*Solanum phureja*). En P. Kromann, X. Cuesta, M. Romero, B. R. Montero y P. Cuasapaz (Eds.), *VI Congreso Ecuatoriano de la Papa* (pp. 1–221). Ibarra.
- [8] Suárez, J. A., Cerón, M. S., Prieto, L. y Rodríguez, J. (2017). Almacenamiento de clones de papa criolla (*Solanum tuberosum* grupo Phureja) en atmósferas modificadas activas y pasivas. En P. Kromann, X. Cuesta, B. R. Montero, P. Cuasapaz, A. León-Reyes y A. Chulde (Eds.), *Memorias del VII Congreso Ecuatoriano de la Papa*. Tulcán.
- [9] Peña, C. (2015). *Evaluación del contenido nutricional y actividad antioxidante en Solanum tuberosum grupo Phureja*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá
- [10] Piñeros, J. (2009). *Recopilación de la investigación del sistema productivo papa criolla*. Bogotá: Federación Colombiana de Productores de Papa. Recuperado de <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/13653> Consultado en septiembre de 2020.
- [11] Toro, M. (2016). *Evaluación del efecto de 3 inhibidores de brotación en papa criolla (Solanum Phureja) variedad criolla Colombia aplicados en el proceso de poscosecha* (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- [12] Paul, V., Ezekiel, R., & Pandey, R. (2016). Sprout suppression on potato: need to look beyond CIPC for more effective and safer alternatives. *Journal of Food Science and Technology*, 53(1), 1–18. Doi: <http://doi.org/10.1007/s13197-015-1980-3>
- [13] Bradshaw, N. (2006). *Pesticide residue minimisation-potatoes* (N. Bradshaw & S. Ogilvy, Eds.). UK: Food Standards Agency.
- [14] Aliaga, I., Velásquez, F., Mendoza, R., & Chuquilín, R. (2011). Efecto de la aplicación de Chlorpropham en el brotamiento de tubérculos de olluco (*Ullucus tuberosus* L.) en condiciones de almacén. *Scientia Agropecuaria*, 2(2), 91–96.
- [15] Frazier, M. J., & Olsen, N. L. (2015). The Effects of Chlorpropham Exposure on Field-Grown Potatoes. *American Journal of Potato Research*, 92(1), 32–37. Doi: <http://doi.org/10.1007/s12230-014-9408-6>
- [16] Calleja, A., Lanzarote, I., Björkroth, J., González, R., Moragrega, R., Alonso, J., Cocolin, L., Mate, A., Clemente, R., Estaca, J., & López, B. (2010). *Nuevas tecnologías en la conservación y transformación de los alimentos* (Vol. 178). Madrid: International Marketing and Communication.
- [17] International Atomic Energy Agency. (2017). *Manual de buenas prácticas para la irradiación de alimentos: Aplicaciones sanitarias, fitosanitarias y de otro tipo* (Núm. 481). Viena.
- [18] Maraver, J., Moreno, I., Jos, A., & Cameán, A. (2012). *Irradiación de alimentos: Toxicología alimentaria*. Madrid: Díaz de Santos.
- [19] Food and Drug Administration. (2016). Hechos sobre alimentos: La irradiación de alimentos. Recuperado de <https://web.archive.org/web/20201001173346/https://www.fda.gov/media/81266/download> Consultado el 28 de septiembre de 2020.

- [20] Eustice, R. (2016). *Novedades sobre Irradiación de Alimentos del 2016*. Recuperado de <http://www.cafi.org.ar> Consultado el 29 de septiembre de 2020.
- [21] International Atomic Energy Agency. (2015). *Manual of good practice in food irradiation: Sanitary, phytosanitary and other applications*. Vienna.
- [22] Nordion. (2011). *The History of Food Irradiation*. Recuperado de https://web.archive.org/web/20201001173003/http://www.nordion.com/wp-content/uploads/2014/10/GT_History-of-Food-Irradiation.pdf Consultado el 29 de septiembre de 2020.
- [23] Mahto, R., & Das, M. (2014). Effect of gamma irradiation on the physico-mechanical and chemical properties of potato (*Solanum tuberosum* L.), cv. 'Kufri Sindhuri', in non-refrigerated storage conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 92(1), 37–45. Doi: <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.01.011>
- [24] Soares, I. G. M., da Silva, E. B., Amaral, A. J., Machado, E. C. L., & Silva, J. M. (2016). Physico-chemical and sensory evaluation of potato (*Solanum tuberosum* L.) after irradiation. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 88(2), 941–950. Doi: <http://doi.org/10.1590/0001-3765201620140617>
- [25] Zabala, D. (2011). *Efecto de diferentes dosis de radiación gamma sobre la expresión fenotípica en papa criolla (Solanum tuberosum grupo phureja, variedad criolla Colombia)* (Tesis de Licenciatura). Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá.
- [26] Guzmán, J. D. (2016). *Caracterización fenotípica de un cultivo de papa criolla (Solanum Tuberosum Grupo Phureja, Variedad Criolla Colombia) irradiada con Cobalto 60 ubicado en el Municipio El Rosal, Finca el Pino Km 16 Vía Subachoque Cundinamarca* (Tesis de Licenciatura). Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá.
- [27] Servicio Ecuatoriano De Normalización. (2012). *Hortalizas frescas. Papas. Requisitos*. Recuperado de <https://web.archive.org/web/20201001172851/https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/1516.pdf> Consultado el 28 de septiembre de 2020.
- [28] Suttle, J. C. (2007). Dormancy and sprouting. En D. Vreugdenhil, J. Bradshaw, C. Gebhardt, F. Govers, M. A. Taylor, D. K. L. Mackerron y H. A. Ross (Eds.), *Potato biology and biotechnology* (1a ed., pp. 287–309). Amsterdam: Elsevier Science BV.
- [29] Ruiz, E. (2016). *Estudio del efecto del tratamiento poscosecha por irradiación gamma sobre la vida útil de la cebolla perla ecuatoriana de exportación (Allium cepa L.)* (Tesis de Ingeniería). Escuela Politécnica Nacional. Quito.
- [30] Díaz Herrera, M. Á., & Gutiérrez Guzmán, N. (2013). Evaluación sensorial de papa criolla (*Solanum phureja*) congelada criogénicamente. *Ingeniería y Región*, 10, 143. Doi: <http://doi.org/10.25054/22161325.766>
- [31] Gutiérrez, H., & De la Vara, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. México, D.F: Mc Graw Hill.
- [32] Thomas, P., & Sparks, W. (2009). Radiation preservation of foods of plant origin: Part 1. potatoes and other tuber crops. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 19(4), 327–379. Doi: <http://doi.org/10.1080/10408398409527380>
- [33] Urbain, W. M. (1986). Radiation chemistry of food components and of foods. En *Food Irradiation* (pp. 37–82). Academic Press, Inc. Doi: <http://doi.org/10.1002/9781118422557.ch6>
- [34] de Freitas, S. T., Pereira, E. J. P., Gomez, A. C. S., Brackmann, A., Nicoloso, F., & Bisognin, D. A. (2012). Processing quality of potato tubers produced during autumn and spring and stored at different temperatures. *Horticultura Brasileira*, 30(1), 91–98. Doi: <http://doi.org/10.1590/S0102-05362012000100016>
- [35] Comité Europeo de RUCIP. (2017). *Reglas y Usos del Comercio Intereuropeo de la Patata*. Recuperado de <https://web.archive.org/web/20201001172218/http://europat.eu/wp-content/uploads/2016/10/RUCIP-2017-ES.pdf>
- [36] Suárez, R. (2001). Conservación de alimentos por radiación. *Redalyc*, 4(6), 85–124. Recuperado de <https://web.archive.org/web/20201001171502/https://www.redalyc.org/pdf/877/87740608.pdf> Consultado en septiembre 2020.
- [37] Atrous, H., Benbettaieb, N., Chouaib, M., Attia, H., & Ghorbel, D. (2017). Changes in wheat and potato starches induced by gamma irradiation: A comparative macro and microscopic study. *International Journal of Food Properties*, 20(7), 1532–1546. Doi: <http://doi.org/10.1080/10942912.2016.1213740>
- [38] Rossi, L., Watson, D., Escandarani, S., Miranda, A., & Troncoso, A. (2009). La radiación a la mesa. *Revista chilena de infectología*, 26(4), 318–330. Doi: <http://doi.org/10.4067/S0716-10182009000500003>
- [39] Furrer, A. N., Chegeni, M., & Ferruzzi, M. G. (2018). Impact of potato processing on nutrients, phytochemicals, and human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(1), 146–168. Doi: <http://doi.org/10.1080/10408398.2016.1139542>

Efecto de la irradiación gamma sobre las características de calidad y la durabilidad de la papa (*Solanum tuberosum*) almacenada

Elena Villacrés^{1*}, Mishel Yanez^{1,2}, María Belén Quelal¹, Trosky Yáñez²

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Estación Experimental Santa Catalina, Departamento de Nutrición y Calidad de Alimentos, Mejía, Ecuador.

²Universidad Central del Ecuador (UCE). Carrera de Química de Alimentos. Quito, Ecuador.

*Autor para correspondencia/ Corresponding author, e-mail: elenavillacres9@hotmail.com

Effect of gamma irradiation on the quality characteristics and durability of stored potato (*Solanum tuberosum*)

Resumen

A través del monitoreo y evaluación de las características físico-químicas, se estimó la durabilidad de tres variedades de papa (chola, chaucha y ratona), las cuales recibieron un tratamiento de irradiación (120 Gy, 34.68 min) y se almacenaron por 40 días, bajo condición de ambiente (12°C, 70% humedad relativa) y refrigeración (7°C, 70% humedad relativa). Los resultados se compararon con los de los tubérculos que no fueron irradiados y se almacenaron bajo similares condiciones. En general, durante el almacenamiento, la intensidad respiratoria y varios nutrientes disminuyeron, mientras que la materia seca, los azúcares reductores y el tamaño de los brotes se incrementaron. Sin embargo, estos cambios fueron menos drásticos en la variedad chola irradiada y almacenada en refrigeración, que presentó mayor contenido de humedad, menor pérdida de nutrientes, baja intensidad respiratoria y ausencia de brotes a los 40 días de monitoreo y prueba, proyectando su durabilidad hasta 106 días, bajo las condiciones mencionadas. Un comportamiento diferente presentó la variedad chaucha amarilla, sin tratamiento de irradiación y almacenada en condiciones de ambiente (12°C y 70% de humedad relativa), que presentó crecimiento de brotes a partir del quinto de almacenamiento con mayores pérdidas de nutrientes y degradación de las características físicas. Se concluyó que la irradiación y refrigeración combinadas, ayudarían a extender la durabilidad de la papa hasta 44 días (ratona), 114 días (chaucha) y 106 días (chola).

Palabras clave: Brotes, Dormancia, Intensidad respiratoria, Nutrientes, Tegumento.

Abstract

Through the monitoring and evaluation of the physical-chemical characteristics, the durability of three potato varieties (chola, yellow chaucha and ratona) was estimated, which received an irradiation treatment (120 Gy, 34.68 min) and were stored for 40 days, under ambient conditions (12°C, 70% relative humidity) and refrigeration (7°C, 70% humidity). The results were compared with those of the tubers that were not irradiated

Editado por /
Edited by:
Gabriela Albán

Recibido /
Received:
10/08/2020

Aceptado /
Accepted:
31/06/2020

Publicado en línea /
Published online:
01/04/2021

and were stored under similar conditions. In general, during storage, respiratory intensity and various nutrients decreased, while dry matter, reducing sugars, and shoot size increased. However, these changes were less drastic in irradiated and refrigerated Chola variety, which presented higher moisture content, less loss of nutrients, low respiratory intensity and absence of sprouts after 40 days of monitoring and testing, projecting its durability up to 106 days, under the conditions mentioned. A different behavior showed the yellow chaucha variety, without irradiation treatment and stored under ambient conditions (12°C and 70% relative humidity), which had sprouts growth from the fifth of storage, greater losses of nutrients and degradation of the characteristics physical. It was concluded that the application of irradiation and refrigeration combined, helped to extend the durability of the potato up to 44 days (ratona), 114 days (chaucha) and 106 days (chola).

Keywords: Dormancy, Nutrients, Respiratory intensity, Sprouts, Tegment.

INTRODUCCIÓN

La papa es el tercer cultivo alimenticio más importante a nivel mundial y ha sido recomendada por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación como un rubro estratégico de seguridad alimentaria para enfrentar el crecimiento exponencial de la población y los problemas de suministro de alimentos. En el 2016, Ecuador presentó una producción de 421000 t, de este volumen, aproximadamente el 81% es comercializado para consumo en fresco y el resto es utilizado por la industria alimenticia para el procesamiento de papa frita en forma de hojuelas o bastones [2]. La papa contribuye a la generación de ingresos de 82000 familias productoras de un total de 90 cantones de la Sierra ecuatoriana [1]. En su composición química destaca el alto contenido de humedad (70-80%) por lo que es muy perecible y se dificulta su transporte. En la postcosecha las pérdidas anuales de los tubérculos varían entre 10-15% y en algunas variedades la pérdida de la dormancia que se manifiesta con el apareamiento de brotes, es uno de los factores más limitantes [5]. Los factores que contribuyen al deterioro cualitativo y cuantitativo de la papa podrían agruparse en cuatro categorías que incluyen físico, fisiológicos, microbiológicos y entomológicos [3]. Las tasas de respiración, transpiración y la presencia de microorganismos contribuyen a los procesos fisiológicos que aceleran el deterioro [4]. El manejo postcosecha de las variedades susceptibles a la brotación es muy importante, ya que puede ayudar a retrasar este proceso y aumentar la durabilidad para el consumo así como esperar una mejora en el precio de venta, lo cual es vital para la economía de los agricultores dedicados a este rubro. Los métodos de almacenamiento ayudan a prolongar el período de dormancia y retardar o inhibir cambios químicos indeseables. El almacenamiento refrigerado es limitado por el alto costo. Las bajas temperaturas de almacenamiento también inducen el endulzamiento de la papa, debido al incremento de azúcares totales y reductores, lo que limita su uso para la elaboración de chips [3]. Los métodos químicos se basan en el uso de productos para retrasar la brotación de los



tubérculos [6], con este fin se utiliza el ácido abscísico (ABA) y el etileno. La inhibición del crecimiento de brotes (ICB), depende de factores como, la variedad, condiciones ambientales de almacenamiento, los estados fisiológicos de la planta cosechada, presencia de compuestos fenólicos, metabolismo de azúcares, la cantidad y número de aplicaciones [7]. La irradiación gamma es un método conocido para eliminar o inactivar las causas del deterioro sin efectos adversos sobre la nutrición y calidad sensorial de los alimentos [3]. Esta técnica puede extender la vida útil, reducir el requisito de productos químicos para la conservación y control de plagas, esterilizar productos que luego se pueden almacenar sin refrigeración, retrasar la maduración de frutas y hortalizas, limitar el deterioro de la calidad de cultivos almacenados como tubérculos y bulbos, evitando la brotación postcosecha [8]. El problema crítico, es encontrar el óptimo nivel de radiación que puede cumplir con el requisito de conservación sin causar graves alteraciones químicas en los alimentos, que afecten su aceptabilidad física, organoléptica y su estado sanitario. Estudios realizados en varios países, indican que dosis entre 50-150 Gy aplicados durante el periodo de dormancia son recomendados para el control de brotes en los tubérculos [9]. La duración del periodo de dormancia de la papa es ligeramente afectado por la temperatura de almacenamiento pero es significativamente dependiente de la variedad [10]. Generalmente las fuentes de radiación son los rayos del núcleo excitado de elementos como el Cobalto 60 y el Cesio 137, siendo el primero el más utilizado en aplicaciones industriales [11]. Los rayos gamma son muy penetrantes y en la mayoría de los alimentos son eficaces a profundidades de incluso 20 cm. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha autorizado dosis de radiación de incluso 7 KGy por ser absolutamente inocuas para el consumo humano [11]. La aceptación pública del concepto de la irradiación de alimentos no ha tenido acogida en algunos países. El miedo a la guerra termonuclear y ciertos accidentes como el sobrevenido en "Three Mile Island" en los Estados Unidos de América y en Chernobyl en la URSS han hecho que mucha gente desconfíe del uso de la energía nuclear con diversos propósitos, aunque se trate de algo tan conveniente como mejorar la cantidad y la calidad de los alimentos. Esa desconfianza, se basa a menudo en la falta de información y en la confusión entre el proceso de irradiación y la contaminación radiactiva. En algunas partes del mundo, donde la irradiación de alimentos lleva practicándose desde hace muchos años, ni el público ni los que influyen en la opinión pública no están bien informados sobre el proceso [23], por lo que, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la irradiación gamma y dos condiciones de almacenamiento sobre algunas características físico-químicas y la durabilidad de tres variedades de papa. Información que puede contribuir a valorar los efectos de esta tecnología en la conservación de la calidad y mejora de la inocuidad no solo de la papa sino también de otros alimentos perecibles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio, se utilizaron variedades de papa de consumo habitual en la Sierra ecuatoriana (chola) y otras que históricamente presentan un corto periodo de dormancia (chaucha amarilla y ratona). Estas variedades se cultivaron en la provincia de Cotopaxi, parroquia Toacazo en la comunidad Wintza. La irradiación de los tubérculos se realizó en la Planta de la Subsecretaría de control y aplicaciones nucleares (SCAN), adscrita al Ministerio de Electricidad y Energías Renovables (MEER), ubicada en Aloag, Pichincha.

El almacenamiento, monitoreo y los análisis físico-químicos se realizaron en el Departamento de Nutrición y Calidad de la Estación Experimental Santa Catalina. Una vez cosechados los tubérculos fueron transportados a la Estación Santa Catalina, donde se clasificaron, seleccionaron y lavaron. Se trabajó con tubérculos de peso medio entre 41-60 g, que se lavaron con agua destilada y se escurrieron con la ayuda de papel toalla. Luego de estas operaciones, se determinaron las características físico-químicas de los tubérculos al tiempo cero posteriormente la muestra global fue dividida en dos partes, una para el tratamiento de irradiación (120 Gy, 34.68 min) y otra sin irradiación. Tomando como referencia los resultados del estudio realizado por Ruíz-Ramos [12], se estableció la dosis y el tiempo de aplicación de la radiación gamma, a través de una fuente de Cobalto 60. Los lotes de tubérculos experimentales se almacenaron separadamente en una cámara bajo condiciones ambientales (12°C, 70% de humedad relativa) y en refrigeración (7°C, 70% HR). Se realizaron muestreos cada cinco días por un periodo de 40 días y se analizaron las siguientes características físico-químicas:

Materia Seca

La materia seca se determinó con base a la pérdida de peso que experimentó la papa sometida a desecación en estufa (Memmert, Schwabach, Germany) a una temperatura de 100-105°C, hasta peso constante o durante 24 horas. La materia seca resultó de sustraer al peso total de la muestra el contenido en humedad, según el método 930.15 A.O.A.C. [13].

Color del tegumento

La medición del color se realizó usando un espectrofotómetro portátil (Lange Spectro-Color d/8° modelo LZM 268, Chelmsford, UK) basado en el sistema de color CIEL*, a*, b*. Se midieron los siguientes atributos de la sensación visual del color: L* (luminosidad), C* (croma), and H* (matiz). La diferencia de color entre la papa fresca (tiempo 0), tratada (con y sin irradiación gamma) y almacenada fue calculada aplicando la siguiente ecuación: $\Delta E = (\Delta L^*2 + \Delta C^*2 + \Delta H^*2)^{0.5}$ [14].

Azúcares reductores

Los tubérculos fueron triturados en una licuadora *Oster* por 3 min, con alcohol etílico al 80%, luego se filtró el conjunto y se aforó a 25 mL; se tomó 1 mL de filtrado y se trató con 6 mL de ácido pícrico, este reactivo reacciona con los azúcares reductores formando picramato, de color amarillo, cuya intensidad se determinó a 510 nm en un espectrofotómetro UV-Visible (Evolution 201, Thermo Scientific, Madrid, España). El porcentaje de azúcares reductores se calculó en referencia a una curva de calibración construida de la lectura de absorbancia de una serie de soluciones de glucosa preparadas en alcohol etílico [13].

Ácido ascórbico

La determinación se realizó usando el método espectrofotométrico [15], para lo cual se utilizó una solución de ácido oxálico al 0.4% y acetona al 20%, pH 1.1. El ácido ascórbico de la muestra reacciona con el 2,6 dicloroindofenol (2,6 DCIP) y lo reduce. Conforme el



reactivo de color es reducido, su coloración azul característica disminuye hasta rojo o grosella. El cambio de coloración es registrado a 520 nm y la concentración de ácido ascórbico de la muestra se calculó usando una curva de calibración que emplea el L-ácido ascórbico como estándar.

Tamaño de los brotes

Se tomó una muestra de 10 tubérculos por cada tratamiento y repetición, lo que representa el 60% de la muestra global; se midió la longitud de los brotes con un paquímetro digital Mitutoyo (Suzano, Brasil) [16].

Intensidad respiratoria

El método se basa en la captura del anhídrido carbónico mediante carbonatación del hidróxido de bario. Se determinó la diferencia de captura de anhídrido carbónico entre el blanco y la muestra, este resultado se relacionó con el peso de la muestra y el tiempo de respiración en la cámara [17].

Durabilidad

La durabilidad de la papa se estimó con base a la metodología sugerida por Alvarado [18], según la cual, la condición de pérdida de calidad en la cual la papa se considera inaceptable para el consumo en fresco es inferior al 65% de humedad. Luego se determinó el orden de reacción que permita predecir el tiempo en que se alcanzaría la condición de inaceptable y se calculó el tiempo de vida útil o durabilidad.

Análisis Estadístico

Los datos se procesaron a través de un análisis de varianza multifactorial (ANOVA) 3x2x2x9, usando el programa estadístico INFOSTAT (Universidad de Córdoba, Argentina), para la comparación de las medias con respecto a la variedad, condición de los tubérculos y ambiente de almacenamiento. La prueba de rango múltiple de Tukey fue usada para determinar diferencias significativas a un nivel del 5%. Todos los análisis se hicieron por triplicado, los resultados están expresados como la media \pm desviación estándar. La estimación de la vida útil se realizó con base a las ecuaciones que relacionan la variación de la humedad con el tiempo de almacenamiento, Como límite crítico de aceptabilidad para el consumo de la papa en estado fresco, se estableció un 65% de humedad [16].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Materia Seca

La materia seca varió significativamente con la variedad de papa, el tratamiento, el tiempo y la condición de almacenamiento ($p < 0.05$). Tukey al 5 % para la interacción "variedades x tratamiento x condición de almacenamiento x tiempo de almacenamiento" identificó 27 rangos de significación. En el primer rango con el menor contenido de materia seca se encuentra la variedad ratona no irradiada, almacenada al ambiente o

refrigeración por un día con 17.06% y en el último rango de significación con el mayor contenido de materia seca se ubica la misma variedad no irradiada, almacenada al ambiente por 40 días, con 60.98%. Este parámetro guarda relación directa con el contenido de humedad, el cual a su vez influye en la calidad y aceptabilidad de la papa para el consumo en estado fresco. Durante el almacenamiento los tubérculos perdieron humedad por deshidratación, debido a la diferencia entre la humedad relativa del aire y la del tubérculo, esta última corresponde a la del aire saturado (90%). La tasa de evaporación fue mayor en los tubérculos no irradiados con respecto a los que recibieron radiación. La variedad ratona mostró un mayor contenido de materia seca almacenada bajo condiciones ambientales, (Figuras 1 y 2). Estos resultados evidencian el efecto de la irradiación en la disminución de la actividad metabólica de la papa y la velocidad de pérdida de humedad.

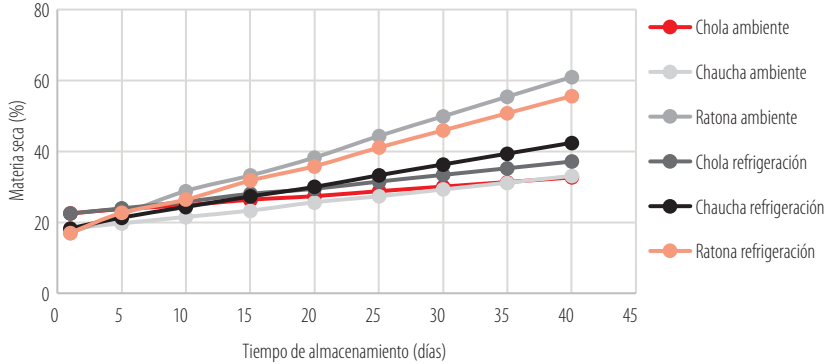


Figura 1. Variación de la materia seca con el tiempo de almacenamiento de la papa no irradiada

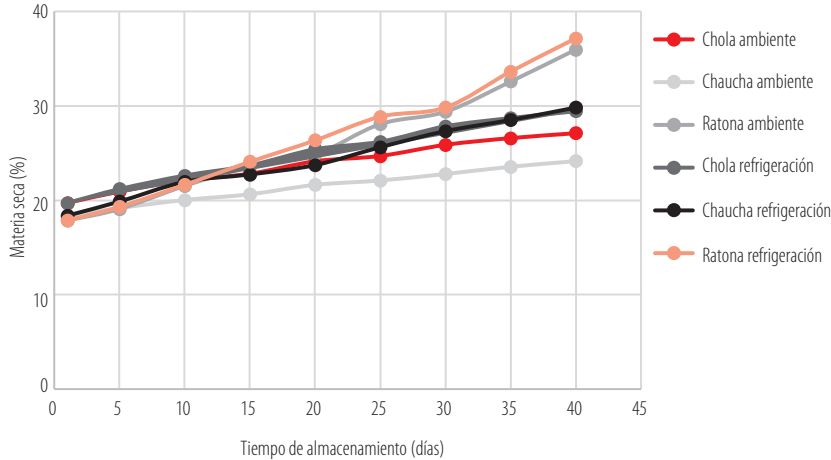


Figura 2. Variación de la materia seca con el tiempo de almacenamiento de la papa irradiada



Almidón y Azúcares reductores

El almidón es el mayor componente de la materia seca y principal carbohidrato de reserva de la papa. Se sintetiza durante la formación del tubérculo y se degrada para proveer los carbohidratos necesarios para el crecimiento de los brotes [19]. En la papa almacenada ocurrieron cambios químicos importantes, entre los más relevantes se menciona la disminución del almidón y humedad, aumento del contenido azúcares y materia seca. Estos dos últimos variaron significativamente por efecto de la variedad, el tratamiento (con y sin irradiación), la condición (ambiente y refrigeración) y el tiempo de almacenamiento ($p < 0.05$) como se muestra en la Tabla 1. La prueba de Tukey al 5 % para la interacción "variedades x tratamiento x condición de almacenamiento x tiempo de almacenamiento" identificó 58 rangos de significación. En el primer rango con el mayor contenido de almidón se encuentra la variedad chaucha irradiada, almacenada al ambiente y en refrigeración por un día con 80.31% y en el último rango de significación con el menor contenido de almidón se ubica la misma variedad no irradiada, almacenada en refrigeración por 40 días, con 43.23%. En general, los tubérculos no irradiados, almacenados en refrigeración presentaron la mayor pérdida de almidón. Este fenómeno se revirtió con la irradiación y el almacenamiento al ambiente, bajo estas condiciones las variedades chola, ratona y chaucha presentaron pérdidas en el orden del 9.96, 14.34 y 17.34%, respectivamente. Paralelo a la disminución de este nutriente, se registró un aumento de los azúcares reductores y se alcanzó un promedio de 1g/100g en la variedad chaucha no irradiada y almacenada en refrigeración. Al respecto, Rodríguez & Moreno [6] indican que el almidón tiende a disminuir en los tubérculos almacenados a bajas temperaturas, debido a la hidrólisis de este compuesto en azúcares o el inicio de la brotación. Tukey al 5 % para la interacción "variedades x tratamiento x condición de almacenamiento x tiempo de almacenamiento" identificó 50 rangos de significación. En el primer rango con el menor contenido de azúcares se encuentra la variedad chola irradiada y no irradiada, almacenada al ambiente y en refrigeración por 1 y 5 días con 7.62 mg/100 g y en el último rango de significación con el mayor contenido de azúcares reductores se ubica la variedad chaucha no irradiada, almacenada en refrigeración por 40 días, con 1.07 g/100 g. En general, la irradiación disminuyó la magnitud de cambio, efecto que fue notable en la variedad chola que presentó el menor contenido de azúcares reductores (44.48 mg/100 g) después de 40 días de almacenamiento al ambiente. Estos resultados concuerdan con las investigaciones realizadas por Claasens [19], quien encontró que durante la iniciación de la dormancia se produce una síntesis de almidón, mientras que al final de la misma predomina el desdoblamiento del compuesto hacia sus monómeros constituyentes, como la sacarosa. Viola et al. [20] asume que este cambio funcional permite la difusión de sacarosa en el apoplasto de tubérculos fuente, aumentando su disponibilidad para la absorción en el floema y el transporte hacia los brotes.

Tabla 1. Variación del contenido de almidón y azúcares reductores por efecto del tratamiento, condición y tiempo de almacenamiento de tres variedades de papa

Trata- miento	Almacene- namiento	Días	Almidón (%)			Azúcares Reductores (mg/100 g)				
			Chola	Chaucha	Ratona	Chola	Chaucha	Ratona		
Sin irradiación	Ambiente	1	76.37±0.16 ^l	80.22±0.16 ^l	78.30±0.16 ^l	8.41±1.48 ^A	31.06±1.45 ^{A,F}	16.46±1.88 ^{A,C}		
		5	74.17±0.16 ^{ld}	76.83±0.16 ^o	75.64±0.01 ^l	19.21±0.36 ^{A,C}	76.50±3.17	64.78±2.26 ^{A,O}		
		10	72.06±0.10 ^{no}	73.16±0.10 ⁿ	72.61±0.01 ^{no}	41.04±1.05 ^{A,I}	180.92±2.37 ^{W,d}	172.13±1.68 ^{U,b}		
		15	69.13±0.16 ^l	70.87±0.16 st	70.05±0.16 ^{phi}	63.75±1.30 ^{A,O}	251.15±3.08 ^f	275.16±1.14 ^g		
		20	66.1±0.16 ^g	64.18±0.16 ^o	65.37±0.16 ^l	85.68±2.84 ^{B,R}	353.2±1.22 ^l	348.62±1.96 ^g		
		25	63.68±0.04 ^o	61.31±0.03 ^u	62.69±0.03 ^{OR}	105.19±1.17 ^{f,u}	431.68±1.58 ^l	445.67±1.48 ^m		
		30	61.00±0.02 ^W	57.35±0.01 ^l	59.41±0.02 ^W	125.99±1.63 ^{M,Y}	517.19±1.64 ^{m,o}	536.97±1.83 ^p		
		35	58.34±0.02 ^l	53.38±0.03 ^b	56.13±0.02 ^M	149.79±1.76 ^{R,a}	602.7±1.46	628.27±2.42 ^Z		
		40	55.68±0.02 ^{MN}	49.42±0.04 ^f	52.85±0.02 ^o	168.59±3.03 ^{W,d}	688.21±3.28 ^u	719.57±1.91 ^W		
		Refrigeración	1	76.37±0.16 ^l	80.22±0.16 ^l	78.30±0.16 ^W	8.41±1.48 ^A	31.06±1.45 ^{A,F}	16.46±1.88 ^{A,C}	
			5	72.98±0.42 ^m	78.20±0.16 ^l	73.07±0.16 ^m	39.36±8.24 ^{A,I}	132.88±2.63 ^{W,Z}	77.18±3.21 ^{A,E}	
			10	70.05±0.16 ^{hi}	71.70±0.16 ^{oa}	69.13±0.16 ^l	63.88±1.33 ^{A,O}	236.14±1.12 ^f	187.85±1.61 ^d	
			15	68.03±0.16 ^g	68.85±0.16 ^l	66.84±0.01 ^{bc}	94.15±1.21 ^{A,E}	384.19±0.79 ^k	282.77±3.23 ^{f,h}	
			20	64.55±0.16 ^g	61.70±0.16 ^o	61.98±0.16 ^g	128.77±2.28 ^{h,Y}	549.12±3.10 ^l	369.66±3.08 ^h	
	25		61.61±0.01 ^T	57.78±0.03 ^K	57.94±0.02 ^l	157.91±2.08 ^{R,a}	664.35±1.49 ^{op}	468.27±2.37 ⁿ		
	30		58.64±0.02 ^X	52.93±0.05 ^c	53.91±0.04 ^A	188.65±2.24 ^{f,d}	798.71±2.08 ^r	563.36±1.82 ⁿ		
	35		52.7±0.04 ^E	48.08±0.03 ^f	49.88±0.02 ^f	219.39±1.98 ^f	933.05±2.19 ^w	658.46±2.96 ^t		
	40		52.7±0.04 ^f	43.23±0.02 ^h	45.86±0.02 ^c	250.13±3.90 ^f	1067.4±1.92 ^x	753.55±1.23 ^w		
	Irradiación		Ambiente	1	76.37±0.161 ^l	80.31±0.01 ^A	79.21±0.01 ^A	7.62±0.67 ^A	18.34±2.62 ^{A,C}	13.98±1.13 ^{AB}
				5	75.00±0.02 ^f	78.29±0.02 ^v	77.59±0.02 ^f	9.42±1.48 ^A	28.98±1.82 ^{A,E}	19.99±1.51 ^{A,D}
				10	73.62±0.16 ^m	75.73±0.16 ^l	75.64±0.01 ^l	12.91±1.32 ^{AB}	47.29±2.23 ^{A,K}	34.39±2.02 ^{A,G}
				15	73.08±0.03 ^m	74.98±0.02 ⁴	74.76±0.02 ^f	18.89±2.3 ³	69.09±2.59 ^{A,O}	58.54±1.69 ^{A,N}
				20	71.7±0.16 ^{pp}	72.80±0.16 ⁿ	73.16±0.01 ^m	22.25±0.74 ^{A,D}	84.7±1.22 ^{B,R}	68.63±1.90 ^{A,O}
		25		71.16±0.02 ^{qs}	71.66±0.03 ^{pr}	71.93±0.03 ^{op}	28.37±2.52 ^{A,E}	109.2±1.63 ^{H,X}	97.1±1.55 ^{E,T}	
		30		69.95±0.16 ^{hi}	71.05±0.16 ^s	70.60±0.16 ^W	31.82±1.61 ^{A,F}	122.32±1.50 ^{A,Y}	112.65±1.91 ^X	
		35		69.24±0.04 ^f	68.35±0.02 ^z	69.10±0.03 ^l	37.84±2.16 ^{A,H}	149.3±1.91 ^{o,a}	135.65±1.64 ^{o,z}	
		40		68.76±0.28 ^x	66.38±0.16 ^{cd}	67.85±0.16 ^g	44.48±1.25 ^{A,J}	177.08±2.92 ^{U,d}	163.3±1.40 ^{U,b}	
		Refrigeración		1	76.37±0.160 ^l	80.31±0.01 ^A	79.21±0.01 ^B	7.62 ± 2.62 ^A	18.34±2.62 ^{A,C}	13.98±1.13 ^{AB}
5				74.57±0.02 ^k	78.36±0.02 ^x	77.80±0.02 ^f	15.36±2.97 ^{AB}	43.63±1.48 ^{A,I}	26.18±1.55 ^{A,E}	
10				72.61±0.10 ⁿ	75.18±0.16 ³	75.00±0.16 ^l	22.95±2.93 ^{A,E}	73.06±1.39 ^{A,P}	48.45±1.33 ^{A,L}	
15				71.92±0.02 ^{op}	73.83±0.02 ^l	73.97±0.02 ^l	29.85±0.5 ^{A,E}	90.14±1.63 ^{C,S}	66.49±1.46 ^{A,O}	
20				70.05±0.16 ^{phi}	71.97±0.16 ^p	73.44±0.01 ^m	39.30±3.29 ^{A,I}	119.43±1.34 ^{A,Y}	79.89±1.59 ^{A,Q}	
25			69.26±0.02 ^l	69.30±0.02 ^l	70.13±0.02 ^h	44.33±2.03 ^{A,J}	136.65±2.24 ^Z	106.8±1.50 ^{A,W}		
30			68.12±0.16 ^g	68.40±0.16 ^z	68.58±0.16 ^g	53.74±1.71 ^{A,M}	155.38±1.47 ^{B,a}	118.82±1.49 ^{A,Y}		
35			66.61±0.02 ^{bc}	64.78±0.02 ^o	66.29±0.03 ^{c,e}	58.82±1.24 ^{A,N}	183.17±1.66 ^d	147.11±1.22 ^{U,a}		
40			65.55±0.16 ^g	61.52±0.16 ^l	63.63±0.16 ^{OR}	63.30±2.37 ^{A,O}	205.43±1.27 ^e	176.13±2.77 ^{U,c}		



Tabla 2. Variación del ácido ascórbico y la intensidad respiratoria por efecto del tratamiento, condición y tiempo de almacenamiento de tres variedades de papa

Trata- miento	Almacena- miento	Días	Ácido ascórbico (mg/100 g)			Intensidad respiratoria (mg CO ₂ /kg*h)		
			Chola	Chaucha	Ratona	Chola	Chaucha	Ratona
Sin irradiación	Ambiente	1	7.31±0.08 ^{abc}	9.34±0.14 ^a	7.93±0.24 ^c	73.88±0.12 ^a	83.28±0.54 ^{ab}	82.47±1.62 ^{a-o}
		5	5.55±0.16 ^{m-x}	5.40±0.06 ^{px}	6.25±0.07 ^{de}	65.23±1.10 ^{ra}	73.71±1.70 ^{rm}	70.69±0.45 ^{pa-o}
		10	4.41±0.07 ^{m-u}	4.41±0.61 ^u	5.03±0.03 ^{vy}	60.01±1.08 ^{sh}	64.52±0.87 ^{sc}	61.48±1.93 ^{sf}
		15	4.18±0.03 ^{ai}	3.98±0.33 ^{a-o}	3.58±0.05 ^{af}	50.29±0.03 ^{ce}	51.56±0.52 ^{bd}	52.01±0.48 ^{bc}
		20	3.52±0.03 ^{ab}	3.48±0.04 ^{af}	3.61±0.13 ^q	45.69±0.13 ^{dq}	44.08±0.63 ^{dq}	44.86±0.25 ^{ch}
		25	3.51±0.02 ^{bc}	3.47±0.02 ^{af}	3.59±0.05 ^q	37.11±0.01 ^l	32.46±0.02 ^{il}	33.49±0.01 ^l
		30	3.48±0.02 ^{cd}	3.44±0.04 ^{ae}	3.46±0.01 ^{af}	29.70±0.01 ^{km}	22.00±0.02 ^{ln}	23.76±0.02 ^{lm}
		35	3.46±0.01 ^{af}	3.10±0.01 ^{af}	3.42±0.02 ^{ae}	22.30±0.02 ^{kn}	11.53±0.03 ^p	14.03±0.02 ^p
	40	3.42±0.02 ^{pe}	3.40±0.02 ^{ad}	3.39±0.01 ^{af}	19.90±0.02 ^o	1.07±0.01 ^q	4.30±0.02 ^q	
	Refrigeración	1	7.31±0.08 ^{abc}	9.34±0.14 ^a	7.93±0.24 ^c	73.88±0.12 ^{ai}	83.28±0.54 ^{ab}	82.47±1.62 ^{a-o}
		5	5.38±0.10 ^{m-x}	4.58±0.07 ^{ht}	4.73±0.38 ^s	71.55±0.17 ^{zn}	76.84±0.05 ^{mo}	77.06±0.43 ^o
		10	3.57±0.04 ^{as}	3.56±0.02 ^{ps}	3.76±0.02 ^q	69.13±0.19 ^{pa}	72.94±0.48 ^{rm}	71.54±0.19 ⁿ
		15	3.52±0.03 ^{ab}	3.48±0.04 ^{ad}	3.61±0.13 ^q	66.86±0.19 ^{pw}	67.51±0.26 ^{rs}	66.96±0.25 ^u
		20	3.50±0.02 ^{af}	3.80±0.17 ^p	3.47±0.03 ^{ae}	64.52±0.18 ^c	63.51±0.29 ^{si}	63.71±0.29 ^c
		25	3.48±0.02 ^{af}	3.73±0.05 ^q	3.44±0.02 ^{ae}	61.98±0.01 ^{sf}	57.82±0.03 ^{sh}	57.73±0.03 ^h
		30	3.44±0.03 ^{ae}	3.62±0.07 ^q	3.41±0.01 ^{af}	59.55±0.01 ^{pa}	52.75±0.01 ^{ab}	52.79±0.03 ^a
35		3.40±0.01 ^d	3.58±0.03 ^{ps}	3.38±0.02 ^q	57.11±0.01 ^{pa}	47.69±0.02 ^{af}	47.85±0.02 ^f	
40	3.36±0.02 ^g	3.47±0.03 ^{ae}	3.37±0.03 ^q	54.68±0.01 ^{pa}	42.62±0.02 ^{bk}	42.91±0.02 ^j		
Irradiación	Ambiente	1	7.23±0.08 ^c	9.02±0.66 ^a	8.29±1.47 ^b	72.93±0.45 ^m	83.38±0.28 ^a	82.46±2.12 ^{a-o}
		5	6.15±0.06 ^{ef}	7.14±0.62 ^{cd}	7.16±0.79 ^{cd}	72.25±0.01 ^m	80.77±0.02 ^{pa}	81.27±0.02 ^{pa}
		10	4.87±0.03 ^{cs}	5.30±0.86 ^{py}	5.94±0.17 ^f	71.41±0.48 ^{pa}	77.40±0.28 ^o	80.34±0.36 ^o
		15	4.68±0.06 ^{es}	4.99±0.20 ^y	5.54±0.23 ^{m-x}	69.73±0.02 ^{pa}	76.11±0.02 ^{pa}	76.83±0.02 ^{pa}
		20	4.49±0.06 ^u	4.65±0.49 ^{fs}	5.22±0.22 ^{py}	68.41±0.01 ^{ba}	74.33±0.64 ^o	73.77±0.58 ^{wj}
		25	4.45±0.04 ^{ku}	4.58±0.20 ^t	5.10±0.10 ^y	67.21±0.01 ^{bt}	71.45±0.02 ^{pa}	72.40±0.03 ^{pa}
		30	4.43±0.06 ^{ku}	4.54±0.20 ^u	5.00±0.11 ^y	66.07±1.76 ^{py}	68.23±0.01 ^{mf}	70.29±0.64 ^a
		35	4.36±0.04 ^h	4.45±0.10 ^{ku}	4.65±0.04 ^{fs}	64.58±0.17 ^{ba}	66.78±0.01 ^{px}	67.96±0.03 ^{mf}
	40	4.28±0.02 ^s	4.42±0.08 ^{ku}	4.32±0.01 ^{ab}	63.26±0.02 ^{je}	65.07±0.36 ^{ba}	65.77±0.01 ^z	
	Refrigeración	1	7.23±0.08 ^{cd}	9.02±0.66 ^a	8.29±1.47 ^{cy}	72.93±0.45 ^m	83.38±0.28 ^a	82.46±0.21 ^{fo}
		5	6.00±0.18 ^{ef}	7.03±0.21 ^{cd}	7.00±0.74 ^{de}	73.80±0.02 ^{wy}	82.32±0.03 ^{ab}	81.66±0.02 ^{pa}
		10	4.63±0.33 ^{ti}	4.97±0.12 ^{bs}	5.63±0.09 ^f	73.73±0.68 ^{ck}	81.11±0.86 ^{g-o}	80.82±0.22 ^o
		15	4.56±0.17 ^{ti}	4.67±0.06 ^{fs}	5.30±0.05 ^{py}	72.93±0.02 ^{zm}	79.71±0.01 ^o	79.42±0.02 ^o
		20	4.48±0.12 ^u	4.40±0.08 ^{m-w}	4.92±0.03 ^{bs}	72.52±0.19 ^{ym}	78.55±0.24 ^o	78.25±0.19 ^o
		25	4.39±0.07 ^h	4.39±0.04 ^h	4.81±0.02 ^{cs}	72.07±0.02 ^{zn}	77.10±0.01 ^o	77.17±0.01 ^{ba}
		30	4.31±0.01 ^{ai}	4.38±0.01 ^{ah}	4.71±0.02 ^{ds}	71.39±0.89 ^{ai}	75.19±0.53 ^{no}	75.69±0.90 ^{no}
35		4.27±0.01 ^{as}	4.31±0.04 ^h	4.40±0.18 ^{m-x}	71.21±0.02 ^{ai}	74.49±0.02 ^o	74.93±0.02 ^o	
40	4.24±0.01 ^{ak}	4.27±0.05 ^{as}	4.28±0.02 ^{as}	70.86±0.18 ^{ai}	73.54±0.29 ^{ym}	74.04±0.29 ^o		

Ácido ascórbico e intensidad respiratoria (IR)

Otros parámetros que disminuyeron significativamente con el tiempo de almacenamiento fueron el contenido de ácido ascórbico y la intensidad respiratoria ($p < 0.05$). Tukey al 5 % para la interacción “variedades x tratamiento x condición de almacenamiento x tiempo de almacenamiento” identificó 25 rangos de significación. En el primer rango con el mayor contenido de ácido ascórbico se encuentra la variedad chaucha no irradiada, almacenada al ambiente y en refrigeración por un día con 9.34 mg/100 g y en el último rango de significación con el menor contenido de ácido ascórbico se ubica la variedad chola no irradiada, almacenada en refrigeración por 40 días, con 3.36 mg/100 g. El ácido ascórbico o vitamina C es un agente antioxidante necesario para la formación y mantenimiento adecuado del material intercelular; puede reducir la acción perjudicial de los radicales libres y coadyuva al mejoramiento de la absorción del hierro no hemínico [21, 22]. Es muy sensible a la luz, temperatura y oxígeno degradándose fácilmente durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos [21]. En el monitoreo del tiempo de almacenamiento se determinó que el ácido ascórbico disminuyó súbitamente en los primeros 10 días de almacenamiento, en un 45% en la papa irradiada y 62.36% en la papa sin tratamiento de irradiación. Lo que evidencia la sensibilidad de este nutriente al almacenamiento, la radiación y el oxígeno del aire, a través de las oxidasas catalíticas y/o trazas de algunos metales. Según varios autores, la oxidasa del ácido ascórbico está ampliamente distribuida en los tejidos de las plantas y cataliza la reacción hasta ácido dehidroascórbico y una reacción estrechamente relacionada tiene lugar para la reacción directa del oxígeno del aire, mostrando que la radiación no inactiva las enzimas de la papa [15, 18]. Al término del periodo de almacenamiento estas pérdidas alcanzaron el 54% en la papa irradiada y 65% en la papa no irradiada (Tabla 2), evidenciando el efecto de deterioro en almacenamiento. Estos resultados concuerdan con los reportados por otros autores, quienes registraron pérdidas de ácido ascórbico en el orden del 64% en papas almacenadas por dos meses a 18°C [3, 15].

La respiración es un proceso vital que proporciona la energía requerida para mantener vivos los tejidos de los tubérculos. En este proceso, los azúcares son convertidos en agua y dióxido de carbono mediante la captación de oxígeno del ambiente, liberando a su vez calor [20]. La prueba de Tukey al 5% para la interacción “variedades x tratamiento x condición de almacenamiento x tiempo de almacenamiento” identificó 40 rangos de significación. En el primer rango con la mayor intensidad respiratoria se encuentra la variedad chaucha irradiada, almacenada al ambiente por un día con 83.38 mgCO₂/kg*h y en el último rango de significación con la menor intensidad respiratoria se ubica la variedad chaucha no irradiada, almacenada en condición de ambiente por 40 días, con 1.07 mgCO₂/kg*h. Durante la respiración la producción de energía proviene de la oxidación de las propias reservas de almidón, azúcares y otros metabolitos. Una vez cosechada, la papa no puede reemplazar estas reservas que se pierden y la velocidad con que disminuyen es un factor de gran importancia en la duración de la vida poscosecha del tubérculo [12]. La intensidad respiratoria (IR) de la papa, disminuyó con el tiempo de almacenamiento, en mayor proporción y velocidad en los tubérculos no irradiados y almacenados en condiciones de ambiente (Tabla 2); en las variedades chaucha y ratona no irradiadas y almacenadas al ambiente, la IR disminuyó en un 94%, mientras que en la variedad chola almacenada a 7°C, la IR disminuyó en un 21.43% con respecto a la papa recién cosechada. La irradiación de los tubérculos y una menor temperatura de almacenamiento atenuaron la disminución de la IR a un promedio de 13%, en las tres variedades en estudio; bajo estas condiciones la IR de la variedad ratona en refrigeración, sólo disminuyó un 6.25%,



con respecto al valor inicial (80 mgCO₂/kg*h). Estos resultados concuerdan con los reportados por Rezaee et al. (2011) y Prakash et al. (2000) [3, 4], quienes indican que las bajas temperaturas de almacenamiento ayudan a disminuir la velocidad de respiración y a prolongar la durabilidad postcosecha de la papa.

Color del tegumento y tamaño de los brotes

A diferencia de los componentes nutricionales e intensidad respiratoria, la diferencia de color total (ΔE) del tegumento y el tamaño de los brotes aumentaron con el tiempo de almacenamiento ($p < 0.05$) (Tabla 3). La prueba de Tukey al 5 % para la interacción "variedades x tratamiento x condición de almacenamiento x tiempo de almacenamiento" identificó 35 rangos de significación. En el primer rango con la menor diferencia de color se encuentra la variedad ratona irradiada, almacenada al ambiente por cinco días con un (ΔE) de 185.07 y en el último rango de significación con el mayor ΔE (382.39) se ubica la variedad chola no irradiada, almacenada en refrigeración entre 35-40 días. En general, El color es un atributo de apariencia de la papa, depende de varios factores y tiene importancia desde el punto de vista comercial ya que determina su grado de aceptación por el consumidor. Los tubérculos almacenados en refrigeración, sin el tratamiento de irradiación, experimentaron una mayor variación (ΔE), con respecto al color inicial, especialmente las variedades chaucha y ratona. Los resultados muestran que la refrigeración provocó un mayor efecto que la irradiación sobre el color del tegumento, ya que los tubérculos que fueron irradiados y almacenados al ambiente experimentaron menor variación de color. Este resultado también sugiere que el límite superior de dosis para la irradiación de la papa corresponde a 120 Gy, dosis mayores pueden provocar un oscurecimiento de la papa [12].

En cuanto al tamaño de los brotes, desde el inicio de la formación de los tubérculos hasta el momento de la cosecha y parte inicial del período de almacenamiento las papas se encuentran en estado de "dormancia"; es decir, no brotan por estar bajo el efecto de inhibidores naturales. Este período duró entre a 3 a 5 días en las variedades chaucha y ratona, no irradiadas y almacenadas a 12°C y 70% de humedad relativa, mientras que el periodo de dormancia de la variedad chola, superó los 40 días de monitoreo, sin demostración visible del crecimiento de brotes (Tabla 3), resultado que puede tener repercusiones económicas, al prolongar la vida útil de las papas nativas disminuyendo las pérdidas postcosecha [24]. La variedad chaucha, almacenada a 12°C, sin irradiar, presentó dormancia de 10 a 15 días a 7°C. El período de dormancia de la variedad ratona sin irradiar fue de 20 días a 12°C y 25 días a 7°C. La prueba de Tukey al 5 % para la interacción "variedades x tratamiento x condición de almacenamiento x tiempo de almacenamiento" identificó 12 rangos de significación. En el primer rango con ausencia de brotes se ubicaron las tres variedades, irradiadas, almacenadas al ambiente y en refrigeración de 5 a 40 días y en el último rango de significación con el mayor crecimiento de brotes se ubicó la variedad ratona no irradiada, almacenada al ambiente por 40 días. Generalmente se considera que la dormancia se pierde cuando un tubérculo contiene uno o más brotes con una longitud mayor de dos milímetros [20]. Con el tratamiento de irradiación, independientemente de la temperatura de almacenamiento, el período de dormancia de las tres variedades de papa superó los 40 días de monitoreo y prueba, lo cual según Viola et al. [20] podría relacionarse con la presencia de aislamiento simplástico en el brote apical, que retarda la conversión de carbohidratos almacenados en azúcares disponibles para el inicio de la brotación. Siendo éste resultado uno de los mayores efectos perceptibles en la papa irradiada.

Tabla 3. Variación del color y tamaño de los brotes por efecto del tratamiento, condición y tiempo de almacenamiento de tres variedades de papa

Trata- miento	Almacena- miento	Días	Diferencia total de color del tegumento (ΔE)			Tamaño de los brotes (mm)		
			Chola	Chaucha	Ratona	Chola	Chaucha	Ratona
Sin irradiación	Ambiente	5	249.50±1.39 ^{q-p}	215.64±0.58 ^e	229.90±0.38 ^u	0.00 ^a	1.00±0.01 ^{bcd}	1.00±0.01 ^{bcd}
		10	255.29±1.96 ^{q-p}	221.17±0.58 ^{q-f}	253.35±0.38 ^{q-d}	0.00 ^a	1.67±0.01 ^{def}	1.00±0.01 ^{bcd}
		15	259.02±1.33 ^{e-r}	229.98±0.58 ^u	277.56±0.38 ^{q-x}	0.00 ^a	3.00±0.02 ^{gh}	1.00±0.01 ^{bcd}
		20	267.98±1.48 ^{q-t}	238.48±0.58 ^k	288.73±0.38 ^{q-lb}	0.00 ^a	3.67±0.03 ^k	1.33±0.01 ^{def}
		25	273.70±0.77 ^w	245.99±0.58 ⁿ	312.56±0.38 ^f	0.00 ^a	5.00±0.04 ^l	2.67±0.02 ^k
		30	280.27±1.95 ^{l-z}	253.38±0.28 ^p	332.63±0.49 ^h	0.00 ^a	5.00±0.04 ^l	3.67±0.02 ^l
		35	286.99±1.39 ^{l-a}	261.11±0.28 ^r	352.70±0.49 ^j	0.00 ^a	5.00±0.03 ^l	4.67±0.03 ^l
		40	293.61±0.78 ^{o-c}	268.84±0.28 ^u	372.77±0.49 ^h	0.00 ^a	5.00±0.04 ^l	5.00±0.03 ^l
	Refrigeración	5	246.66±0.64 ^{q-n}	192.83±0.28 ^{ab}	271.30±0.49 ^{q-t}	0.00 ^a	1.00±0.01 ^{bcd}	1.00±0.01 ^{bcd}
		10	268.69±2.26 ^{q-t}	208.95±0.28 ^d	292.62±0.49 ^{q-c}	0.00 ^a	1.67±0.01 ^{def}	1.00±0.01 ^{bcd}
		15	277.93±1.35 ^y	236.81±0.28 ^k	305.27±0.49 ^{q-e}	0.00 ^a	2.33±0.02 ^{gh}	1.00±0.01 ^{bcd}
		20	288.95±0.60 ^{q-c}	268.05±0.28 ^t	318.52±0.49 ^{q-f}	0.00 ^a	3.33±0.02 ^{ij}	1.67±0.01 ^{def}
		25	304.51±2.18 ^{q-e}	290.04±0.47 ^{q-c}	335.51±0.49 ^{q-i}	0.00 ^a	4.33±0.03 ^{kl}	2.00±0.03 ^{gh}
		30	318.53±1.07 ^{q-f}	315.39±0.47 ^{q-f}	350.94±0.49 ^{q-i}	0.00 ^a	4.67±0.04 ^l	2.33±0.02 ^{gh}
		35	382.39±0.49 ^j	340.74±0.47 ^{q-i}	366.37±0.49 ^{q-i}	0.00 ^a	5.00±0.04 ^l	3.33±0.02 ^{ij}
		40	346.25±0.56 ^{e-j}	366.1±0.47 ^{q-i}	381.81±0.49 ^j	0.00 ^a	5.00±0.04 ^l	4.33±0.03 ^{kl}
Irradiación	Ambiente	5	233.70±2.24 ^{b-k}	216.29±0.47 ^e	185.06±0.50 ^a	0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00 ^a
		10	235.04±0.38 ^{b-k}	217.87±0.47 ^e	197.25±0.50 ^{ab}	0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00 ^a
		15	235.85±1.41 ^{b-k}	218.72±0.47 ^f	227.07±0.42 ^{a-i}	0.00a	0.00±0.00 ^a	0.00 ^a
		20	236.44±1.42 ^{b-k}	219.39±0.40 ^f	258.85±0.42 ^{e-r}	0.00a	0.00±0.00 ^a	0.00 ^a
		25	237.80±2.04 ^{b-k}	219.39±0.40 ^f	269.08±0.42 ^u	0.00a	0.00±0.00 ^a	0.00 ^a
		30	239.23±2.00 ^{b-k}	219.39±0.42 ^g	294.99±0.40 ^{q-d}	0.00a	0.00±0.00 ^a	0.00 ^a
		35	240.15±1.50 ^{b-k}	219.39±0.42 ^h	311.09±0.40 ^f	0.00a	0.00±0.00 ^a	0.00 ^a
		40	241.28±2.31 ^{c-l}	219.39±0.42 ⁱ	325.24±0.40 ^{q-g}	0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00 ^a
	Refrigeración	5	225.17±0.59 ^{q-i}	216.29±0.43 ^h	322.15±0.40 ^{q-g}	0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00 ^a
		10	230.85±0.89 ^{b-k}	216.99±0.43 ^h	324.27±0.40 ^{q-g}	0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00 ^a
		15	236.08±1.94 ^{b-k}	219.39±0.37 ^h	325.79±0.40 ^{q-g}	0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00 ^a
		20	242.34±2.20 ^{c-m}	219.39±0.37 ^h	326.96±0.38 ^h	0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00 ^a
		25	247.00±0.55 ^{d-o}	219.39±0.37 ⁱ	329.43±0.38 ^h	0.00 ^a	0.00±0.04 ^l	0.00 ^a
		30	250.21±0.40 ^{q-p}	219.39±0.37 ⁱ	331.62±0.38 ^h	0.00 ^a	0.00±0.04 ^l	0.00 ^a
		35	257.91±1.80 ^{e-q}	219.39±0.37 ⁱ	333.06±0.38 ^h	0.00 ^a	0.00±0.04 ^l	0.00 ^a
		40	264.60±0.47 ^f	219.39±0.30 ⁱ	334.84±0.38 ^h	0.00 ^a	1.00±0.04 ^{bcd}	0.00 ^a



Durabilidad

La representación gráfica de la variación de humedad con el tiempo de almacenamiento, correspondió a una cinética de orden cero ($p < 0.05$) (Tabla 4) y se observó un buen ajuste con los datos experimentales, con coeficientes de correlación entre 0.97 y 1.00. A partir de las ecuaciones descritas en la Tabla 4 se realizó la predicción del tiempo en que la papa alcanzaría el 65 % de humedad, considerado como límite crítico de aceptabilidad para el consumo en estado fresco, bajo este nivel los tubérculos presentaron arrugamiento, pérdida de coloración y crecimiento de brotes. Se determinó una menor durabilidad para los tubérculos almacenados al ambiente y sin tratamiento de irradiación, en el siguiente orden: 17 días (ratona), 28 días (chaucha) y 48 días (chola). El almacenamiento en refrigeración permitiría aumentar la durabilidad de las tres variedades a 19 días (ratona), 45 días (chaucha) y 69 días (chola). Cuando los tubérculos se irradian, la durabilidad en condición de ambiente se prolongaría a 38 días (ratona), 58 días (chaucha), 80 días (chola). El efecto sinérgico de la irradiación y la refrigeración prolongaría la durabilidad de los tubérculos a 44 días (ratona), 114 días (chaucha) y 106 días (chola), retardando su descomposición y reduciendo su infestación por insectos y/o la contaminación por otros organismos.

Tabla 4. Cinética de la variación de humedad de papa con el tiempo de almacenamiento

Trata- miento	Almace- namiento	Chola	Chaucha	Ratona
Sin irradiación	Ambiente	$y = -0.375x + 77.88$ ($r^2 = 0.9877$)	$y = -0.609x + 81.87$ ($r^2 = 0.9912$)	$y = -1.109x + 83.39$ ($r^2 = 0.9838$)
	Refrigeración	$y = -0.257x + 77.66$ ($r^2 = 0.9950$)	$y = -0.382x + 82.20$ ($r^2 = 0.9869$)	$y = -0.968x + 83.13$ ($r^2 = 0.97795$)
Irradiación	Ambiente	$y = -0.251x + 80.07$ ($r^2 = 0.9866$)	$y = -0.287x + 81.57$ ($r^2 = 0.9744$)	$y = -0.477x + 83.09$ ($r^2 = 0.9911$)
	Refrigeración	$y = -0.188x + 80.02$ ($r^2 = 0.9698$)	$y = -0.145x + 81.54$ ($r^2 = 0.9894$)	$y = -0.411x + 83.15$ ($r^2 = 0.9750$)

CONCLUSIONES

Los mayores cambios en los contenidos de almidón y los azúcares se produjeron en los tubérculos no irradiados y almacenados en condiciones de ambiente (12°C y 70% de humedad relativa).

La radiación gamma retardó los cambios bioquímicos y la intensidad respiratoria de la papa, efecto que fue potencializado con la baja temperatura de almacenamiento permitiendo extender la vida útil de la variedad ratona hasta 44 días y de chaucha

hasta 114 días. No obstante, la irradiación de alimentos a mayor escala está sujeta a la disponibilidad de una fuente industrial de cobalto 60 (Co_{60}), que se encuentra hoy en día bajo consideración y estudio del Ministerio de Producción, comercio Exterior, Inversiones y Pesca, MPCEIP.

El control de algunos factores que controlan la brotación acelerada mediante la irradiación es de gran importancia para fitomejoradores, productores y procesadores de papa en estado fresco, en la medida en que constituyen herramientas para mejorar la competitividad y generar nuevas opciones para el desarrollo agrícola de Ecuador.

Este estudio presenta información que puede ayudar a los diferentes actores a decidir con sensatez sobre el lugar que debe ocupar la irradiación en sus esfuerzos por garantizar un suministro de papa suficiente, sano y fiable.

AGRADECIMIENTOS

A la Agencia Internacional de Energía Atómica, por el apoyo financiero para realizar la presente investigación. Al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, por el apoyo y las facilidades brindadas para realizar el estudio. Un resumen del presente trabajo se presentó en el II Simposio Latinoamericano de Aplicaciones Nucleares en la Agricultura.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

Elena Villacrés; mentalizó la investigación, diseñó los experimentos, redactó el manuscrito y participó como tutor y revisor de los resultados. Mishel Yáñez realizó los ensayos de laboratorio, la toma de datos y análisis estadístico de resultados. María Belén Quelal participó en la validación de las metodologías aplicadas. Trosky Yáñez contribuyó en la revisión de los resultados de la investigación.

REFERENCIAS

- [1] Devaux, A., Kromann, P., Ortiz, O. (2014) Potatoes for sustainable global food security. *Potato Res* 57:185–199
- [2] Basantes, F., Suárez, J.P.A., Illescas, L.M.A., Hernández, L. del R.V. (2020). Diagnóstico de la situación actual de la producción y comercialización de la papa (*Solanum tuberosum* L.) en la Zona 1 del Ecuador. *E-Agronegocios* 6:103–120
- [3] Rezaee, M., Almasi, M., Majdabadi Farahani, A., Minaei, S., & Khodadadi, M. (2011). Potato sprout inhibition and tuber quality after post harvest treatment with gamma irradiation on different dates. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13(6), 829-842
- [4] Prakash, A., Guner, A.R., Caporaso, F., Foley, D.M. (2000). Effects of low dose gamma irradiation on the shelf life and quality characteristics of cut romaine lettuce packaged under modified atmosphere. *J Food Sci* 65:549–553
- [5] Mejía Villafuerte, D.A. (2017). Pérdidas poscosecha en la cadena de valor del rubro papa, un estudio de caso en la provincia del Carchi Año: 2016. (Bachelor's thesis, PUCE). Quito, Ecuador.
- [6] Rodríguez, L.E. Moreno, L.P. (2010). Factores y mecanismos relacionados con la dormancia en tubérculos de papa. Una revisión. *Agron Colomb* 38:189–197
- [7] Daniels Lake, B., Olsen, N., López Delgado, H., Zink, R. (2013). Eficacia de los productos controladores de la brotación de papa. *Doc Cienc y Tecnol la NAPPO* 3–4.
- [8] Arvanitoyannis, I.S., Stratakos, A.C., Tsarouhas, P. (2009). Irradiation applications in vegetables and fruits: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 49:427–462
- [9] Singh, R. P., & Heldman, D. R. C. (2009). *Introducción a la ingeniería de los alimentos*. No. 641.3 Si646i. Editorial Acribia, Zaragoza, España. 200p.
- [10] Afshari, H. (2006). *Examination of Mechanical Properties and Impact Sensitivity of Potato Varieties and Mathematical Modeling of Tuber Damage Susceptibility* (Doctoral dissertation, Ph. D. Thesis. Mechanics of Farm Machinery, Faculty of Agriculture, Sciences and Researches Branch, Islamic Azad University. Iran).
- [11] Suárez, R. (2001). Conservación de alimentos por irradiación. *Invenio* 4:85–124
- [12] Ruiz Ramos, E. T. (2016). *Estudio del efecto del tratamiento poscosecha por irradiación gamma sobre la vida útil de la cebolla perla ecuatoriana de exportación (Allium cepa L.)* (Bachelor's thesis). Escuela Politécnic Nacional, Quito.
- [13] AOAC (Association of Official Analytical Chemistry) No Title. In: Horwitz W (ed) 17 th. Arlington
- [14] Durán, L., Fiszman, S., Benedito, C. (2001). Propiedades mecánicas empíricas: Métodos para medir propiedades físicas industriales de alimentos. Métodos para medir propiedades físicas en Ind Aliment Prim edición Ed Acribia, SA, Zaragoza, España 153–154
- [15] Egoville, M.J, Sullivan, J.F, Kozempel, M.F., Jones, W.J. (1988). Ascorbic acid determination in processed potatoes. *Am Potato J* 65:91–97
- [16] Buitrago, G. V., López, A.P., Coronado, A.P., Osorno, F.L. (2004). Determinación de las características físicas y propiedades mecánicas de papa cultivada en Colombia. *Rev Bras Eng Agrícola e Ambient* 8:102–110
- [17] Gallo Pérez, F. (1996). *Manual de fisiología, patología post-cosecha y control de calidad de frutas y hortalizas*. SENA-NRI, Colombia. 180p.
- [18] Alvarado, J. de D. (1996). Principios de ingeniería aplicados a alimentos. División de artes gráficas. en una licuadora Oster por 3 min, 19. Claassens MMJ (2002) Carbohydrate metabolism during potato tuber dormancy and sprouting
- [19] Viola, R., Pelloux, J., van der Ploeg, A., et al. (2007). Symplastic connection is required for bud outgrowth following dormancy in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Plant Cell Environ* 30:973–983
- [20] Grosso, G., Bei, R., Mistretta, A., Marventano, S., Calabrese, G., Masuelli, L., Gazzolo, D. (2013). Effects of vitamin C on health: A review of evidence. *Front Biosci-Landmark* 18:1017-29.

- [21] Shaik-Dasthagirisahab, Y.B., Varvara, G., Murmura, G., Saggini, A., Caraffa, A., Antinolfi, P., Pandolfi, F. (2013). Role of vitamins D, E and C in immunity and inflammation. *J Biol Reg Homeos Ag.* 27(2):291-5.
- [22] Organización Mundial de la Salud, (1989). *La irradiación de los alimentos*. Gráficas Reunidas, Zaragoza, España. 90p.
- [23] Velástegui-Espín, G. P., Artieda-Rojas, J. R., Mera-Andrade, R. I., López-Villacís, I. C., Pazmiño-Miranda, N. D. P., & Espinoza-Vaca, J. S. (2018). Inhibición de la brotación del tubérculo de papa: una revisión de los métodos empleados. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 6(2), 55-64.

Proceso editorial

Por favor, revise estas directrices para preparar su manuscrito, pues todos los manuscritos enviados a la revista ACI Avances en Ciencias e Ingenierías deben cumplirlas. Estas directrices le ayudarán a estar seguro que su manuscrito está completo y que el proceso editorial se conducirá lo más ágil posible.

Asegúrese de revisar el Enfoque y Alcance de ACI Avances en Ciencias e Ingenierías así como nuestros Criterios de Publicación para conocer lo que publicamos.

Lea nuestras Políticas Editoriales, incluyendo las Políticas de Sección, Proceso de Evaluación por Pares, Frecuencia de Publicación, Política de Acceso Abierto, y Requisitos de Autoría.

Todos los autores deben cumplir con los requerimientos de autoría establecidos de la política de Requisitos de Autoría de ACI Avances en Ciencias e Ingenierías. Aquellos que hayan contribuido al trabajo pero que no cumplan estos requisitos puede ser mencionados en los Agradecimientos.

El Autor para correspondencia debe ingresar su identificador único ORCID al momento del envío del manuscrito (óptimamente, todos los doctores del manuscrito deberían contar su propio ORCID). + [Info sobre ORCID](#).

Los nombres de los autores se publicarán exactamente como aparecen en el manuscrito. Por favor revise la información con cuidado para asegurarse de que es correcta.

ACI Avances en Ciencias e Ingenierías recibe manuscritos que presentan información original y la evaluación de los manuscritos se realiza a través de un proceso de revisión por pares (peer-reviewed) que toma en consideración una determinación objetiva de la robustez científica y metodológica, no en factores subjetivos como “impacto” o “interés”.

Revisar los criterios de publicación de la revista y nuestras políticas del proceso de evaluación por pares en el siguiente enlace: <http://revistas.usfq.edu.ec/index.php/avances/about/editorialPolicies>

Para la organización de los artículos y comunicaciones, la revista se divide internamente en tres secciones:

Sección A: Ciencias Exactas y Físicas

Sección B: Ciencias Biológicas y Ambientales

Sección C: Ingenierías.

ACI Avances en Ciencias e Ingenierías se adhiere a los lineamientos de autoría de la ICMJE. Revisa más detalles sobre los requisitos de autoría en el siguiente enlace: <http://revistas.usfq.edu.ec/index.php/avances/about/editorialPolicies>

DIRECTRICES PARA AUTORES/AS

Por favor, revise estas directrices para preparar su manuscrito, pues todos los manuscritos enviados a la revista **ACI Avances en Ciencias e Ingenierías** deben cumplirlas. Estas directrices le ayudarán a estar seguro que su manuscrito está completo y que el proceso editorial se conducirá lo más ágil posible. Asegúrese de revisar el Enfoque y Alcance de ACI Avances en Ciencias e Ingenierías así como nuestros Criterios de Publicación, nuestras Políticas Editoriales, incluyendo las Políticas de Sección, Proceso de Evaluación por Pares, Frecuencia de Publicación, Política de Acceso Abierto, y Requisitos de Autoría en el siguiente enlace: <http://revistas.usfq.edu.ec/index.php/avances/about>

La revista ACI Avances en Ciencias e Ingenierías publica contribuciones en español e inglés, todas son sujetas a un proceso de revisión por pares, y se pueden enmarcar en una de las siguientes categorías:

Artículo: Un manuscrito que reporta conclusiones substanciales para el entendimiento de un problema, debiendo ser actualizado y exhaustivo en sus análisis y conclusiones, e incluir el conjunto completo de datos empíricos que soportan las ideas expuestas (se incluyen revisiones sistemáticas de la literatura y meta-análisis). Estos manuscritos usualmente tienen más de 2000 palabras y no hay límite máximo de palabras, figuras o tablas. Estos manuscritos deben tener divisiones con subtítulos (ver sección Organización del manuscrito).

Comunicación: Corresponde a un reporte conciso de un tema de investigación específico destinado a la presentación rápida de resultados novedosos pero de interés puntual. El tipo de información reportada es flexible, y puede incluir manuscritos que prueban nuevas metodologías, que describen observaciones de historia natural, o que presentan datos empíricos puntuales y novedosos. Estos manuscritos usualmente tienen menos de 2000 palabras y pueden incluir máximo tres tablas y tres figuras. El texto de estos manuscritos no tiene divisiones (ver sección Organización del manuscrito).

Ciertos manuscritos podrían ser reclasificados entre Artículos y Comunicaciones a discreción de los Editores de la revista y con el permiso del autor.

Revisión de Libro: Corresponde a una crítica objetiva que analiza el contenido y estilo de un libro recientemente publicado y de relevancia dentro del enfoque de la revista. Cada revisión resume, evalúa y discute el contenido del libro a la luz de las necesidades actuales de la comunidad científica. No se incluyen datos originales o sin publicar. Las revisiones son solicitadas por invitación de los Editores de la revista y tienen máximo 1500 palabras. Si está interesado en realizar una revisión o en sugerir un libro para revisión, por favor póngase en contacto con la revista: avances@usfq.edu.ec

Números especiales: La revista publicará números especiales sobre un tema específico o en honor a un académico (Festschrift). Cada número especial será coordinado por un Editor Invitado, quien trabajará junto a los Editores de la revista. Personas interesadas en liderar un número especial deben enviar su propuesta al Editor en Jefe de la revista. Todos los manuscritos aprobados del número especial serán publicados en versión digital y, dependiendo de la cantidad se imprimirán como parte del siguiente número de la revista o como un número impreso por separado.

PREPARACIÓN DEL MANUSCRITO

Formato de archivo. Para el envío inicial, los manuscritos pueden estar en cualquiera de los siguientes formatos: DOC, DOCX, RTF, o PDF.

Si utiliza Mendeley u otro paquete para sus referencias, debe transformar los campos de Mendeley en texto simple.

Se recomienda que los manuscritos que contengan ecuaciones sean producidos en LaTeX. Manuscritos producidos en LaTeX deben ser enviados en formato PDF (si el manuscrito es aceptado, se le solicitará el archivo *.TEX).

Tipo de letra. Times de 12 puntos

Los encabezados deben ir en mayúsculas y centrados (aquellos descritos en la sección Organización del manuscrito).

En caso de incluir subtítulos adicionales a los encabezados, se los colocará en negrillas y con estilo de oración (primera letra en mayúscula y el resto en minúsculas).

El resto del texto no debe tener ningún tipo de formato adicional, excepto colocar palabras en negrillas y en cursiva. No usar tabulaciones, diferentes tamaños de letra, numeración o estilos para subtítulos, etc.

Diseño de página. Alineación a la izquierda (no justificado), textos a espacio seguido, hojas tamaño A4, márgenes de 2,5 cm a cada lado.

Encabezados. Los encabezados principales se especifican en la sección Organización del manuscrito. Adicionalmente puede haber hasta dos niveles más de subtítulos.

Números de página. Todas las páginas deben estar numeradas de manera secuencial en la esquina inferior derecha.

Notas al pie. No se debe colocar notas al pie, pues toda la información debe estar en el texto principal o en las referencias.

Abreviaciones. Defina las abreviaciones en la primera vez que las usa en el texto (incl. acrónimos, acortamientos, abreviaturas, y siglas).

Mantenga al mínimo el número de abreviaciones. No utilice abreviaciones no estandarizadas al menos que las utilice más de tres veces en el texto.

Formato de referencias. Siga el estilo APA (6a edición). Revise las directrices para citas y referencias.

Ecuaciones. Manuscritos que contengan ecuaciones se recomienda sean producidos con LaTeX.

Utilizar MathType para generar y desplegar ecuaciones, caso contrario también es adecuado Equation Editor.

Numere las ecuaciones al lado derecho entre paréntesis. Por ejemplo: $\Delta t = \Delta t_1 + \Delta t_2 + \Delta t_3$ (1)

No utilice MathType o Equation Editor para colocar signos de variables, símbolos griegos, u operadores matemáticos en el texto general del manuscrito. En estos casos, inserte los símbolos como texto normal con los valores Unicode (hex) correctos.

Lenguaje. Escriba el texto y las leyendas de tablas y figuras de manera clara y sin ambigüedades, enfocado en una audiencia internacional. Siga las normas de escritura académica establecidas en el campo al cual corresponde el manuscrito.

Manuscritos en Inglés pueden usar Inglés Americano o Inglés Británico pero de manera consistente.

Manuscritos en Español deben seguir las recomendaciones de la Real Academia de la Lengua Española (con excepción del uso de tilde en "et al.>").

Medidas, fechas y hora. Use el Sistema Internacional de Unidades. Puede usar unidades específicas a la disciplina que no son SI solo cuando estas han sido ampliamente adoptadas en dicho campo científico. Coloque un espacio entre el número y el símbolo de la unidad, no coloque un punto al final del símbolo de la unidad, ejemplo: 4 km

Las fechas deben indicarse como Día Mes Año. No abrevie el mes. Ejemplo: 12 de febrero 2015, 14 January 2013

La hora debe seguir el formato de 24 horas, ejemplo: 13h00

Numeración y porcentajes. Escribir los números del 1 al 9 en palabras, a menos que sean unidades.

No incluya un espacio entre el valor y el símbolo de porcentaje, ejemplo: 45%

Coordenadas geográficas. Expresé las coordenadas geográficas en grados decimales. No reporte coordenadas en grados-minutos-segundos o en UTM. Incluya el sistema de referencia geodésico.

Use N/S para denotar latitud y E/W para denotar longitud, independiente el idioma del manuscrito.

Nomenclatura

Nombres científicos de especies se escriben en cursiva. Escriba el género y la especie de manera completa en el título del manuscrito y la primera vez que mencione al organismo en el texto, abstract, resumen, y leyendas de tablas y figuras. Así mismo, escriba el género completo cada vez que lo mencione por primera ocasión en un párrafo o cuando inicie una oración. Luego de la primera mención en el párrafo se puede abreviar género utilizando sólo la primera letra.

Genes, mutaciones, genotipos o alelos se escriben en cursiva. Utilice el nombre recomendado consultando la base de datos apropiada de nomenclatura genética. Usualmente es recomendable indicar los sinónimos para el gen la primera vez que aparece en el texto. Los prefijos de genes tales como los usados para oncogenes o la localización celular deben mostrarse en caracteres de tipo romano (e.g., v-fes, c-MYC).

Compuestos químicos deben tener un nombre sistemático correcto, siguiendo los convenios de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC). Una vez que se ha proporcionado el nombre sistemático, es aceptable definir un nombre común o un acrónimo y para esto ser utilizado para el resto del texto, tablas y figuras. Los nombres generados por ChemDraw u otro software a partir de fórmulas gráficas introducidas deben ser verificados para guiones adicionales y otras desviaciones de las convenciones de la IUPAC. Los nombres sistemáticos o genéricos deben usarse para productos comerciales en lugar de nombres patentados o de marca registrada.

Sustancias farmacéuticas deben mencionarse bajo la Denominación Común Internacional (DCI, o INN International Nonproprietary Name)

Evidencia en estudios biológicos. Si su manuscrito utiliza datos de organismos biológicos, se debe declarar explícitamente la disponibilidad de la evidencia bajo una de las siguientes opciones:

Especímenes voucher depositados en colecciones científicas abiertas al público (es necesario indicar el nombre de la colección y los números de catálogo de los especímenes).

Secuencias de aminoácidos o genes depositadas en GenBank o un repositorio equivalente (indicando el nombre del repositorio y los códigos de acceso).

Fotografías, grabaciones de audio o vídeo enviadas como parte de las figuras o como material suplementario del manuscrito.

Fotografías, grabaciones de audio o vídeo que han sido depositadas en un repositorio institucional o público (por ejemplo, Macaulay Library, o xeno-canto), para las cuales es necesario indicar el nombre del repositorio y citar el registro usando el formato de citación APA para recursos electrónicos e incluirlo en la sección de Referencias.

La colección de datos de organismos biológicos debe realizarse de acuerdo a la legislación nacional e internacional vigente. Es imprescindible que los permisos de investigación y colección otorgados por las autoridades competentes se indiquen en la sección de Agradecimientos del manuscrito.

Datos y códigos. Si su manuscrito se basa en análisis de datos sin procesar (raw data) o códigos, estos deben estar a disposición de los revisores. Por favor, envíelos por una de las siguientes vías:

- Como enlaces a un repositorio donde los datos son accesibles y citados en el manuscrito. Este repositorio puede ser institucional, comercial o de acceso abierto (por ejemplo, figshare o Dryad)
- Como archivos de Material Suplementario.

Si el manuscrito es aceptado, los datos deberán hacerse públicos de tal forma que los datos estén disponibles públicamente para todos los investigadores interesados.

Sin embargo, entendemos que pueden haber restricciones éticas y legales que prohíban la apertura de los datos, por lo que cuando exista legislación o marcos éticos locales que llamen a evitar o limitar la liberación de datos, los autores deben dejar estas limitaciones claras al momento del envío de su manuscrito (en la sección de Comentarios para el editor/a).

Posibles excepciones a la disponibilidad de datos públicos incluyen: datos que no pueden ponerse a disposición del público pues comprometería la confidencialidad o la privacidad del participante; o datos que de ponerse a disposición pública podrían presentar alguna amenaza, como revelar las ubicaciones de depósitos fósiles, especies en peligro de extinción, etc.

Si los datos sin procesar o los códigos pertenecen a terceros y Ud. no tiene permiso para publicarlos, debe presentar la fuente y la verificación del permiso de uso de los datos así como la Información de contacto donde un investigador interesado tendría que aplicar para obtener acceso a los datos pertinentes, en la sección Materiales y Métodos. Sin embargo, tenga en cuenta que los autores son responsables de asegurarse de que los datos estarán disponibles a partir de la publicación, de la misma manera que los autores obtuvieron los datos.

ORGANIZACIÓN DEL MANUSCRITO

1. La primera página del manuscrito debe incluir las siguientes partes, cada una separada por una línea:

- **Título del artículo:** En negrillas, con máximo 300 caracteres, debe ser específico, descriptivo, conciso y comprensible para los lectores fuera del campo. Sólo la primera palabra y los nombres propios empiezan con mayúsculas. Puede dividirse

en título y subtítulo, separados por el signo de puntuación dos puntos (:). Para revisiones sistemáticas o meta-análisis, el subtítulo debe incluir el diseño del estudio.

- **Título abreviado:** En negrillas, con máximo 100 caracteres, describe el tópico de estudio. Sólo la primera palabra y los nombres propios empiezan con mayúsculas.
- **Nombres de los Autores:** Presente los nombres de los autores tanto en la primera página del manuscrito como en la plataforma de la revista. Para cada autor debe incluir el primer nombre, el segundo nombre (o su inicial, si la usa) y los apellidos. Los autores se separan entre sí por comas (no colocar y, and, &).
- **Afiliaciones:** Cada autor de la lista debe tener una afiliación. La afiliación debe incluir al menos el nombre de la organización o universidad y su ubicación. Las afiliaciones se asociarán con los autores por medio de superíndices numéricos. Múltiples afiliaciones por autor se separarán en líneas diferentes y con superíndices propios. Se marcará al autor responsable del manuscrito con un asterisco junto a los superíndices, asociado con la frase "Autor para Correspondencia / Corresponding Author, e-mail:" seguido por el correo electrónico. Si todos los autores comparten la misma afiliación o si hay un solo autor no usar superíndices numéricos. Si hay un solo autor, no incluir la frase "Autor Principal / Corresponding Author"
- **Título en idioma alternativo:** Si su manuscrito es en Español, el título alternativo es la traducción en Inglés, y viceversa.
- **Abstract:** En Inglés, redactado como un párrafo continuo de máximo 400 palabras. Detalla brevemente los principales objetivos del estudio; explica cómo se realizó el estudio, incluyendo cualquier organismo modelo utilizado, pero sin entrar en detalles metodológicos; resume los resultados más importantes y su significado. No debe incluir citas bibliográficas ni abreviaciones y no debe estar separado en párrafos.
- **Key words:** Máximo 10 palabras o grupos de palabras en Inglés. Deben ser diferentes a lo que aparece en el título del manuscrito.
- **Resumen:** Es la traducción al Español del Abstract, y tiene sus mismas características.
- **Palabras clave:** Máximo 10 palabras o grupos de palabras en Español. Deben ser diferentes a lo que aparece en el título del manuscrito.
- Se puede incluir un tercer resumen en Portugués, Francés, Italiano, Alemán u otra lengua, si lo considera necesario.

2. Desde la siguiente página se presentarán el texto organizado por encabezados, luego las tablas y las figuras del manuscrito. La organización dependerá del tipo de contribución. Se sugiere usar una organización según el método científico, por ejemplo:

Organización de un manuscrito sometido como Artículo	Organización de un manuscrito sometido como Comunicación
Introducción	Texto (sin divisiones)
Materiales y métodos	Agradecimientos
Resultados	Referencias
Discusión	Contribuciones de los autores
Agradecimientos	Tablas
Referencias	Figuras
Contribuciones de los autores	
Tablas	
Figuras	

Otras secciones pueden ser: revisión de literatura, conclusiones, recomendaciones. La estructura del artículo será revisado por y evaluado el/los editor(es) y los revisores.

3. En los **Agradecimientos** se incluye:

- Declaración explícita de las fuentes de financiamiento que permitieron el desarrollo del trabajo.
- Los detalles de los permisos o autorizaciones para el desarrollo de la investigación y las instituciones que los emitieron.
- Aquellos que hayan contribuido al trabajo pero que no cumplan con los requisitos de autoría pueden ser mencionados en los Agradecimientos con una descripción de sus contribuciones.
- Los autores son responsables de asegurarse que toda persona nombrada en los agradecimientos está de acuerdo con eso.

4. La sección de **Contribuciones de los Autores** es necesaria cuando hay más de un autor. Se debe describir la contribución de cada uno de los autores para el desarrollo del artículo de manera explícita pero sucinta. La contribución puede ser:

- concepción de la investigación;
- diseño de la metodología;
- curación de datos para la investigación;
- administración del proyecto;
- adquisición, análisis o interpretación de los datos, incluyendo las labores de campo, laboratorio, experimentales, estadísticas, o el soporte técnico;
- adquisición de fondos;
- provisión de recursos, incl. equipos, materiales, reactivos, entre otros;

- desarrollo de software;
- supervisión o tutoría;
- validación y verificación de los resultados;
- redacción del manuscrito;
- revisión crítica del contenido intelectual del manuscrito;
- producción de tablas, figuras o material complementario.

Ejemplo:

María Álvarez y Pedro Pérez concibieron la investigación; Juan Norton y María Álvarez desarrollaron la metodología y realizaron el trabajo de campo; Juan Norton, Jonathan Castro y Pedro Pérez diseñaron el modelo y corrieron los análisis; Jonathan Castro y María Álvarez realizaron los análisis moleculares; Pedro Pérez proveyó reactivos; Juan Norton y Jonathan Castro redactaron el manuscrito; Juan Norton, Jonathan Castro, Pedro Pérez, María Álvarez y Pedro Pérez revisaron críticamente el contenido intelectual del manuscrito; Juan Norton tomó las fotografías de las figuras 1 y 3.

Recuerde que la autoría del manuscrito debe seguir los lineamientos de autoría de la ICMJE.

DIRECTRICES PARA REFERENCIAS

- En el texto, usar citas numeradas colocadas al final de la oración entre corchetes. Los números de citas diferentes deben separarse por comas, a menos que sea un rango continuo de citas en cuyo caso se usará un guion. Ejemplos: [10] [10,15,22] [12-20].
- Numerar las citas secuencialmente según aparecen en el texto (NO en orden alfabético de las referencias).
- Citar los trabajos sin publicar, en preparación o en proceso de revisión como "(datos sin publicar)", precedido por las iniciales y apellido del autor. Por ejemplo: A. Suárez (datos sin publicar)
- Se debe evitar las citas de información proveniente de correos electrónicos, cartas o documentos enviados entre colaboradores, pero si es absolutamente necesario, se deben referir como "com. pers." cuando corresponden a comentarios sin respaldo de correspondencia, y como "in litt." cuando hubo correspondencia escrita. En ambos casos, precedidos por las iniciales y apellido del colaborador y seguida del año. Por ejemplo: (J. Muñoz in litt. 2009) (J. Muñoz com. pers. 2010)
- Subtitular la lista de referencias como Referencias (no Bibliografía o Literatura Citada).
- Ordenar la lista de Referencias de acuerdo al orden secuencial que aparecen en el texto del manuscrito (NO en orden alfabético).
- El formato de las referencias debe seguir el estilo APA (6a Edición). Este estilo arma cada referencia con los siguientes componentes generales:
- Autores. (Año). Título de la obra. Datos de publicación.
- Ejemplos:

Artículo en revista impresa:

Andersson, L. G. (1945). Batrachians from East Ecuador, collected 1937, 1938 by Wm. Clarke-Macintyre and Rolf Blomberg. *Arkiv för Zoologi (Stockholm)*, 37A(2), 1–88.

Artículo en revista con URL:

Ahlman, R. (2016). Green-winged Teal *Anas crecca carolinensis*, first record for Ecuador. *Cotinga*, 38, 40. Recuperado de <http://www.neotropicalbirdclub.org/wpcontent/downloads/C38online/Ahlman.pdf>

Artículo en revista con DOI:

Jacobsen, D., Schultz, R., & Encalada, A. (1997). Structure and diversity of stream invertebrate assemblages: the influence of temperature with altitude and latitude. *Freshwater Biology*, 38(2), 247–261. doi: <http://www.dx.doi.org/10.1046/j.1365-2427.1997.00210.x>

Libro impreso:

Diamond, J. (2006). *The Third Chimpanzee: The evolution and future of the human animal*. New York: Harper Perennial.

Libro con URL:

Suber, P. (2102). *Open Access. The MIT Press Essential Knowledge Series*. Cambridge: The MIT Press. Recuperado de <http://bit.ly/oa-book>

Libro con editores con DOI:

Walsh, S. J., & Mena, C. F. (Eds.). (2012). *Science and conservation in the Galapagos Islands: frameworks & perspectives*. Vol. 1. New York: Springer Science & Business Media. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-5794-7>

Capítulo de un libro impreso:

Minogue, K. (2014). Does the idea of "self-interest" explain the character of modern free societies? En P. Lucio Paredes & S. Oleas (Eds.), *The Complexity of Liberty: Selected essays from the Mont Pelerin Society Special Meeting in Galápagos*

June 2013. Quito: Universidad San Francisco de Quito.

Capítulo de un libro con DOI:

Maldonado, M., Maldonado-Ocampo, J. A., Ortega, H., Encalada, A. C., Carvajal-Vallejos, F. M., Rivadeneira, J. F., Acosta, F., Jacobsen, D., Crespo, A. & Rivera-Rondón, C. A. (2011). Biodiversity in aquatic systems of the Tropical Andes. En S. K. Herzog, R. Martinez, P. M. Jorgensen, & H. Tiessen (Eds.), *Climate change and biodiversity in the tropical Andes* (pp. 276–294). Paris/São José dos Campos: Inter-American Institute for Global Change Research (IAI) and Scientific Committee on Problems of the Environment (SCOPE). Recuperado de <http://www.iai.int/wp-content/uploads/2014/06/book.pdf>

Disertación:

Brandt, M. (2003). Influencia del erizo lapicero (*Eucidaris thoursii*) en la estructura de la comunidad submarina de la cara norte del Isote Caamaño, Galápagos (Tesis de Licenciatura). Universidad San Francisco de Quito USFQ, Quito.

Enciclopedia en línea (cita global de toda la enciclopedia):

Frost, D. R. (2016). *Amphibian Species of the World: an Online Reference (Version 6.0)*. American Museum of Natural History. Recuperado el 5 de febrero de 2017 de <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>

Ficha en enciclopedia en línea con URL:

Frost, D. R. (2016) *Nymphargus buenaventura* (Cisneros-Heredia and Yáñez-Muñoz, 2007). En *Amphibian Species of the World: an Online Reference (Version 6.0)*. American Museum of Natural History. Recuperado el 5 de febrero de 2017 de <https://web.archive.org/web/20170206001235/http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/Amphibia/Anura/Centrolenidae/Centroleninae/Nymphargus/Nymphargus-buenaventura>

Noticia en periódico en línea:

En el limbo futuro de telescopio en Arecibo (2017, enero 30). *El Universo*. Recuperado de <https://web.archive.org/web/20170206002227/http://www.eluniverso.com/vida-estilo/2017/01/30/nota/6023449/limbo-futuro-telescopio-arecibo>

- Separar cada autor con una coma, y colocar “&” antes del último autor. Las iniciales de los nombres de los autores van después de los apellidos. Indicar todos los autores y no usar et al.
- Incluir el número de la revista entre paréntesis luego del volumen, si está disponible.
- Separar el rango de páginas por un guion n (–). No confundir esto con un guion simple (-).
- Colocar el DOI (Digital Object Identifier) en todas las referencias que lo tengan disponible, precedido por “doi:”. El DOI debe estar en formato de enlace largo: <http://doi.org/xxx.xxx.xxx>
- No colocar un punto después del DOI .
- Si un DOI no está disponible (debe hacer una búsqueda exhaustiva), colocar un enlace estable hacia el sitio web de la revista (por ejemplo, el enlace estable de JSTOR) o un repositorio institucional (por ejemplo, Archive.org), con el texto “Recuperado de”. No colocar enlaces a páginas web personales, servicios no-permanentes de carga/descarga de archivos.
- Para incluir la dirección de Internet o URL de una página que podría cambiar en el futuro debe primero respaldar dicho URL en un archivo digital que resguarden dicha referencia para el futuro. Para esto puede usar Wayback Machine de Internet Archive <https://archive.org/web/> o el sistema archive.is <http://archive.is>. Esto debe ser hecho en particular para páginas que provienen de enciclopedias en línea, periódico de noticias, páginas personales o institucionales.
- Cuando se hace referencia a publicaciones en línea que tienen fechas específicas (como los blogs), se debe colocar (Año, Mes día) y no solo el año.
- Colocar Anónimo cuando no exista un autor determinado.
- Colocar n/f cuando no se conozca el año de publicación.
- Citar manuscritos aceptados para publicación como “in press” solamente si ya tiene la información de publicación del artículo (número de la revista y páginas). Artículos que no tengan esta información son considerados aceptados, pero no en prensa y serán citados como “datos en proceso de publicación” dentro del texto, pero no se incluirán en las Referencias Bibliográficas.
- No se aceptará literatura gris entre las referencias bibliográficas. La literatura gris corresponde a documentos que no están disponible por canales bibliográficos regulares (como bibliotecas o bases de datos en línea), y usualmente corresponde a reportes técnicos, informes y otros trabajos sin publicar. De ser en extremo necesario, su uso será autorizado por el Editor del manuscrito. Sin embargo, es preferible considerar la opción de colocar esa información como “datos sin publicar” o “comunicación personal”. De ser aprobada su inclusión como referencia, una copia del documento de literatura gris debe ser depositada en la Biblioteca de la USFQ.

DIRECTRICES PARA TABLAS

- Citar tablas en el texto con numerales arábigos en el orden que aparecen. Ejemplos: “Tabla 1” “Tablas 1–3”
- Colocar las tablas luego del texto, cada una iniciará en su propia página.
- Las tablas deben alcanzar en una hoja A4 con márgenes de 2,5 cm, pudiendo esta orientarse de manera vertical y horizontal, según sea mejor para la apariencia de la tabla.

- Cada tabla debe tener su propia leyenda explicativa, la cual debe ser comprensible sin hacer referencia al texto y será colocada antes de la tabla. Cada leyenda empezará con el número de la tabla. Ejemplo:

TABLA 1. Comparación de los efectos...

- Incluir unidades en los encabezados de columnas y filas entre paréntesis.
- De ser necesarias, colocar notas al pie de la tabla enlazadas con los siguientes símbolos en el mismo orden: *, †, ‡, §, ¶. Sin embargo, es preferible colocar cualquier aspecto importante como parte de la leyenda.

DIRECTRICES PARA FIGURAS

- Avances en Ciencias e Ingenierías publica sin costo figuras a color, siempre y cuando se relacionen directamente con el manuscrito.
- El término Figura hace referencia a todo tipo de imágenes, incluyendo gráficos, dibujos, fotografías y mapas.
- Citar figuras en el texto con numerales arábigos en el orden que aparecen usando la abreviatura "Fig". Ejemplo: "Figs. 1–3"
- En el envío inicial, las figuras deben ir en baja resolución, siempre que sean legibles, e incluidas en el archivo de texto del manuscrito, luego de las tablas. Sin embargo, una vez aceptado el manuscrito, las figuras deben ser enviadas en resolución alta (mínimo 300 dpi, recomendable 600 dpi) en uno de los siguientes formatos: *.tiff, *.eps, *.emf, *.bmp, como documentos separados del archivo de texto.

- Cada figura irá en su propia página y precedida por su leyenda. La leyenda será autoexplicativa, debiendo ser comprensible sin hacer referencia al texto y será colocada antes de la figura. Cada leyenda empezará con el número de la figura. Ejemplo:

FIGURA 1. Mapa de la región...

- Figuras dibujadas con líneas (line artwork) se preparan mejor en programas gráficos basados en vectores (e.g. Corel Draw, Illustrator, Freehand, Inkscape, ArcView). Por lo que es recomendable presentarlas en formato EPS. No use líneas de un ancho menor a 0.3 puntos.
- Las fotografías en blanco y negro, fotografías a color y mapas y gráficos realizados en programas basados en raster (e.g. Photoshop, Gimp) es recomendable que sean enviadas en formato *.tiff. Para archivos *.tiff, note que la resolución es irrelevante, es importante el tamaño en pixeles, por lo que recomendamos un tamaño mínimo de 1000 pixeles.
- Todo manuscrito que incluya un sitio de estudio debe incluir un mapa del mismo. Dicha figura debe: (1) ir rodeada de un borde con líneas delgadas, (2) estar geográficamente referenciado con algunas marcas de latitud y longitud y con un pequeño mapa insertado que indique la localización general, (3) tener una barra de escala en km, (4) tener una flecha que indique el Norte (no usar una rosa de los vientos), y (5) tener líneas de referencia como límites de países, carreteras, ríos o elevaciones, extendiéndose hasta el borde.
- Para todas las figuras use líneas con un grosor entre 0.3-1.0 puntos y tamaños de letra de 12 puntos.
- Todas las letras y textos usados dentro de las figuras deben ir en Times.
- Si es que desea agregar varias imágenes como una sola figura compuesta o crear una lámina con varias imágenes que ocupe toda una página, no se preocupe por el diseño de la misma. En el primer envío del manuscrito no debe armar dicha figura, sino que debe colocar la leyenda de la figura y luego pegar cada imagen separada. Cada imagen debe tener su propia denominación a través de literales en mayúsculas (ej. A) colocados en la esquina inferior derecha de cada imagen. Cuando el manuscrito avance en el proceso de publicación, el equipo de diseño de la revista se ocupará de armar y diseñar sus imágenes compuestas o láminas.
- Recuerde que las figuras serán ajustadas al tamaño de una o dos columnas en una página A4, por lo que todos los elementos de la imagen deben ser lo suficientemente grandes para ser legibles después de la reducción de tamaño, en especial los textos internos y las líneas.
- Eliminar espacios blancos o vacíos innecesarios alrededor de las figuras.
- Incluir los créditos respectivos de la figura en la leyenda. Recuerde que es responsabilidad del autor tener los permisos necesarios para poder reproducir la figura bajo la Licencia Creative Commons de la revista.
- Si usa un mapa como una figura, debe citar la fuente del mapa. De ser posible, use mapas que sean de uso público o que permitan su uso irrestricto. Si usa Google Earth o Google Maps, debe seguir los lineamientos de atribución de Google.

DIRECTRICES PARA MATERIAL SUPLEMENTARIO

- Los autores pueden publicar material suplementario junto a su manuscrito. Este material corresponde a información que complementa o provee soporte al manuscrito publicado y que se podrá descargar como archivos independientes.
- Diferentes tipos de información pueden ser incluidos como material suplementario: textos extensos sobre metodologías, bases de datos, archivos de vídeo, de audio, fotográficos y otros respaldos audiovisuales, entre otros.
- Los Materiales Suplementarios reemplazan a los Apéndices.

- Estos materiales serán citados al final del manuscrito con enlaces al portal de la revista donde estarán a disposición del público de manera gratuita.
- Si el material suplementario está compuesto por texto, debe ser presentado con el mismo formato general requerido para el manuscrito.
- De ser necesario, citar archivos de Material Suplementario en el texto siguiente el siguiente formato: Fig. S1, Tabla S1, Datos S1, Vídeos S1, Artículo S1, Audio S1. Donde la S indica que es material suplementario, y el número indica la secuencia numérica de dicho material.
- Para maximizar compatibilidad, sugerimos que envíe su Material Suplementario en los siguientes formatos: Imágenes en JPG, EPS o PNG; tablas en XLS o XLSX; textos en PDF; vídeos en AVI, MOV o MP4, y archivos de audio en WAV o MP3.
- Sets grandes de datos suplementarios se pueden presentar en formato comprimido (zip o tar).

DIRECTRICES SOBRE NOMENCLATURA BIOLÓGICA Y DESCRIPCIÓN DE NUEVAS ESPECIES

- ACI Avances en Ciencias e Ingenierías cumple con los requisitos establecidos por los diferentes códigos de nomenclatura sobre la validez para la descripción de nuevas especies y la disponibilidad de los artículos en línea como trabajos publicados, incluyendo el International Code of Zoological Nomenclature y el International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants.
- La revista se encargará de obtener los registros y el GUID (LSID) en Zoobank, IPNI y Mycobanl o Index Fungorum.
- Todos los artículos y comunicaciones de ACI Avances en Ciencias e Ingenierías están siendo depositados en Internet Archive Archive.org y en el repositorio USFQ.
- Los autores deben adherirse a los lineamientos establecidos por los códigos internacionales de nomenclatura respectiva al organismo tratado.
- Las descripciones de especies nuevas de seres vivos o los análisis taxonómicos deben seguir lo establecido en el respectivo código de nomenclatura.
- Cuando un taxón biológico es mencionado por primera vez, se debe escribir su nombre común (como nombre propio) seguido por su nombre científico en cursiva, por ejemplo: Oso de Anteojos *Tremarctos ornatus*. No colocar el nombre científico o el nombre común entre paréntesis. Más adelante en el manuscrito se puede usar solamente el nombre científico o el nombre común.
- Si el manuscrito corresponde a un análisis taxonómico o si existe controversia en relación a la nomenclatura del organismo estudiado, presentar el nombre del taxón seguido por los datos de autoría taxonómica al mencionarlo por primera vez. Los datos de autoría taxonómica de nombres zoológicos son los apellidos de los descriptores y el año de descripción, separados por una coma, ejemplo: *Grallaria ridgelyi* Krabbe et al., 1999. La autoría taxonómica de nombres botánicos debe seguir lo especificado en The International Plant Names Index. Colocar la autoría taxonómica entre paréntesis solo si existió un cambio a nivel del género. Cuando hay tres o más descriptores utilizar "et al." sin cursivas.

ENVÍO DEL MANUSCRITO

1. Todos los manuscritos sometidos a la revista ACI Avances en Ciencias e Ingenierías deben ser enviados a través del portal en línea. En la sección Envíos en Línea podrán registrarse y crear un Nuevo Envío.
2. Si manuscrito tiene más de un autor, por favor incluya la información de todos los autores en el sistema (incluyendo sus correos electrónicos).
3. Al momento de someter su manuscrito, debe indicar el nombre, institución y correo electrónico de por lo menos cuatro posibles revisores que podrían hacer la evaluación de pares académicos de su manuscrito. Estas personas deben ser capaces de proveer una evaluación objetiva de su manuscrito, por lo que no pueden pertenecer a la institución de ninguno de los autores, ni estar involucrados en el estudio de manera directa o indirecta. El equipo editorial de la revista se reserva el derecho de seleccionar a los revisores sugeridos al momento del envío del manuscrito o de buscar a otros revisores.
4. Para el envío inicial, el manuscrito debe consistir de un solo archivo que incluya: el texto, las tablas y figuras. Las tablas y las figuras deben ir luego del texto (no intercaladas en el texto). Cada tabla y figura irá en su propia página y estará precedida por su leyenda. En caso de enviar Material Suplementario, deberá ser enviado como archivos separados y subidos al momento del envío inicial.
5. Si es que algunas de las figuras de su manuscrito es una figura compuesta por varias imágenes, no debe armar dicha figura sino que debe colocar la leyenda de la figura y luego pegar cada imagen separada. Cada imagen debe tener su propia denominación a través de literales en mayúsculas (ej. 5A) colocados en la esquina inferior derecha de cada imagen.
6. La revista mantendrá comunicación directa con el autor para correspondencia, quien es el responsable de someter el manuscrito, recibir las revisiones, enviar el manuscrito revisado, aprobar la corrección de originales y las pruebas de imprenta.

LISTA DE COMPROBACIÓN PARA LA PREPARACIÓN DE ENVÍOS

Como parte del proceso de envío, los autores/as están obligados a comprobar que su envío cumpla todos los elementos que se muestran a continuación. Se devolverán a los autores/as aquellos envíos que no cumplan estas directrices.

- El estudio presenta los resultados de investigación científica primaria.
- El envío no ha sido publicado previamente ni se ha sometido a consideración en otra publicación.

NOTA: ACI Avances en Ciencias e Ingenierías apoya a los autores que desean compartir su trabajo de manera temprana a través de archivos/repositorios de prepublicaciones (preprint servers/repositorios), incluyendo arXiv, bioRxiv, figshare, PeerJ Preprints, SSRN, Zenodo, entre otros. De igual forma consideramos manuscritos que han salido únicamente como tesis en repositorios institucionales o trabajos que han sido presentados en actas de conferencias.

- Todas las metodologías de análisis, tanto experimentales, estadísticas y otras, se han realizado bajo estándares técnicos de alta calidad y se describen en suficiente detalle para garantizar su reproducibilidad.
- Todas las conclusiones se pasan en la interpretación justificada y apropiada de los resultados. Los autores deben evitar exagerar el alcance de sus conclusiones y si bien pueden discutir el posible impacto de sus resultados deben identificar sus ideas como hipótesis y no como conclusiones.
- Los textos están escritos de una manera entendible y clara, teniendo un correcto uso del lenguaje. Los manuscritos aceptados por la revista ACI Avances en Ciencias e Ingenierías pasan por una corrección del lenguaje y estilo, sin embargo errores en el uso del lenguaje pueden nublar el correcto entendimiento del contenido y provocar evaluaciones negativas por parte los revisores.
- El estudio debe cumplir con todos los estándares aplicables de ética en la experimentación e integridad científica. Todos los estudios relacionados con seres vivos, líneas celulares, muestreo de campo o que tengan potenciales implicaciones de bioseguridad deben contar con las aprobaciones de un comité de ética institucional / IRB, así como con todos los permisos legales requeridos por el país donde se realiza la investigación.
- El manuscrito sigue estándares utilizados por la comunidad de su disciplina científica y garantiza la disponibilidad de los datos. La disponibilidad de los datos se puede realizar colocándolos como material suplementario del manuscrito o depositándolos en repositorios digitales confiables.
- Todos los autores han participado en el desarrollo del manuscrito, lo han leído y están de acuerdo con su envío a la revista ACI Avances en Ciencias e Ingenierías, y de ser aceptado, están de acuerdo que sea publicado según a la *Política de Acceso Abierto* de la revista.
- Todos los autores cumplen con los requisitos de autoría detallados en la *Política de Autoría*.
- El envío inicial del manuscrito consiste de un solo archivo, que incluye: el texto, las tablas y figuras en el mismo archivo. Las tablas y las figuras van luego del texto (no intercalarlas con el texto). Cada tabla y figura está en su propia página y está precedida por su leyenda. En caso de enviar Material Suplementario, se lo envía como archivos separados.
- Si es que hay figuras compuesta por varias imágenes, se colocó la leyenda de la figura y luego se pegó cada imagen separada. Cada imagen tiene su propia denominación a través de literales en mayúsculas (ej. A) colocados en la esquina inferior derecha de cada imagen.
- Siempre que sea posible, se proporcionan DOI o direcciones URL estables para las referencias.

AVISO DE DERECHOS DE AUTOR/A

Los autores que publiquen en la revista ACI Avances en Ciencias e Ingenierías aceptan los siguientes términos:

- Los autores conservarán sus derechos de autor y garantizarán a la revista el derecho de primera publicación de su obra, la cual estará simultáneamente sujeto a la *Licencia de reconocimiento de Creative Commons* que permite a terceros compartir la obra siempre que se indique su autor y su primera publicación esta revista.
- Los autores podrán adoptar otros acuerdos de licencia no exclusiva de distribución de la versión de la obra publicada, pudiendo de esa forma publicarla en un volumen monográfico o reproducirla de otras formas, siempre que se indique la publicación inicial en esta revista.
- Se permite y se recomienda a los autores difundir su obra a través de Internet.
- Antes del envío a la revista, los autores pueden depositar el manuscrito en archivos/repositorios de pre-publicaciones (preprint servers/repositorios), incluyendo arXiv, bioRxiv, figshare, PeerJ Preprints, SSRN, entre otros, lo cual puede producir intercambios interesantes y aumentar las citas de la obra publicada (Véase *El efecto del acceso abierto*).
- Después del envío, se recomienda que los autores depositen su artículo en su repositorio institucional, página web personal, o red social científica (como Zenodo, ResearchGate o Academia.edu).

DECLARACIÓN DE PRIVACIDAD

Los nombres y las direcciones de correo electrónico introducidos en esta revista se usarán exclusivamente para los fines establecidos en ella y no se proporcionarán a terceros o para su uso con otros fines.

aci
avances
en ciencias e
ingenierías

