

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE AGROSILVO PASTORIL
ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



TESIS

**“EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA INDUCIDA
POR RADIACIÓN GAMMA EN SEMILLAS DE SACHA INCHI
(*Plukenetia volubilis* L.)”**

PRESENTADO POR EL BACHILLER:

JEAN´S MARLON PEZO NAJAR

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGRÓNOMO

TARAPOTO - PERÚ

2014

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN -TARAPOTO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



TESIS

**“EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA INDUCIDA POR
RADIACIÓN GAMMA EN SEMILLAS DE SACHA INCHI
(*Plukenetia volubilis* L.)”**

PRESENTADO POR EL BACHILLER:

JEAN'S MARLON PEZO NAJAR

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGRÓNOMO

TARAPOTO – PERÚ

2014

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN -TARAPOTO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA

AREA DE MEJORAMIENTO Y PROTECCIÓN DE CULTIVOS

TESIS

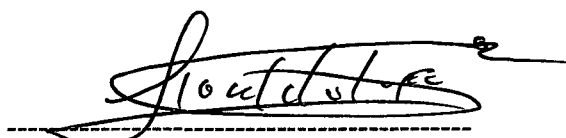
**“EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA INDUCIDA POR
RADIACIÓN GAMMA EN SEMILLAS DE SACHA INCHI
(*Plukenetia volubilis* L.)”**

PRESENTADO POR EL BACHILLER:

JEAN'S MARLON PEZO NAJAR



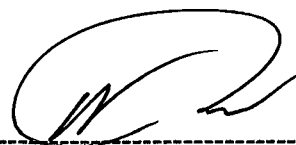
Ing. María Emilia Ruiz Sánchez
PRESIDENTE



Ing. Roaldo López Fulca
SECRETARIO



Ing. Marvin Barrera Lozano
MIEMBRO



Dr. Winston Franz Ríos Ruiz
ASESOR

TARAPOTO – PERÚ
2014

DEDICATORIA

No existe palabra que pueda expresar el más sincero y puro agradecimiento que siento por mi familia: Mis padres porque en su vida diaria sembraron en mi los valores del amor de Dios, pero en especial a mi madre Milagro de Jesús Najjar Vargas, por el esfuerzo sobrehumano que hiciste para pagar mis estudios académicos y así regalarme una carrera profesional para mi vida, por ser un ejemplo de admiración, superación y coraje frente a las circunstancias difíciles que pasaste en tu vida y por los años de duras luchas que dedicaste para terminar mis estudios; y a mi querida hermana Alexandra Pezo Najjar con quien compartí y comparto todos los triunfos que logramos en nuestra vida personal frente a los obstáculos que se presentan, ambos son mis más grandes motivos de superación, los amo mucho, siempre estarán en mi corazón.

Bach. JEAN'S MARLON PEZO NAJJAR

AGRADECIMIENTO

- A Dios por prestarme la salud y vida para lograr culminar con éxito la carrera profesional y el trabajo de Tesis.
- Al Blgo. Reynaldo Solís Leyva, con mucha estima, respeto y consideración que mediante el Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana – IIAP SM, me brindó la oportunidad de realizar el proyecto de tesis y canalizó la gestión para el financiamiento del mismo, además por brindarme su espíritu de confianza e incondicional asesoramiento y experiencias en los momentos críticos durante la realización del trabajo.
- Al Ing. Joel Flores, que hizo todo lo posible y dedicó su tiempo en brindarnos las herramientas moleculares necesarios en el Instituto de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria la Molina para finalizar el trabajo.
- A todos mis amigos y profesionales que de una y otra forma contribuyeron y fueron parte muy importante en el soporte técnico y científico para el desarrollo del trabajo de investigación.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	OBJETIVOS	3
	2.1. General	3
	2.2. Específicos	3
III.	REVISIÓN DE LITERATURA	4
	3.1. Generalidades	4
	3.2. Clasificación botánica	5
	3.3. Cultivo	6
	3.4. Importancia del cultivo	11
	3.5. Descripción de accesión mishquiyacu	12
	3.6. Mejoramiento genético de plantas	14
	3.7. Antecedentes de Mejoramiento Genético en Sacha Inchi	14
	3.8. Variabilidad genética	15
	3.9. Uso de ADN en estudios genéticos	16
	3.10. Mutación	17
	3.11. Inducción de mutaciones	19
	3.12. Objetivos de la inducción de mutaciones	24
	3.13. Las radiaciones ionizantes en plantas	25
	3.14. Efecto de las radiaciones	26
	3.15. Radiación gamma	29

3.16.	Unidad de dosis de radiación	30
3.17.	Dosis de radiación	30
3.18.	Factores a considerar al trabajar con radiaciones	31
3.19.	Técnica de marcadores moleculares	32
3.20.	Extracción de ADN	33
3.21.	Protocolo de extracción de ADN	34
3.22.	Cuantificación de ADN	36
3.23.	Marcadores moleculares y su importancia	37
3.24.	Marcadores AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism- Longitud de Fragmentos Polimórficos de DNA Amplificados)	40
3.25.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	43
3.26.	Análisis molecular del DNA	44
IV.	MATERIALES Y METODOLOGÍA	46
4.1.	Materiales	46
4.2.	Metodología	46
4.3.	Componentes de estudio	52
4.4.	Diseño experimental	66
4.5.	Análisis de varianza	69

V.	RESULTADOS	70
5.1.	Características de los estados fenológicos	70
5.2.	Características biométricas (Vegetativas)	75
5.3.	Análisis molecular mediante marcadores AFLP	79
VI.	DISCUSIONES	85
6.1.	Características de los estados fenológicos	85
6.2.	Características biométricas (Vegetativas)	93
6.3.	Análisis molecular	99
VII.	CONCLUSIONES	101
VIII.	RECOMENDACIONES	103
IX.	BIBLIOGRAFÍA	104
X.	RESUMEN	115
XI.	SUMMARY	117
	ANEXOS	119

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 01: Dosimetría e irradiación de semillas	49
Cuadro 02: Pares de iniciadores (Primer) seleccionados para realizar la caracterización del Sacha Inchi.	59
Cuadro 03: Reacción de digestión de DNA genómico (Mezcla A)	60
Cuadro 04: Reacción de Ligación de Adaptadores (Mezcla B)	60
Cuadro 05: (Mezcla C)	61
Cuadro 06: (Mezcla D)	62
Cuadro 07: (Mezcla E)	63
Cuadro 08: Descripción de los tratamientos	66
Cuadro 09: Esquema del análisis de varianza	69
Cuadro 10: Análisis de varianza para el porcentaje de germinación en semillas de sachá Inchi irradiadas con rayos gamma	70
Cuadro 11: Análisis de varianza para el porcentaje de emergencia en semillas de sachá Inchi irradiadas con rayos gamma	71
Cuadro 12: Análisis de varianza para el porcentaje de sobrevivencia en semillas de sachá Inchi irradiadas con rayos gamma	72
Cuadro 13: Análisis de varianza para el porcentaje de mortalidad en semillas de sachá Inchi irradiadas con rayos gamma	73
Cuadro 14: Análisis de varianza para la dosis letal media (DL50) en semillas de sachá Inchi irradiadas con rayos gamma	74

Cuadro 15: Análisis de varianza para la altura de plantas (cm) de sacha inchi generadas de semillas irradiadas con rayos gamma	75
Cuadro 16: Análisis de varianza para el diámetro de tallo (mm) en plantas de sachá inchi generadas de semillas irradiadas con rayos gamma	76
Cuadro 17: Análisis de varianza para el número de hojas en plantas de sacha inchi generadas de semillas irradiadas con rayos gamma	77
Cuadro 18: Análisis de varianza para la longitud de raíces (cm) en plantas de sachá inchi generadas de semillas irradiadas con rayos gamma	78
Cuadro 19: Posibles características mutagénicas encontradas en plantas de sacha inchi	119

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01: Esquema representativo del mejoramiento vegetal reportado por Novak y Brunner (1992)	21
Figura 02: Extracción de ADN modificado por (Camarena et al., 2008) de Doyle y Doyle (1990)	36
Figura 03: Cuantificación de ADN (Camarena et al., 2008)	37
Figura 04: Principio de la técnica de AFLP (Camarena et al., 2008)	43
Figura 05: Muestra de tratamientos en estudio	49
Figura 06: Componentes del sustrato	50
Figura 07: Llenado del sustrato	50
Figura 08: Siembra de semillas	51
Figura 09: Disposición de los tratamientos	52
Figura 10: Formas de semillas germinadas	53
Figura 11: Semilla emergida	54
Figura 12: Medición de altura	55
Figura 13: Medición de diámetro	55
Figura 14: Medición de longitud de raíz	56
Figura 15: Pellet o DNA de sachá Inchi extraído	58
Figura 16: Prueba de Duncan ($p < 0,05$) para el porcentaje de germinación en semillas de sachá Inchi irradiadas con rayos gamma	70
Figura 17: Prueba de Duncan ($p < 0,05$) para el porcentaje de emergencia en semillas de sachá Inchi irradiadas con rayos gamma	71

Figura 18: Prueba de Duncan ($p < 0,05$) para el porcentaje de sobrevivencia en semillas de sachá Inchi irradiadas con rayos gamma	72
Figura 19: Prueba de Duncan ($p < 0,05$) para el porcentaje de mortalidad en semillas de sachá Inchi irradiadas con rayos gamma	73
Figura 20: Prueba de Duncan ($p < 0,05$) para la dosis letal media (DL50) en semillas de sachá Inchi irradiadas con rayos gamma	74
Figura 21: Prueba de Duncan ($p < 0,05$) para la altura de plantas de sachá inchi generadas de semillas irradiadas con rayos gamma	75
Figura 22: Prueba de Duncan ($p < 0,05$) para el diámetro de tallo en plantas de sachá inchi generadas de semillas irradiadas con rayos gamma	76
Figura 23: Prueba de Duncan ($p < 0,05$) para el número de hojas en plantas de sachá inchi generadas de semillas irradiadas con rayos gamma	77
Figura 24: Prueba de Duncan ($p < 0,05$) para la longitud de raíces en plantas de sachá inchi generadas de semillas irradiadas con rayos gamma	78
Figura 25: Calidad de ADN extraído de los 52 individuos de sachá inchi. (M: Peso Molecular del fago lambda)	79
Figura 26: Perfil de amplificación de 40 muestras de sachá inchi con la combinación de iniciadores E38/M49	80
Figura 27: Perfil de amplificación de 40 muestras de sachá inchi con la combinación de iniciadores E33/M40	81
Figura 28: Perfil de amplificación de 40 muestras de Sachá inchi con la combinación de Iniciadores E13/59	82

Figura 29: Perfil de amplificación de 40 muestras de Sacha inchi con la combinación de iniciadores E45/M61	83
Figura 30: Dendograma que agrupa las 40 muestras de Sacha inchi	84
Figura 31: Efectos morfológicos en plantas generadas por las radiaciones	120

I. INTRODUCCIÓN

El Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.), es una especie de la familia Euphorbiaceae que comúnmente se conoce como “maní del monte”, “sacha maní” o “maní del inca” (Manco, 2006), crece desde los 100 m.s.n.m hasta los 2040 m.s.n.m, y desde años ancestrales se ha utilizado como alimento en las poblaciones rurales, nativas y mestizas (Valles, 1995).

Constituye un cultivo con futuras posibilidades de industrialización y con potencial de rendimiento económico para los agricultores de la Región San Martín, por ser una fuente importante de omega 3, 6, y 9 ya que posee almendras con mayor concentración de ácidos grasos esenciales que ninguna otra especie conocida en el mundo. Pero su aprovechamiento comercial es aún incipiente, debido a la alta variabilidad genética que determina una alta heterogeneidad en el rendimiento y contenido de omegas, lo que vuelve insostenible su producción.

Dada la importancia potencial de este cultivo, el Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP-SAN MARTIN), continúa ejecutando investigaciones básicas en manejo agronómico, mejoramiento genético, manejo integrado de plagas, enfermedades y procesos industriales, como parte del proceso de domesticación, mediante técnicas modernas y convencionales a fin de seleccionar los materiales genéticos que presenten tolerancia al complejo Nemátodo-Hongo con buenos rendimientos y altos contenidos de aceites, de manera que se puedan obtener genotipos superiores con cualidades estandarizadas.

Es esta la razón por el cual se busca mejorar genéticamente el cultivo de sachá Inchi mediante la técnica nuclear basada en la utilización de radiación gamma; ya que es una alternativa para generar variabilidad genética por la vía de mutaciones inducidas. Esta técnica es muy empleada hoy en día con bastante frecuencia porque permite la obtención de genotipos superiores en corto tiempo de cultivares en muchas especies que son propagados por semillas. Sin embargo, su utilización debe estar precedida de ensayos que permitan determinar la dosimetría adecuada, así como familiarizar al mejorador sobre el efecto que las radiaciones tienen sobre el material vegetal utilizado (Singh, 1994). Es por eso que diversas investigaciones con radiación gamma en cultivos de arroz, trigo, cebada, piñón y otros, determinaron el rango de las dosis que se emplearon en el presente trabajo.

La finalidad del estudio fue evaluar la variabilidad genética inducida en semillas de Sachá Inchi generada con radiación gamma; en donde se consideraron variables morfológicas y marcadores moleculares AFLP (Longitud de fragmento polimórfico amplificado), debido a que esta técnica es más reproducible y genera mayores fragmentos de bandas polimórficas en un solo gel. Los resultados buscan sentar las bases científicas para futuros programas de mejoramiento genético.

II. OBJETIVOS

2.1. General

- Evaluar la variabilidad genética inducida por las radiaciones gamma en semillas de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.), accesión Mishquiyacu en condiciones de vivero en Morales-San Martín.

2.2. Específicos

- Determinar los efectos fenológicos y morfológicos de las plantas sobrevivientes en la fase de vivero.
- Determinar la dosis letal media (DL50), de radiación gamma en semillas de Sacha Inchi.
- Evaluar la variabilidad genética inducida empleando marcadores moleculares AFLP.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Generalidades

La familia Euphorbiaceae comprende plantas anuales, de importancia ornamental, medicinal, alimentaria e industrial, que se caracterizan principalmente por la presencia de una sustancia lechosa, tipo látex y frutos tricapsulares. Abarca alrededor de 1280 géneros con 8000 especies aproximadamente, y se observa que está distribuido en todo el orbe (Bailey, 1949).

El género *Plukenetia* ha sido reportado en Malasia, Nueva Guinea, México, etc. (Biblioteca Conmemorativa Orton, 1987). Comprende 17 especies de distribución pantropical, 12 en América, 03 en África, 01 en Madagascar y 01 en Asia (Gillespie, 1993). En América del Sur, la presencia de *Plukenetia volubilis* L., ha sido registrada en la Amazonía Peruana, Bolivia y las Indias Occidentales (Macbride, 1951).

En el Perú se le encuentra en estado silvestre en diversos lugares de San Martín, Ucayali, Huánuco, Cuzco, Amazonas, Loreto y Madre de Dios. En San Martín se encuentra en toda la cuenca del Huallaga, en la provincia de Lamas, en el Valle de Sisa, en Alto Mayo y Bajo Mayo. Crece desde los 100 hasta los 2000 m.s.n.m.m.

Es un arbusto trepador o rastrero silvestre y cultivado que se le encuentra en bordes de bosques secundarios, en cañaverales, sobre cercos vivos y como

malezas en platanales y cultivos perennes. Fue cultivado también en la costa peruana en la época prehispánica y se han encontrado semillas y representaciones en cerámicas (Brack, 1999). También Soukup (1987), indica que las hojas son comestibles y que la semilla es muy nutritiva.

3.2. Clasificación botánica

La clasificación botánica (ITIS, 2014) de la planta es la siguiente:

Reino	: PLANTAE
Sub reino	: VIRIDAEPLANTAE
División	: TRACHEOPHYTA
Sub división	: SPERMATOPHYTINA
Infra división	: ANGIOSPERMAE
Clase	: MAGNOLIOPSIDA
Subclase	: ARCHICHLAMYDEAE
Súper orden	: ROSANAE
Orden	: MALPIGHIALES
Familia	: EUPHORBIACEAE
Género	: <i>Plukenetia</i>
Especie	: <i>Volubilis</i> Linneo.
Nombre científico	: <i>Plukenetia volubilis</i> L.
Nombre común	: Sacha Inchi, Maní del Monte

3.3. Cultivo

3.3.1. Morfología

- **Planta:** Trepadora, voluble, semileñosa, de altura indeterminada (Manco 2004).
- **Hojas:** Son alternas, de color verde oscuro, oval - elípticas, aseruladas y pinnitinervias, de 9 a 16 cm de largo y de 6 a 10 cm de ancho. El ápice es puntiagudo y la base es plana o semi-arriñonada (Arévalo, 1995).
- **Flores:** Cachique (2006), indica que el cultivo presenta un alto porcentaje de polinización cruzada, lo cual implica que se trata de una especie alógama. El conocimiento del tipo de reproducción es de suma importancia para futuros trabajos de mejoramiento genético de la especie. En Sacha Inchi se observan 2 tipos de flores:

Masculinas: Son pequeñas, blanquecinas, dispuestas en racimos.

Femeninas: Se encuentran en la base del racimo y ubicadas lateralmente de una a dos flores.

- **Fruto:** Es una cápsula, de 3,5 a 4,5 cm de diámetro, con 04 lóbulos aristados (tetra lobados) dentro de los cuales se encuentran 4 semillas. Excepcionalmente, algunos ecotipos presentan cápsulas con 5 a 7 lóbulos (Manco, 2004).
- **Semilla:** Dentro de las capsulas se encuentran las semillas de color marrón oscuro, ovals de 1.5 a 2.1 cm de diámetro, ligeramente abultadas en centro y aplastadas hacia los bordes, al abrirlas encontramos cotiledones a manera de almendras y cubiertas de una película blanquecina. En condiciones de medio

ambiente y al aire libre, la semilla se conserva por más de 1 año (SUDIRGEB-INIEA, 2006; Vela, 1995)

3.3.2. Ecología

El crecimiento, desarrollo y la buena producción del sachá inchi están estrechamente relacionados con las condiciones medioambientales de la zona donde se cultiva. Es por ello que los factores ecológicos influyen en la producción. Cuando se define un clima apropiado para el cultivo de sachá inchi generalmente se hace referencia a la temperatura y la precipitación, considerados como los factores críticos del crecimiento. Así mismo, el viento, la radiación solar y la humedad relativa afectan muchos procesos fisiológicos de la planta (Porras, 2005).

- **Temperatura:** Crece y tiene buen comportamiento a diversas temperaturas que caracterizan a la Amazonía Peruana (mín. 10°C y máx. 36°C). Las temperaturas muy altas son desfavorables y ocasionan la caída de flores y frutos pequeños, principalmente los recién formados (Arévalo, 1995).
- **Altitud:** Crece desde los 100 m.s.n.m. en la Selva Baja y 1500 m.s.n.m. en la Selva Alta (Arévalo, 1995).

Desde los 100 a 2040 m.s.n.m. (Manco, 2004)

- **Luz:** A bajas intensidades de luz, la planta necesita de mayor número de días para completar su ciclo vegetativo; cuando la sombra es muy intensa la floración disminuye y por lo tanto la producción es menor (Manco, 2004).

- **Precipitación:** El sachá inchi es una planta de rápido crecimiento, requiere de disponibilidad permanente de agua. Para tener un crecimiento sostenido se cultiva en zonas donde la precipitación se encuentra por encima de los 1200 mm, llegando en algunos casos hasta los 3600 mm; pero más importante que el volumen total de lluvias es una buena distribución del agua durante el año, ya que el sachá inchi es muy sensible a la falta de humedad en el suelo, La influencia de la lluvia es notoria en la polinización y fertilización. (Arévalo, 1995). El riego es indispensable en los meses secos. Períodos relativamente prolongados de sequía o de baja temperatura, causan un crecimiento lento y dificultoso. El exceso de agua ocasiona daño a las plantas e incrementa los daños por enfermedades (Manco, 2004).
- **Suelo:** De acuerdo a su distribución el cultivo del "sachá inchi", tiene un amplio margen de adaptación a diferentes tipos de suelo. Es una planta agronómicamente rústica de poca exigencia nutricional, crece en suelos ácidos y con alta concentración de aluminio. Prospera en "shapumbales" (*Pteridium aquilinum*) secos y húmedos y en "Cashucshales" (*Imperata brasiliensis*) (Valles, 1995).
- **Drenaje:** Necesita terrenos con drenaje adecuado, que eliminen el exceso de agua tanto a nivel superficial como profundo. Para un buen drenaje se debe considerar la textura del suelo, y ésta es importante para el desarrollo del cultivo. La poca absorción de agua y nutrientes por la planta, así como el crecimiento anormal y superficial de las raíces, hacen que éstas se tornen más

vulnerables al ataque de nemátodos y enfermedades radiculares (Arévalo, 1995).

3.3.3. Características fisiológicas del cultivo

- **Crecimiento vegetativo**

El sachá inchi es una planta trepadora, de abundantes hojas y ramas, alcanza la altura de la planta soporte, por lo tanto no es recomendable que ésta tenga una altura mayor de 2 metros para facilitar la cosecha. Si existe una suficiente humedad, la germinación se inicia aproximadamente a las dos semanas de realizada la siembra. Una semana después, aparece la segunda hoja verdadera y el tallo guía (Arévalo, 1995).

- **En almácigo:**

- Días a germinación: 11 a 14 d.d.a.
- Días a emergencia de hojas verdaderas:
- 1er. par: Entre 16 y 20 d.d.a.
- 2do.par: Entre 28 y 42 d.d.a.

- **Fructificación**

La floración se inicia aproximadamente a los 3 meses, luego de realizado el trasplante, apareciendo primero los primordios florales masculinos e inmediatamente después los femeninos. En un período de 7 a 19 días, las flores masculinas y femeninas completan su diferenciación floral (Arévalo, 1995).

A continuación, se inicia la formación de frutos completando su desarrollo a los 4 meses después de la floración. Luego se inicia la maduración propiamente dicha de los frutos, cuando éstos, de color verde empiezan a tornarse de un color negruzco, que finalmente se convierte en marrón oscuro o negro cenizo; indicador que está listo para la cosecha. Este proceso de maduración del fruto dura aproximadamente de unos 15 a 20 días, iniciándose la cosecha a los 7.5 meses después de la siembra y/o trasplante, con una producción continua.

3.3.4. Condiciones generales que debe cumplir una buena semilla

Según Vargas (2008), tomado por Córdova (1976), la energía germinativa está determinada por la rapidez y la uniformidad de la germinación de la semilla. Es importante tener en cuenta que la semilla tiene una germinación rápida y al mismo tiempo que el mayor número de ellas lo hagan en el menor tiempo posible. La rapidez es muy importante porque se realiza una mejor explotación de semillas germinadas, casi al mismo tiempo. Numéricamente se dice que la semilla tiene una buena energía germinativa, cuando las dos terceras partes

(2/3) de las semillas germinan en un tercio (1/3) del total de los días que dura la germinación.

Los días se cuentan a partir de la fecha en que germina la primera semilla y se da por terminado cuando dos días seguidos no germinan más semillas. Para evitar confusiones y facilitar las contadas, es conveniente eliminar cada día las semillas germinadas.

3.4. Importancia del cultivo en el país y la región.

Cornejo y Valles (1991), mencionan que en nuestro país el cultivo de sacha inchi se ha observado en las localidades de Madre de Dios, Huánuco, Oxapampa, Requena, Yurimaguas, Masisea, Alto y Bajo Mayo.

Arévalo (1996), informó que ha observado crecer al cultivo de sacha inchi en suelos ácidos y en aluviales de la Región San Martín, además agregó que los nativos lo consumen tostado, cocido con sal y como ingrediente de diversos platos típicos.

El sacha inchi tiene aptitud agronómica e industrial a favor de la población de la Selva alta y baja y conlleva a la posibilidad de usarlo en reforestación para su incorporación a la producción agrícola en suelos erosionados. Estimaciones técnicas de pruebas industriales indican la factibilidad de extraer una tonelada de aceite/ha/año que se incrementa a través del tiempo y una tonelada de torta/ha/año.

Hazen y Stodwesand en Cornell (USA) y Uelos en Florida (USA), encontraron que la almendra de Sacha Inchi contiene porcentajes de grasa y proteína ligeramente superiores a los cultivos de Soya, Maní, Girasol y Algodón.

3.5. Descripción de Accesoión Mishquiyacu (*Plukenetia volubilis* L.)

El rendimiento en grano seco (kg/ha) desde el primer año de producción, carácter que está influenciado por el factor genético, condiciones edafoclimáticas propias de las zonas como un manejo agronómico homogéneo muestra que la Accesoión Mishquiyacu destaca con el mayor peso de semillas (2025,26 kg/ha) superando a todos las accesiones, con relación a la respuesta al complejo Nematodo-Hongo muestra una susceptibilidad ALTA pero con altos porcentaje de aceite en una proporción de 20,12 % de aceite y en rendimiento de 407,482 kg/Ha y finalmente para los contenidos de ácidos grasos esenciales indica un porcentaje medio alto en función a todas las accesiones existentes pero a nivel de San Martín supera a todas las accesiones (Manco 2006 y Arévalo 1996). En conclusión la Accesoión Mishquiyacu resulta ser uno de los mejores en material genético para trabajos de mejoramiento en nuestra región debido a sus características y bondades fisiológicas.

3.5.1. Ficha técnica (*Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana*)

Procedencia

Material silvestre colectado en el departamento de San Martín, provincia de Lamas y Distrito de Pinto Recodo.

Características destacadas de la accesión

Hábito de crecimiento: Trepador.

Diámetro de cápsula: 4,50 cm

Diámetro de semilla: 1,91 cm.

% de cáscara: 43,56.

% de semilla: 56,44.

Peso de 100 semillas: 104,85 g.

Nº de Cosechas/Año: 24

Susceptibilidad a *Meloidogyne incognita*: Alta

Susceptibilidad al stress hídrico: Medianamente tolerante

Rendimiento al 1º año (kg/Ha/año): 2,025.26

% de Aceite tipo omegas:

% de Omega 3: 41.12

% de Omega 6: 39.55

% de Omega 9: 10.85

3.6. Mejoramiento genético de plantas

En los programas de mejoramiento de especies de interés agrícola es necesario contar con una amplia base genética que garantice suficiente variabilidad para tener probabilidades de seleccionar los genotipos. Esencialmente este programa consiste en tres fases: generación de la variabilidad genética, selección de genotipos, y evaluación de los genotipos seleccionados con caracteres agronómicos ideales. Adicionalmente, se requiere un sistema que involucre herramientas complementarias al sistema de mejora convencional, buscando el aprovechamiento adecuado de la variabilidad genética que se cuenta. En este grupo de herramientas se encuentran el cultivo de tejidos in vitro, la inducción de mutaciones y la transformación genética (Novak y Brunner, 1992).

3.7. Antecedentes de Mejoramiento Genético en Sacha Inchi

Desde el año 1988 el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) en la Estación Experimental Agraria “El Porvenir” – Juan Guerra; la Subdirección de Recursos Genéticos y Biotecnología, inicia las investigaciones relacionadas al cultivo del sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.), con la colección, conservación y evaluación de 06 entradas. Incrementándose a un número de 48 ecotipos, colectados a nivel de toda la amazonia del Perú; Así mismo hasta el 2006 ya se contaba con la identificación de ecotipos promisorios por el elevado contenido

de aceites (Manco, 2007), y con el estudio de la biología floral y reproductiva (Cachique, 2006).

A partir de estos resultados el IIAP y el INIA con financiamiento independiente de INCAGRO 2007, inician los trabajos de mejoramiento genético en la obtención de líneas mejoradas y/o elites enfocadas a la obtención de la generación S0, S1, S2, S3 mediante polinización controlada (IIAP) y a la obtención de plantas tolerantes a nematodo del nudo (INIA). Así mismo a partir del 2008 el Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP) con el financiamiento de INCAGRO 2008, inicia la investigaciones en la línea de mejoramiento genético desarrollando metodologías de propagación clonal (estacas, injertos e *in vitro*) con la finalidad de garantizar la transferencia genética y crear tolerancia y/o resistencia a nematodo del nudo (*Meloidogyne incognita*). Además se realizaron estudios de caracterización genética molecular y la caracterización química de ácidos grasos presentes en las semillas.

3.8. Variabilidad Genética

La variabilidad genética, conocida también como recursos genéticos, se refiere a la variación hereditaria dentro y entre poblaciones de organismos, cuya base está en los cromosomas (ADN) y puede ser manipulada por la tecnología tradicional y moderna (biotecnología, ingeniería genética, etc.).

Variabilidad genética del sachá inchi

El sachá inchi representa un cultivo promisorio de gran importancia en la amazonia peruana sus semillas contienen elevadas concentraciones de ácidos grasos esenciales tipo 3, 6 y 9 (Hamaker *et al.*, 1992). Se ha observado que esta especie presenta una amplia variabilidad tanto en su morfología, como en su capacidad de producción por planta y contenidos de aceite (Valles, 1990; Rodríguez *et al.*, 2010).

3.9. Uso de ADN en estudios genéticos

El ácido desoxirribonucleico (ADN), es la molécula de la herencia en todos los organismos, por ser la fuente de reserva de la información genética, ocupando una posición central en macromoléculas biológicas (Stryer, 1988). Cada molécula de (ADN) presenta una doble hélice formada a partir de dos hebras complementarias de nucleótidos, emparejadas mediante enlaces de hidrógeno entre los pares de bases G-C y A-T. El ADN es una combinación única de nucleótidos para cada individuo, por lo tanto sirve para poder diferenciar a los individuos, poblaciones, así como también a las especies. En la actualidad es posible conocer el contenido genético (ADN) de cualquier especie mediante el uso de técnicas moleculares (Phillips y Mora, 1998).

3.10. Mutación

Ocasionalmente pueden llegar a producirse errores en la replicación del ADN, estos cambios son denominados mutaciones. Una *mutación* es un cambio estable y heredable en el material genético. Las mutaciones alteran la secuencia del ADN y por tanto introducen nuevas variantes. Muchas de éstas variantes pueden ser eliminadas, pero ocasionalmente algunas de éstas variantes pueden tener éxito e incorporarse en todos los individuos de la especie. La mutación es un factor que aumenta la diversidad genética

La definición que dio De Vries (1901) de la *mutación* era la de cualquier cambio heredable en el material hereditario que no se puede explicar mediante segregación o recombinación.

Una alta tasa de mutación implica un mayor potencial de adaptación en el caso de un cambio ambiental, pues permite explorar más variantes genéticas, aumentando la probabilidad de obtener la variante adecuada necesaria para adaptarse al ambiente. A su vez, una alta tasa de mutación aumenta el número de mutaciones perjudiciales o deletéreas de los individuos, haciéndolos menos adaptados, y aumentando la probabilidad de extinción de la especie. Las mutaciones no tienen ninguna dirección respecto a la adaptación, son como un cambio al azar. Este cambio puede producir una falta de significado, y por eso la mayoría de las mutaciones son deletéreas. Pero a veces, ciertos cambios pueden introducir nuevos significados, permitiendo nuevas funciones.

3.10.1. Mutación somática y mutación en la línea germinal

3.10.1.1. Mutación somática

De Robertis *et al.*, (2001), afecta a las células somáticas del individuo. Como consecuencia aparecen individuos *mosaico* que poseen dos líneas celulares diferentes con distinto genotipo. Una vez que una célula sufre una mutación, todas las células que derivan de ella por divisiones mitóticas heredarán la mutación (herencia celular). Un individuo mosaico originado por una mutación somática posee un grupo de células con un genotipo diferente al resto, cuanto antes se haya dado la mutación en el desarrollo del individuo mayor será la proporción de células con distinto genotipo. Las mutaciones que afectan solamente a las células de la línea somática no se transmiten a la siguiente generación.

3.10.1.2. Mutaciones en la línea germinal

De Robertis *et al.*, (2001), Afectan a las células productoras de gametos apareciendo gametos con mutaciones. Estas mutaciones se transmiten a la siguiente generación y tienen una mayor importancia.

3.10.2. Niveles mutacionales

De Robertis *et al.*, (2001), propone la clasificación de las mutaciones basada en la cantidad de material hereditario afectado por la mutación:

Mutación génica: mutación que afecta a un solo gen. Las mutaciones génicas más comunes consisten en la sustitución de un nucleótido por otro, en la pérdida (delección) de uno o varios nucleótidos, o la inserción (intercalación) de uno o varios nucleótidos en la molécula del ADN. Cualquiera que sea el tipo de mutación, genera un cambio en la información contenida en el gen.

Mutación cromosómica: mutación que afecta a un segmento cromosómico que incluye varios genes. Puede dar origen a cambios cromosómicos estructurales.

Mutación genómica: mutación que afecta a cromosomas completos (por exceso o por defecto) o a juegos cromosómicos completos. Puede dar origen a cambios cromosómicos numéricos.

3.11. Inducción de mutaciones

Las mutaciones inducidas en especies vegetales son procedimientos utilizados desde hace más de ochenta años, que emplea la radiación para reorganizar la composición genética sin modificar el genoma de las plantas que permitan aumentar y mejorar su rendimiento (Novak y Brunner, 1992). En plantas

alógamas, como el sachá inchi la inducción de mutaciones se realiza para incrementar la variabilidad genética.

Muchos cultivares mutantes de plantas propagadas por semilla, son de alto rendimiento. En China, cultivares exitosos basados en mutantes se siembran en millones de hectáreas (FAO/IAEA 1991). En Checoslovaquia, casi toda la cebada maltera es producida sobre la base de cultivares obtenidos por mutaciones. (FAO/IAEA 1991). En el Perú se ha reportado la obtención de mutantes de cebada precoces, con altura reducida, mayor número de granos y granos desnudos (Chávez, 1991), y la liberación de una variedad mutante: UNA La Molina 95 (Romero y Gómez, 1996).

El método de mejoramiento genético mediante mutaciones inducidas se basa en el principio de que se puede aumentar la proporción de mutaciones exponiendo plantas o semillas a las radiaciones. Si bajo condiciones naturales ocurren mutaciones útiles, puede suponerse que también se pueden producir mutaciones favorables en forma experimental e inducida. Para tal caso las semillas son el material favorito y apropiado para la irradiación ya que en muchos experimentos de inducción de mutaciones y en el mejoramiento práctico se obtuvo buenos resultados como en algunas oleaginosas y cereales (AIEA, 1995).

La Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA) ha recogido en un banco de datos, junto con la organización de Naciones Unidas para la alimentación y

la agricultura (FAO), informaciones sobre más de 3.000 mutaciones en diferentes especies, por ejemplo en Kenia, a través de esta técnica se ha desarrollado una variante de trigo resistente a la sequía y en Vietnam, los expertos han conseguido modificar de esta manera varias especies de arroz para su adaptación a altas tasas de salinidad en el delta del Mekong (Novak y Brunner, 1992). Así como también se han reportado cambios por efecto de mutaciones en caracteres, como contenido de aceite en girasol y soya; composición de ácidos grasos del aceite de lino, soya y canola o colza.

En el mejoramiento mediante inducción de mutaciones se utilizan básicamente dos tipos de agentes mutagénicos.

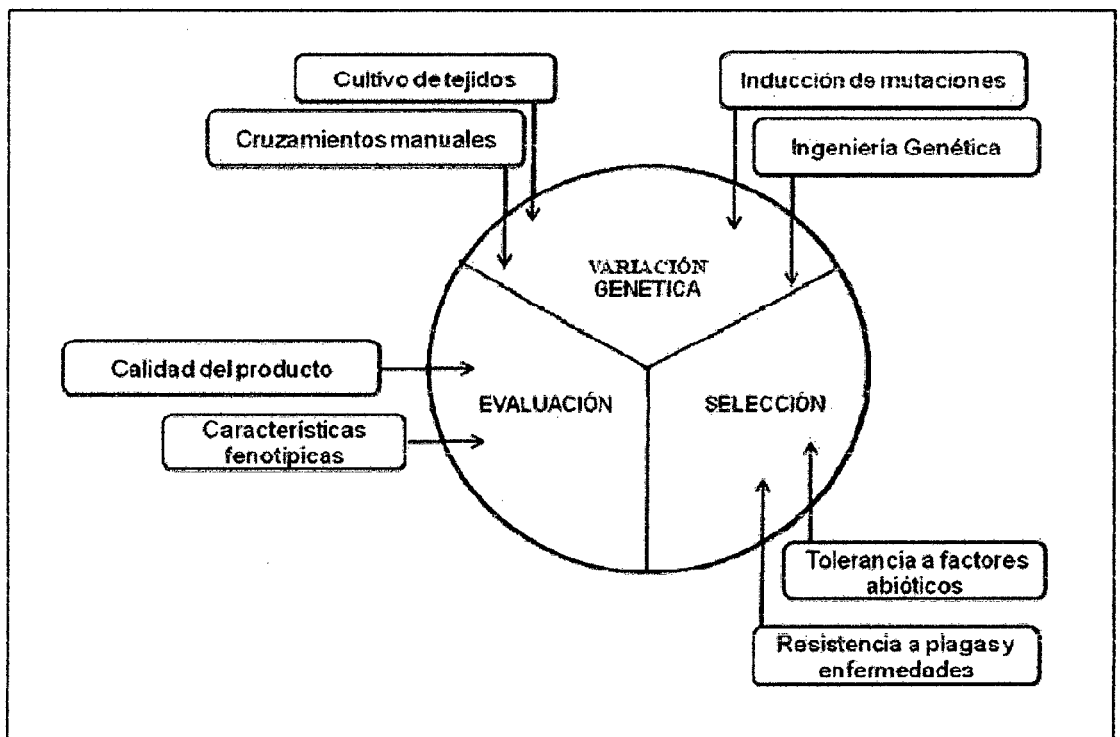


Figura 01. Esquema representativo del mejoramiento vegetal reportado por Novak y Brunner (1992).

3.11.1. Mutágenos químicos

Novak y Brunner (1992), indica la clasificación de productos químicos que son mutagénicos según su modo de acción en:

- *Análogos de bases*: Debido a su similitud estructural los análogos de bases como el 5-Bromouracilo o la 2-Aminopurina se incorporan en el ADN que se replica en lugar de las bases correspondientes timina y adenina. Cuando uno de estos análogos de bases se incorpora en el ADN, la replicación puede ocurrir normalmente aunque ocasionalmente, ocurren errores de lectura que resultan en la incorporación de bases erróneas en la copia de ADN.
- *Agentes que reaccionan con el ADN*: Existen una serie de agentes químicos que reaccionan directamente sobre el ADN que no se está replicando ocasionando cambios químicos en las bases, lo que provoca un apareamiento incorrecto.
- *Acido nitroso (HNO₂)*: Deamina a adenina a hipoxantina y la citosina a uracilo. Debido a las distintas propiedades de apareamiento de los productos de deaminación, se producen transiciones.
- *Hidroxilamina (NH₂OH)*: Reacciona con la citosina donde el grupo amino es reemplazado por un grupo hidroxilamino. Este derivado de la citosina se aparea con adenina produciéndose transiciones GC--> AT.
- *Agentes alquilantes*: Otro grupo de productos químicos que afectan al ADN que no se replica son los agentes alquilantes, que incluyen el etil metano sulfonato (EMS), metil metano sulfonato (MMS), dietil sulfato (DES), diepoxi butano

(DEB), Nmetil- N-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), N-metil-N-nitroso urea y gas mostaza.

- *Agentes intercalantes*: Un grupo interesante de sustancias, acridinas y bromuro de etidio, son moléculas planas que se insertan entre dos pares de bases del ADN, separándolas entre sí. Durante la replicación, esta conformación anormal puede conducir a microinserciones o microdelecciones en el ADN.

3.11.2. Radiación mutagénica o mutación física

En los últimos años existe la tendencia a incrementar el uso de las radiaciones sobre los Mutágenos químicos. Novak y Brunner (1992) menciona que los principales tipos de radiación son los siguientes:

- a) *Rayos X*.
- b) *Radiación Gamma*: Cesio 137 y Cobalto 60 las principales fuentes de rayos Gamma utilizados en trabajos de radiobiología. El Cesio137 es usado en muchas instalaciones teniendo en cuenta que tiene una vida media más larga que el Cobalto 60.
- c) *Radiación Ultravioleta*: Tiene limitada habilidad de penetración en los tejidos por lo que su uso en experimentos biológicos está restringido al tratamiento de esporas o granos de polen.
- d) *Radiación Beta*: Las partículas Beta (electrones) como de ^{32}P y ^{35}S producen un efecto similar a aquellos rayos X o Gamma, pero con más baja habilidad de penetración.

- e) *Neutrones*: Tienen un amplio rango de energía y son obtenidos de la fisión nuclear en un reactor nuclear con ^{235}U . Los neutrones han mostrado ser muy efectivos en la inducción de mutaciones en plantas.
- f) *Partículas de aceleradores*: Protones, deuterones, partículas alfa. Se ha utilizado básicamente para estudios fundamentales en la determinación de los efectos radiobiológicos.

3.12. Objetivos de la inducción de mutaciones

Novak y Brunner (1992), dentro del programa de mejoramiento utilizando la inducción de mutaciones, la primera etapa es la determinación de la dosis adecuada, es decir el estudio del efecto del mutagénicos que permita determinar la dosis que cause mayor probabilidad de obtener cambios genéticos responsables de caracteres deseados.

Un programa de mejoramiento por inducción de mutaciones exitoso debe tener claramente definidos los objetivos con relación a los tipos de mutantes buscados. Los principales objetivos que se deben ser los siguientes:

1. Mejorar una o pocas características de una variedad o línea.
2. Inducir un marcador morfológico (color, aristas, etc.) para establecer la identidad de una línea promisorio para su registro como variedad.
3. Inducir esterilidad masculina o restaurar la fertilidad en líneas para la producción de híbridos.

4. Obtener dentro de genotipos bien adaptados mutantes para características de herencia simple útiles para el mejoramiento o para inducir mutaciones posteriormente.

Cuando agentes mutagénicos físicos o químicos son aplicados a material de propagación sexual o asexual, se observa una relación directa entre la dosis y la tasa de mutación, pero también es notable una relación similar entre la dosis y el daño celular. Esta relación varía con el genotipo. Tomando esto en consideración, la dosis ideal sería aquella que ocasione una alta tasa de mutaciones recuperables y un bajo daño a los tejidos. Generalmente se utilizan dosis por debajo del nivel LD; (Brunner, 1986).

3.13. Las radiaciones ionizantes en plantas

Producen efectos de estimulación y mutagénesis en el material biológico. Körösi y Pal (1987), entre otros autores, han comprobado que éstas actúan en diferentes procesos fisiológicos, como la germinación, el crecimiento y el desarrollo de las plantas, acelerándolos o retardándolos y con ello el nivel de absorción de energía, la composición química del material vegetal y el tipo de energía, entre otros factores físico-químico-biológicos. Cuando el material vivo es sometido a bajas dosis de radiaciones ionizantes, esto provoca un estímulo en algunos índices fisiológicos (Labrada y Pérez, 1983; Körösi y Pal, 1989), y muchos autores recomiendan la altura de las plantas como el índice que mejor muestra este efecto.

Los efectos posirradiativos, como producto del estudio de la radiosensibilidad, son una de las vías para determinar la dosis que ejerce un mayor estímulo en la altura de las plantas. En las especies arbóreas de interés para la ganadería estos estudios tienen gran importancia, ya que el crecimiento en sus primeros estadios es lento y esto retarda, en general, la explotación de los sistemas silvopastoriles.

Los rayos gamma por ser un tipo de radiación ionizante, tienen una alta capacidad de penetración y su acción letal en las células se mide usualmente como pérdida de la actividad mitótica (Ahnström, 1995).

3.14. Efectos de las radiaciones

3.14.1. Efecto sobre el ADN

(Lodish *et al.*, 2004). La acción directa de las radiaciones ionizantes sobre la materia viva comprende las ionizaciones y excitaciones que las partículas ionizantes provocan directamente sobre los blancos, o estructuras vitales de la célula. Una macromolécula ionizada modificará su actividad química, perdiendo o alterando su funcionalidad específica. Cuando sea excitada podrá volver a su estado original emitiendo fotones o rompiendo enlaces covalentes, lo cual puede suponer un daño biológico. Lógicamente, la gravedad del daño producido dependerá de la relevancia biológica de la célula afectada. En este sentido, el blanco más importante de la célula es el ADN, molécula que contiene la

información biológica esencial para el correcto funcionamiento de la célula. Además de la molécula de ADN, otros componentes celulares pueden ser dañados con importantes consecuencias para la célula.

3.14.2. Efecto sobre las células

Swanson (1958), dice que las radiaciones pueden producir tres tipos de efectos sobre las células:

Efecto de tipo fisiológico: producen alteraciones químicas de ciertas moléculas que afectan el funcionamiento normal de la célula, llegando en ocasiones hasta causar la muerte de ellas. Esto tiene repercusión sobre la síntesis de ADN y se puede alterar mucho la mitosis, produciéndose el aglutamiento de los cromosomas, aunque éstos no se rompan.

Efecto de tipo mutacional: se aplica a la teoría del blanco, se predicen mutaciones de punto sin que sean capaces de producir la ruptura del cromosoma.

Efecto del tipo cromosómico: en este tipo de efecto ya se llega a la ruptura del cromosoma, la cual puede afectar al cromosoma completo, o a una cromatida.

Borén (1998), manifiesta que para fines prácticos, los daños fisiológicos más importantes son el retardo del crecimiento y la muerte.

3.14.3. En el crecimiento de las plantas

Las influencias externas como radiaciones, calor y ciertas sustancias, pueden determinar cambios específicos en el material genético o mutaciones. Las diversas combinaciones del material genético heredadas de los progenitores unidos a las mutaciones, permiten garantizar que cada uno de los individuos que integran una población sencilla, presentará ligeras diferencias. Esta variación en el contenido genético constituye la materia prima de la evolución (Sutton y Harmon, 1971).

Las radiaciones producen alteraciones de tipo estructural, fenotípico y de comportamientos en células, tejidos, órganos y plantas completos. Estas mutaciones permiten ampliar la variabilidad genética y facilitan la selección de plantas con características mejoradas, las cuales pueden favorecer su desarrollo debido a que los patrones de crecimiento y productividad de las plantas pueden ser fácilmente modificadas por agentes mutagénicos (Raghava y Raghava, 1989).

Diferentes dosis de rayos X, rayos gamma y partículas beta, inducen modificaciones en el crecimiento y desarrollo de las raíces, tallos, hojas y flores en plantas superiores. Las dosis requeridas dependen de la especie usada o variedad usada, de su edad, condiciones fisiológicas y de la radiosensitividad. La respuesta de una partícula puede ser la muerte, inhibición del crecimiento, anomalías morfológicas o proliferación celular. Exposiciones agudas y crónicas han mostrado que las plantas son comúnmente impedidas en su

crecimiento como un resultado de la irradiación, aunque no totalmente por todas las dosis empleadas. En general el desarrollo es inversamente proporcional a las dosis empleadas, dependiendo de la habilidad de la planta para desarrollar inhibición (Broertjes, 1972 y Elliot, 1964).

Las diferentes especies vegetales y sus genotipos reaccionan en forma distinta a algunas dosis de radiación. Dosis estimulantes en un genotipo, pueden no estimular en la misma medida en otros genotipos. Es más un genotipo puede tener solamente una dosis estimulante, y otro genotipo dos o más dosis estimulantes. Así mismo además de las dosis estimulantes, hay ciertas dosis de efecto negativo.

3.15. Radiación Gamma

La luz que se observa es solo una pequeña parte del espectro electromagnético que consiste de energía en la forma de una variedad de longitudes de onda. A medida que la longitud de onda se hace más corta, la energía que contiene, se hace más fuerte y más penetrante.

En general los rayos gamma tienen una longitud de onda más corta y por lo tanto poseen más energía por fotón que los rayos X. La ventaja de los rayos gamma, es que pueden ser usadas esencialmente para exposiciones ligeras (agudas) o semiligeras. Sin embargo, el origen de la radiación gamma tiene diferentes ventajas en lo que se refiere a los tratamientos prolongados, de tal manera que las plantas pueden ser colocadas en un invernadero o en el campo.

Las principales fuentes de rayos gamma son del Cobalto ⁶⁰ y Cesio ¹³⁷, que se utilizan en trabajos radio biológicos.

3.16. Unidad de dosis de radiación

En el sistema internacional de medidas el gray (Gy) es la que representa la energía proporcionada por la radiación ionizante a una masa de materia que equivale a un joule por kilogramo (j.kg^{-1}). Antes se reportaba la radiación en rads o kilorads (kr). Un gray corresponde a 100 rads (Piñan 1999).

3.17. Dosis de irradiación.

La estimación de la dosis más apropiada a aplicar, medida en Gy (Gray), equivalente a 1 J.Kg^{-1} , o bien a 100 rads. Es un procedimiento basado en la radiosensibilidad del tejido, la cual es estimada a través de la respuesta fisiológica del material irradiado. Se debe determinar la dosis que causa un 50% de reducción del crecimiento vegetativo del material tratado (DL50) cuando es comparado al testigo en el primer ciclo vegetativo después del tratamiento (Predieri y Zimmerman, 2001).

La radiosensibilidad varía con la especie y la variedad, con la condición fisiológica de la planta y órganos y con la manipulación del material irradiado antes y después del tratamiento mutagénico. Correlaciones entre el estado fisiológico de las plantas y su radiosensibilidad son, a menudo, determinadas por el contenido de agua del tejido (Predieri y Zimmerman, 2001).

3.18. Factores a considerar al trabajar con radiaciones

- Escoger los explantes adecuados, en la mayoría de los casos es preferible usar semillas, también se pueden usar diferentes propágulos.
- Después del tratamiento es importante dar al material las mejores condiciones posibles para su desarrollo y crecimiento.
- El tiempo de tratamiento es muy variado, dependiendo de los objetivos, es necesario considerar la estructura anatómica de las plantas y el estado de desarrollo de los primordios que van a ser tratados.
- Dosis y dosimetría, la determinación y aplicación de dosis convenientes son de suma importancia y variará de acuerdo al genotipo de la planta en estudio.
- El tamaño de los cromosomas y todo lo relacionado al volumen nuclear, es también un factor importante, plantas con cromosomas grandes son más sensibles que los que poseen cromosomas pequeños (Nybon y Koch, 1965).

Erhemberg (1959) y Milán (1966), dicen que es importante destacar que la eficiencia de las radiaciones están influenciadas por el contenido de agua en las semillas, el genotipo de éstas, la temperatura durante la germinación, la edad de los tejidos, el estado de la división celular, el número y tamaño de los cromosomas, el tipo de radiación y la presencia o ausencia de ciertos productos químicos.

Brauer (1969), de manera general, se considera que si las dosis aplicadas no tienen cierta letalidad sobre las plantas, su efecto es despreciable y prácticamente no podrían reconocerse los mutantes que pudieran aparecer.

3.19. Técnicas de marcadores moleculares

Diversas técnicas de biología molecular están disponibles para la detección de variabilidad a nivel de secuencias de DNA (polimorfismo genético). El uso efectivo de marcadores moleculares aunados a las prácticas tradicionales, permitirá logros y avances significativos en las estrategias de fitomejoramiento, selección vegetal, genética cuantitativa, así como en estudios de la diversidad genética (Camarena *et al.*, 2008).

3.19.1. Procedimientos generales en el uso de Marcadores Moleculares

1. Extracción de DNA
2. Generación de polimorfismo
 - Enzimas de restricción
 - Reacción PCR
 - Combinación de los 2 anteriores (enzimas de restricción y PCR)
3. Electroforesis (horizontal, y/o vertical)
4. Detección de los fragmentos
 - Sondas marcadas
 - Bromuro de etidio, UV

- Quimiluminiscencia
 - Tinción en plata
5. Autoradiografía y/o fotografía
 6. Evaluación de los fragmentos
 7. Análisis estadístico

3.20. Extracción de ADN

El aislamiento de moléculas como el DNA que se encuentra dentro de las células, puede realizarse a través de diferentes métodos, los cuales deben tomar en cuenta la fragilidad de dicha molécula y además de las diferentes barreras que se deben de vencer para poder aislarlo de los demás componentes celulares tales como orgánelos, sustancias polipeptídicas, carbohidratos, etc. que son característicos para cada especie vegetal. El método que generalmente se utiliza implica el uso de la fuerza mecánica, variaciones térmicas y fuerzas de gravedad, todos estos combinados con detergentes, solventes orgánicos y sustancias químicas dan como resultado final el aislamiento del DNA (Camarena *et al.*, 2008).

El uso de sustancias químicas tales como el (CTAB) sirve para poder disolver las membranas polipeptídicas que son las que forman compartimentos dentro de las células de tal manera que el ADN pueda ser liberado de su interior. Sustancias como el EDTA y PVP sirven para inactivar (quelar) las enzimas conocidas como DNAasas que se encuentran en gran número dentro de la

célula y que pueden degradar el DNA. Sustancias tales como el TRIS son tampones (buffers) que sirven para mantener regulado el pH del medio en el que se encuentra el DNA. Sales como el NaCl permiten la precipitación de carbohidratos, el acetato de amonio y de sodio permiten la captación de algunos iones contaminantes que rodeen a la molécula. Una combinación de solventes orgánicos como cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) permiten la separación y precipitación de proteínas. El uso de alcoholes tales como etanol absoluto o isopropanol permiten la precipitación del DNA librándolo de la solución de solventes además de librarlo de sales y otras impurezas (Camarena *et al.*, 2008).

3.21. Protocolo de extracción de ADN

Doyle y Doyle, 1990, indica que el protocolo de extracción de ADN es la siguiente:

1. Pulverizar con nitrógeno líquido el tejido foliar colectado de preferencia de hojas jóvenes aproximadamente 200 mg.
2. En un tubo eppendorf de 1,5 ml colocar material vegetal pulverizado hasta la marca de 500 μ l y resuspender con 700 μ l de buffer CTAB (2X), Adicionando 2 μ l de β mercaptoetanol. Agitar suavemente e incubar por 30 minutos a 65 °C.
3. Retirar de la incubadora y dejar reposar por espacio de 2 minutos a temperatura ambiente.

4. Agregar 700 µl cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) mezclar suavemente el tubo y centrifugar 5 min a 14 000 rpm. transferir el sobrenadante a otro tubo.
5. Adicionar 50 µl de CTAB (10X), mezclar suavemente para homogenizar todo el líquido.
6. Adicionar 700 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), mezclar suavemente y centrifugar 5 min a 14 000 rpm. transferir el sobrenadante a otro tubo.
7. Agregar $\frac{3}{4}$ partes del volumen final (500 µl aprox.) de Isopropanol helado para precipitar el ADN. Incubar a -20 °C durante 40 min.
8. Centrifugar 20 min a 12 000 rpm y descartar el sobrenadante cuidando de no perder el pellet.
9. Lavar el pellet con 500 µl de Etanol al 70% helado y centrifugar 20 min a 12 000 rpm descartar el Etanol.
10. Lavar el pellet con 500 µl de Etanol al 95% helado y centrifugar 20 min a 12 000 rpm descartar el Etanol.
11. Permitir que el ADN(pellet) se seque al aire libre por 2 horas invirtiendo el tubo y luego resuspender el ADN en 80 µl de buffer T10E1 ó agua estéril (aproximadamente) y almacenar a -20 °C.

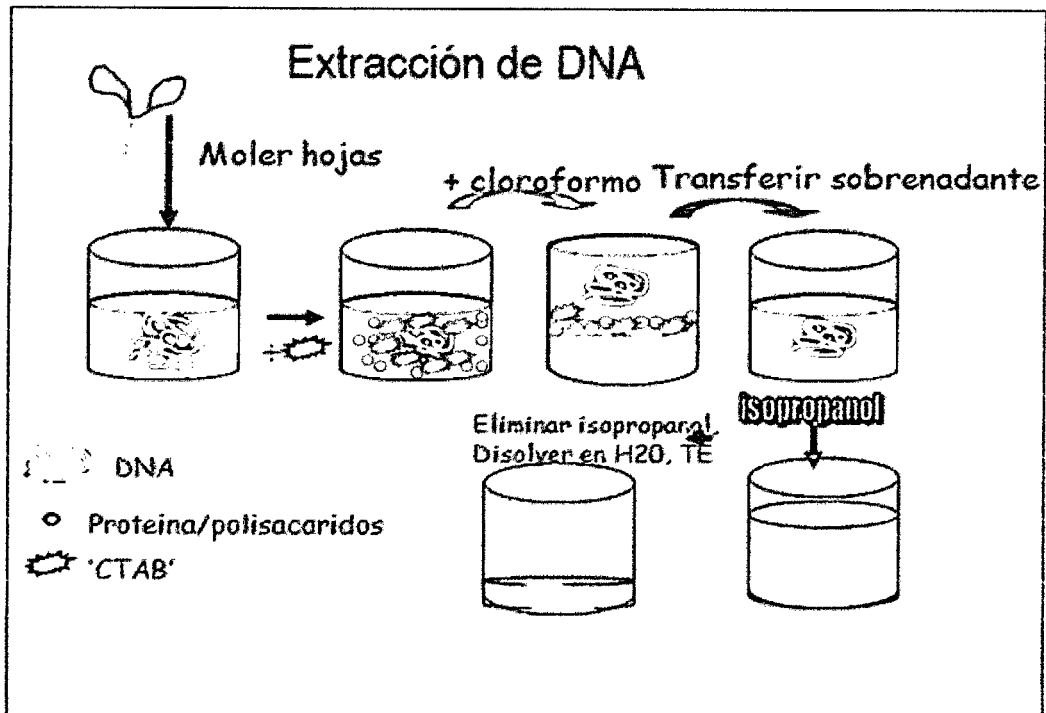


Figura 02. Extracción de ADN modificado por (Camarena *et al.*, 2008) de Doyle y Doyle (1990)

3.2.2. Cuantificación de ADN

La calidad y concentración del ADN genómico se determina por análisis comparativos de muestras coloreadas con bromuro de etidio en geles de agarosa, donde este último forma un complejo con el ADN que al ser expuesto a la luz ultravioleta emite fluorescencia. Para ello se toma 1 ul de muestra extraída con 9 ul de tampón de carga SALB 1X; y se carga en un gel de agarosa al 1%, paralelamente a las muestras se carga 10ul del marcador de referencia de peso molecular conocido(ADN fago lambda(λ) cortado con la enzima Pst1) con el fin de estimar la concentración de las muestras,

comparando la intensidad de cada una de las bandas en el gel usando como referencia la concentración de 280 ng/ul para la banda de mayor peso molecular(14,000pb) del ADN fago lambda. La corrida electroforética se realiza a 90 voltios por 60 minutos utilizando como tampón de corrida TBE 1X, luego se captura la imagen mediante una caja que emite luz ultravioleta capturándola con una cámara digital y un filtro de color marrón para el lente. Para la posterior cuantificación (Camarena *et al.*, 2008).

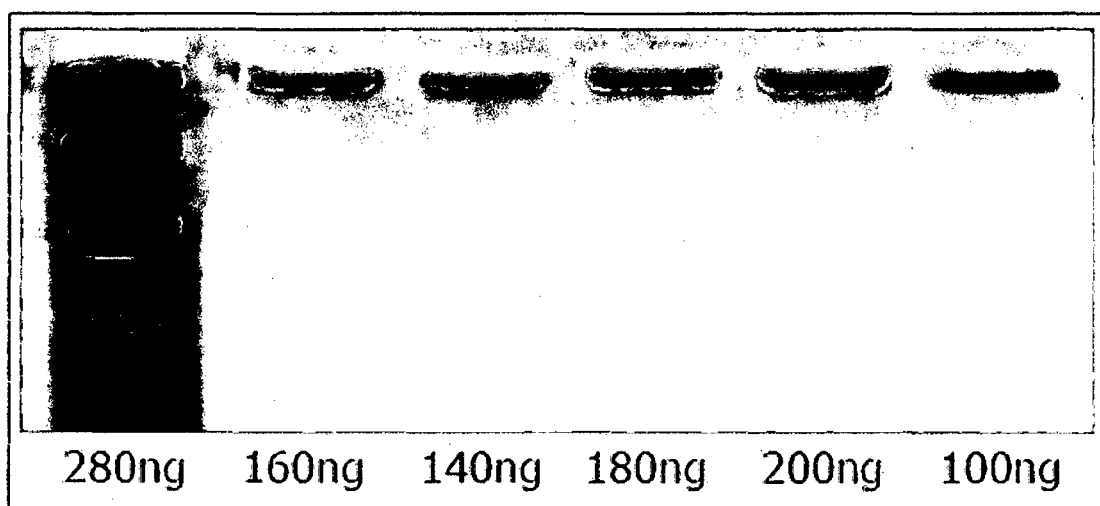


Figura 03. Cuantificación de ADN (Camarena *et al.*, 2008).

3.23. Marcadores moleculares y su importancia.

La identificación y selección de fenotipos es una de las actividades más antiguas del hombre y principalmente estaban basados en observaciones de las características morfológicas y/o agronómicas (Rallo *et al.*, 2002). No obstante, el uso de marcadores morfológicos en las plantas tiene muchas limitantes, pues su expresión puede estar sujeta a factores ambientales o fenológicos; por

ejemplo, la presencia o ausencia de espinas en los cítricos. Con frecuencia estos marcadores solo es posible evaluarlos a nivel de toda la planta y cuando ésta llega a su estado adulto, esto significa una espera, no deseable, de varios años (Powell, 1992; Phillips *et al.*, 1995).

Con la definición de la estructura del ADN por Watson y Crick en el año 1953 se dio origen a lo que hoy conocemos como biología molecular, abriendo todo un mundo de nuevas posibilidades científicas para el conocimiento y mejor aprovechamiento de plantas, animales y microorganismos, contribuyendo en gran parte a lo que se conoce como la revolución biotecnológica (Phillips-Mora, 1998). En la actualidad diversas técnicas de biología molecular están disponibles para la detección de la variabilidad genética a nivel del ADN o sea para la detección de polimorfismo genético (diferencias genéticas), basándose fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos (Karp y Edwards, 1998). Estas técnicas permiten la obtención de un número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares cubriendo todo el genoma del organismo (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Un marcador molecular se define como cualquier fenotipo molecular oriundo de la expresión de un gen o de segmentos específicos de ADN, que puede ser detectado y su herencia monitoreada (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Permiten identificar diferencias entre organismos individuales. Generalmente los marcadores son fragmentos de DNA que actúan como señales o límites de

regiones génicas que pueden estar cerca o dentro de los genes y ocupan posiciones específicas en el genoma.

De manera general los marcadores moleculares se dividen en tres clases con base en su método de detección:

- a) Basados en hibridación.
- b) Basados en la reacción en cadena de la polimerasa PCR (Polymerase Chain Reaction).
- c) Basados en la secuenciación.

Son importantes para la identificación y caracterización de los seres vivos, proporcionando información a los mejoradores para la selección de individuos en programas de mejoramiento genético, posibilitando el cruzamiento de materiales divergentes, teniendo como objetivo maximizar la distancia genética con la finalidad de recombinar genes reunidos en nuevas combinaciones genéticas favorables. Estos marcadores superan en la gran mayoría de los casos a las limitaciones de los métodos tradicionales, pudiendo caracterizar desde los primeros estadios de desarrollo de las plántulas, son aplicables a cualquier tipo de material vegetal y son independientes de la época del año en que se realiza el análisis y pueden ser utilizados en especies cultivadas o silvestres. Son considerados además como la manera más directa de medir y cuantificar la variación genética dentro y entre las especies (Navajas y Fenton, 2000).

3.24. Marcadores AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism - Longitud de Fragmentos Polimórficos de DNA Amplificados)

Los AFLPs (polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados) son una técnica que combina la digestión de dos enzimas de restricción, generalmente Mse I que reconoce y corta 4 pb y Eco RI que reconoce y corta 6 pb dentro de una secuencia, con la unión de secuencias específicas al nucleótido ligado a los extremos de los fragmentos de restricción y dos amplificaciones de PCR usando primers marcados basados en las secuencias ligadas. La primera amplificación se lleva a cabo con el uso de iniciadores que contienen una base extra en el extremo 3', lo que produce un conjunto de fragmentos que además de llevar la secuencia complementaria al iniciador, complementan a la base extra adicionada. Posteriormente estos productos amplificados sirven para hacer la segunda amplificación en la que se consideran iniciadores con dos o tres bases extras. Los fragmentos resultantes son complementarios, además del iniciador, a las extensiones consideradas, razón por la cual sólo una porción del genoma fragmentado es finalmente amplificado (Vos *et al.*, 1995).

La técnica de AFLP fue descrito por Zabeus y Vos (1993) y Vos *et al* (1995) (Grattapaglia, 1995; Furini y Wunder, 2004), el análisis consta de cuatro etapas;

- 1) El DNA genómico total del individuo es cortado con enzimas de restricción.
- 2) Se incorpora adaptadores específicos a los extremos de los fragmentos genómicos generados por la digestión enzimática.

- 3) Una fracción de los fragmentos generados es amplificada selectivamente vía PCR (Reacción de la Cadena de la Polimerasa) utilizando primers específicamente diseñados para reconocer las secuencias en los adaptadores.
- 4) La subpoblación de los fragmentos amplificados es separada en geles de alta resolución.

La técnica de AFLP La variabilidad genética de la especie es detectada por el polimorfismo que presentan los sitios de restricción, indicando la presencia o ausencia de los fragmentos amplificados y por ende la variabilidad de la especie. Mediante esta técnica se han dirigido preguntas de evolución y distancias genéticas entre especies relacionadas muy cercanas, así también para analizar diversidad genética de los germoplasma de cebada, yuca, lechuga, coco, maíz, arroz, caña de azúcar, soya y te. Dentro de las Ventajas, podemos destacar:

- El gran número de fragmentos que se originan se revelan en un único gel, donde el número de marcadores analizados en el gel, es el más alto entre las tecnologías de marcadores disponibles hasta el momento; por lo tanto los marcadores AFLP son muy eficiente para el muestreo amplio y eficiente en el análisis de un genoma.
- El gran poder de detección de la variabilidad genética; ya que explora simultáneamente el polimorfismo de las presencias y ausencias de sitios de restricción y la existencia o no de amplificación a partir de secuencias no arbitrarias, con lo que se consigue una flexibilidad significativa en la obtención

de marcadores polimórficos, además la técnica de AFLP no requiere de información previa de la secuencia de DNA. Una vez preparado los fragmentos amplificables, pueden obtenerse rápidamente un gran número de bandas potencialmente polimórficas, simplemente con la variación de las bases arbitrarias de los primers.

- La mayor robustez del ensayo de AFLP comparando con el ensayo RADP; esto se debe básicamente a que se utilizan primers más largos en la etapa de PCR, lo que aumenta significativamente la especificidad de amplificación, evitando la competición que ocurre durante la PCR en el ensayo de RAPD.
- Los datos generados mediante la técnica de AFLP son reproducibles lo que le da mayor ventaja sobre la técnica de RAPD (Figura 4).

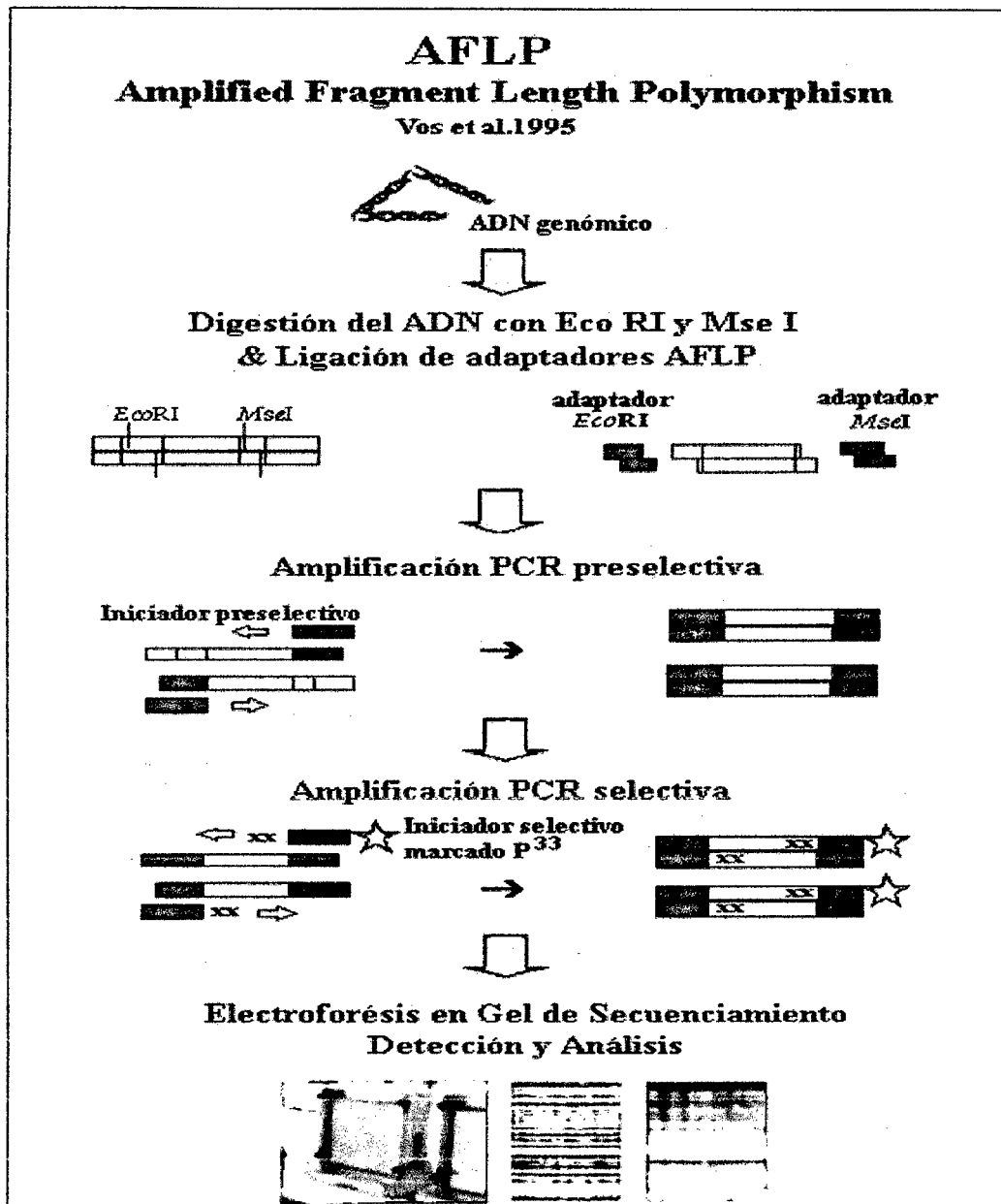


Figura 04. Principio de la técnica de AFLP (Camarena *et al.*, 2008).

3.25. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Existe una gran diversidad de primers para trabajos con técnicas moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa – PCR (Mullis *et al.* 1986).

La facilidad, rapidez, versatilidad y sensibilidad de esta técnica lo convierte en una herramienta particularmente poderosa para estudios genéticos moleculares envolviendo a gran número de individuos de cualquier organismo vivo, por lo cual son cada vez más utilizados (Ferreira y Grattapaglia, 1998). El PCR permite la amplificación *in Vitro* de fragmentos específicos de ADN a partir de cantidades mínimas del ADN patrón, aun cuando ese ADN sea de calidad relativamente baja. La técnica de PCR consta de tres etapas: La primera etapa es la desnaturalización el cual sucede generalmente a una temperatura que varía entre 90°C a 95°C y tiene por finalidad obtener moléculas de ADN de una sola hebra; en la segunda etapa conocida como hibridación que se da generalmente entre 40°C a 60°, los primers (oligonucleótidos de 10 a 30 nucleótidos) se unen a sus secuencias complementarias; y en la tercera etapa llamada de extensión o amplificación, la temperatura varía entre 70°C a 75°C, donde la enzima Taq polimerasa añade sucesivamente nucleótidos en dirección 5' a 3' hidroxilo del primer, teniendo como molde a la hebra de ADN complementaria que es antiparalela. Después de "n" ciclos, una sola copia inicial de la plantilla de ADN teóricamente puede ser amplificado a 1 billón de copias (Innis *et al.* 1991).

3.26. Análisis molecular del DNA

Los métodos de secuenciamiento del DNA han permitido conocer la composición molecular de muchos sectores de los cromosomas.

La secuencia de los nucleótidos de un gen puede ser parcialmente deducida a partir de la secuencia de los aminoácidos de la proteína que codifica. Se han

desarrollado métodos que permiten un rápido secuenciamiento del DNA, lo que ha producido una verdadera revolución en el mundo de la biología molecular. Gracias a ellos se ha llegado a conocer la composición de numerosos genes.

Los métodos de secuenciamiento se basan en la producción de fragmentos de DNA de diferentes longitudes, que empiezan en un punto fijo y terminan en uno de los cuatro tipos de nucleótidos. luego esos fragmentos se separan sobre la base de sus tamaños en un gel de poliacrilamida, en el que se lee la secuencia de los nucleótidos del DNA en estudio.



IV. MATERIALES Y METODOLOGÍA

4.1. Materiales

4.1.1. Material biológico

Para el estudio se utilizaron en total 1000 semillas botánicas de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) de la Accesoión Mishquiyacu; 100 para la prueba de dosimetría y 100 semillas por tratamiento (8 dosis de irradiación y 1 testigo) haciendo un total de 900 semillas. Además para el análisis molecular se tomaron muestras de 5 plantas de sachá inchi (Hojas tiernas) por tratamiento, incluido el testigo.

4.2. Metodología

4.2.1. Ubicación del experimento

El trabajo de investigación se ejecutó en dos etapas: en la *Primera etapa* se realizó la siembra de semillas irradiadas para las evaluaciones fenológicas y biométricas. Esta actividad se llevó a cabo en el vivero del Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana-San Martín, bajo condiciones ambientales, cuya ubicación es la siguiente:

a) Ubicación política

Distrito : Morales

Provincia : San Martín

Región : San Martín

b) Ubicación geográfica

Latitud sur : 6° 28' 44.7"

Longitud Oeste : 76° 22' 30.6"

Altitud : 324 m.s.n.m.m.

En la *Segunda etapa* se realizó el análisis molecular con Marcadores AFLP (Longitud de Fragmentos Polimórficos de DNA Amplificados), esta actividad se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina (IBT) en Lima-Perú.

El presente estudio se ejecutó entre los meses de mayo del 2012 y mayo del 2013.

4.2.2. Desarrollo del experimento

4.2.2.1. Colecta de semillas

Se colectó 1 kg de semillas de sachá inchi, accesión Mishquiyacu, con la finalidad de requerir el número necesario de semillas para todo el estudio. Esta colecta se realizó del banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana - San Martín.

4.2.2.2. Dosimetría e irradiación de semillas

Los procesos de dosimetría e Irradiación de semillas se realizaron en el Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN), con un Irradiador Tipo I, Marca Gammacell 220 Excel, Modelo C-198, Serie GS-401, teniendo como fuente de energía la Radiación Gamma de Cobalto 60. Las muestras se irradiaron dentro de un cilindro cerrado de 20,47 cm. de altura y 15,49 cm. de diámetro a condiciones ambientales de 21 °C de temperatura y 968 hPa de presión atmosférica. Previo a la irradiación de las dosis de tratamientos se realizó la dosimetría, empleando 100 semillas (Requerimiento solicitado por el IPEN), proceso que consistió en estimar la dosis absorbida por la semilla como resultado de la exposición a la radiación ionizante. Teniendo en cuenta que la irradiación se realiza en un solo proceso se estimó las dosis de tratamientos de acuerdo al tiempo que sea necesario, ya que a mayor tiempo de exposición de energía radioactiva de las semillas, mayores fueron las dosis de irradiación (**Cuadro 01**). Para la irradiación de las dosis de tratamientos se emplearán 100 semillas por tratamiento (8 dosis de radiación y 1 testigo) haciendo un total de 900 semillas respectivamente (**FIGURA 05**).

Cuadro 01. Dosimetría e irradiación de semillas

MUESTRA	CANTIDAD (SEMILLAS)	TIEMPO DE IRRADIACIÓN (Seg)	DOSIS (Gy)
Semillas de sachá inchi	100	1,26	2
Semillas de sachá inchi	100	3,15	5
Semillas de sachá inchi	100	6,30	10
Semillas de sachá inchi	100	15,78	25
Semillas de sachá inchi	100	31,56	50
Semillas de sachá inchi	100	63,00	100
Semillas de sachá inchi	100	126,00	200
Semillas de sachá inchi	100	252,6	400

Elaboración: IPEN 2012



Figura 05. Muestra de tratamientos en estudio

4.2.2.3. Preparación y llenado de sustrato

Para la preparación del sustrato se colectó materiales orgánicos tales como la gallinaza descompuesta, tierra agrícola y cascarilla de arroz carbonizada, se consideraron para su selección que estén libres de agentes contaminantes, compuestos y sustancias que puedan modificar los resultados. Es un sustrato común formulado por el Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana,

que tienen en su proporción 57 % de tierra agrícola, 14 % de gallinaza y 29% de cascarilla de arroz carbonizada.

El llenado de bolsas se realizó en un número de 25 por unidad experimental y 100 por tratamiento haciendo un total de 900 bolsas para todo el estudio; consistió en depositar el sustrato previamente preparado en las bolsas almacigueras según las instrucciones para viveros forestales ya conocidas para lograr un buen desarrollo de plántulas.



Figura 06. Componentes del sustrato



Figura 07. Llenado del sustrato

4.2.2.4. Siembra de las semillas irradiadas

Se realizó la siembra directa de las semillas botánicas de Sacha Inchi-Accesión Mishquiyacu en un total de 100 por tratamiento previamente irradiadas a diferentes dosis de radiación gamma (cobalto⁶⁰), por el Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN) en las camas de repiques en donde se encontraban las bolsas listas para la siembra bajo un diseño experimental completamente al azar.



Figura 08. Siembra de semillas

4.2.2.5. Manejo cultural

Las labores culturales consistieron en un riego en forma de agua de lluvia fina para promover el crecimiento, absorción de nutrientes y alimentos para mantener un cierto grado de estrés hídrico y de esta forma inducir la formación de yemas y endurecimiento de las plantas (Blake y Zaerr, 1979) y el desmalezado para regular la competencia de luz y otros factores evitando que las malas hierbas lastimen e inhiben el crecimiento de las plantas.

4.2.3. Características del vivero experimental

4.2.3.1. Dimensiones

- Largo : 20 m.
- Ancho : 4 m.
- Área total : 80 m².

4.2.3.2. De las bolsas o semillas sembradas

- N° total de semillas sembradas por tratamiento: 100
- N° de semillas sembradas por tratamiento/repetición: 25
- N° total de semillas sembradas para el estudio: 900
- N° total de plantas sobrevivientes de semillas irradiadas evaluadas molecularmente por tratamiento: 5
- N° total de plantas sobrevivientes de semillas sin irradiar evaluadas molecularmente (testigo): 10
- N° total de plantas sobrevivientes evaluadas molecularmente en todo el estudio: 45

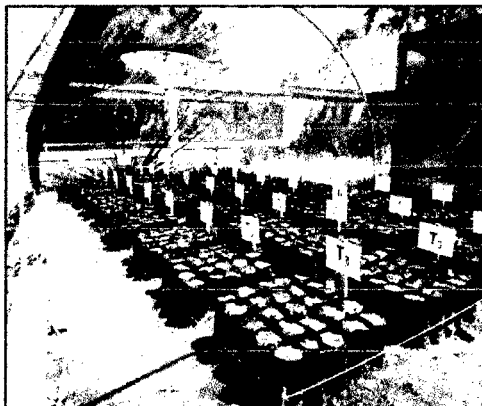


Figura 09. Disposición de los tratamientos

4.3. Componentes de estudio

4.3.1. Material vegetativo

Se utilizaron semillas botánicas de Sacha Inchi-Accesión Mishquiyacu.

4.3.2. Variables respuesta

Luego de la siembra de las semillas irradiadas se realizaron evaluaciones periódicas durante 60 días, tiempo en que se evaluó las variables biométricas en etapa de vivero.

4.3.2.1. Características de los estados fenológicos

- **Porcentaje de germinación:** la evaluación de esta variable se realizó a los 60 días, mediante un conteo directo considerando características morfológicas (plantas formadas) y para el caso de las semillas no emergidas se tuvo en cuenta la aparición de la radícula o raíz principal debajo del suelo (sustrato) (Songsri *et al.*, 2011).

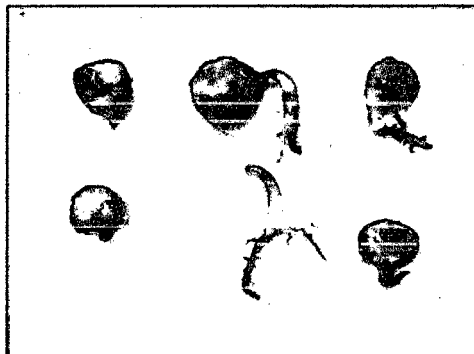


Figura 10. Formas de semillas germinadas

- **Porcentaje de emergencia:** los resultados se obtuvieron luego de calcular el número de plantas emergidas entre el número de semillas sembradas por 100; se realizó un monitoreo cada tres días después de las primeras semillas emergidas (a los 15 días) y los resultados finales utilizados para el estudio

fue a los 60 d.d.s. Para considerarlas emergidas se tuvo en cuenta la aparición del hipocotilo o tallo con las primeras hojas verdaderas por encima del suelo (sustrato) y plantas formadas (Songsri *et al.*, 2011).



Figura 11. Semilla emergida

- **Porcentaje de sobrevivencia:** se calculó independientemente mediante el conteo de plantas que lograron sobrevivir al finalizar del estudio en función al número de semillas germinadas (Songsri *et al.*, 2011).
- **Porcentaje de mortalidad:** la evaluación se realizó calculando la diferencia del porcentaje de sobrevivencia en función al número de semillas germinadas al final del estudio (Songsri *et al.*, 2011).
- **Dosis letal media:** esta variable nos indicó las dosis de radiaciones más óptimas en el sentido de generar por lo menos el 50 % de plantas sobrevivientes con capacidad de regeneración y posterior crecimiento; se calculó en función al número de plantas sobrevivientes entre el total de semillas germinadas por 100 (Songsri *et al.*, 2011).

4.3.2.2. Características biométricas (vegetativas)

- **Altura total de la planta (cm):** la evaluación se realizó desde la superficie del suelo hasta la base de la yema apical utilizando una regla de 30 cm. La medición se hizo una sola vez al final del estudio (60 días).

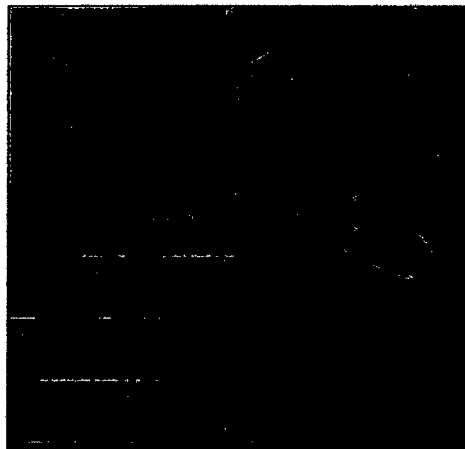


Figura 12. Medición de altura

- **Diámetro del cuello (mm):** en la medición se utilizó un vernier y se consideró apropiado realizarlo al ras del suelo. Se evaluó una sola vez al final del estudio (60 días).

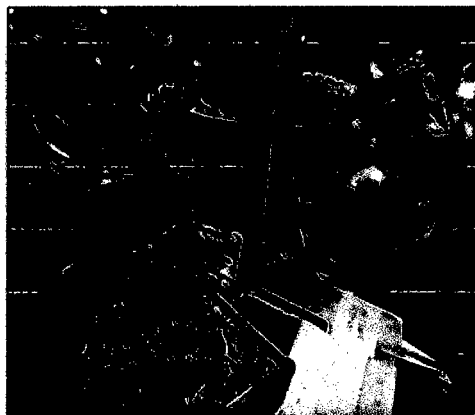


Figura 13. Medición de diámetro

- **Número de hojas (n°):** la evaluación consistió en realizar un conteo de las hojas de las plantas sobrevivientes al final del estudio (60 días).
- **Longitud de raíces (cm):** para los resultados obtenidos en esta variable se realizó la medición de las raíces respectivas al final del estudio (60 días) con ayuda de una regla de 30 cm.

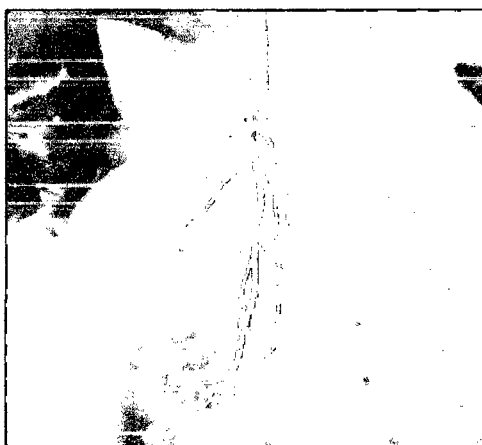


Figura 14. Medición de longitud de raíz

4.3.2.3. Evaluación de la variabilidad genética inducida mediante el análisis molecular con marcadores AFLP

- **Extracción de DNA**

El DNA se extrajo de las hojas frescas de sachá inchi, según el método de CTAB al 2% con la metodología de Doyle y Doyle (1990). Se realizó los siguientes pasos:

- a) Pulverizar con nitrógeno líquido el tejido foliar colectado de preferencia de hojas jóvenes aproximadamente 200 mg.

- b) En un tubo eppendorf de 1,5 ml colocar material vegetal pulverizado hasta la marca de 500 μ l y resuspender con 700 μ l de buffer CTAB (2X), Adicionando 2 μ l de β mercaptoetanol. Agitar suavemente e incubar por 30 minutos a 65 $^{\circ}$ C.
- c) Retirar de la incubadora y dejar reposar por espacio de 2 minutos a temperatura ambiente.
- d) Agregar 700 μ l cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) mezclar suavemente el tubo y centrifugar 5 min a 14 000 rpm. Transferir el sobrenadante a otro tubo.
- e) Adicionar 50 μ l de CTAB (10X), mezclar suavemente para homogenizar todo el líquido.
- f) Adicionar 700 μ l de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), mezclar suavemente y centrifugar 5 min a 14 000 rpm. transferir el sobrenadante a otro tubo.
- g) Agregar $\frac{3}{4}$ partes del volumen final (500 μ l aprox.) de Isopropanol helado para precipitar el ADN. Incubar a -20 $^{\circ}$ C durante 40 min.
- h) Centrifugar 20 min a 12000 rpm y descartar el sobrenadante cuidando de no perder el pellet.
- i) Lavar el pellet con 500 μ l de Etanol al 70% helado y centrifugar 20 min a 12000 rpm descartar el Etanol.
- j) Lavar el pellet con 500 μ l de Etanol al 95% helado y centrifugar 20 min a 12000 rpm descartar el Etanol.

- k) Permitir que el ADN (pellet) se seque al aire libre por 2 horas invirtiendo el tubo y luego resuspender el ADN en 80 μ l de buffer T10E1 ó agua estéril (aproximadamente) y almacenar a -20 °C.



Figura 15. Pellet o DNA de sachá Inchi extraído.

- **Determinación de la Calidad y Concentración de DNA**

Para determinar la Calidad de DNA; se verificó mediante Electroforesis en gel de Agarosa (1%) Sambrook y Russel (2001): Se preparó un gel de Agarosa (1%) disuelto en el Buffer de corrida TBE (1X) (Tris Borato EDTA), donde se tomó 4 μ l de DNA mezclado con 3 μ l de Azul de Bromófenol, los cuales se colocaron en los pocillos del gel para luego compararlo con una masa estándar conocida de DNA del fago λ cortado con una enzima de restricción Pst I. Las muestras fueron corridas a 90 v por 45 minutos, posteriormente el DNA fue visualizado a través de la tinción de Bromuro de Etidio en un transiluminador de UV y la imagen de dicho gel fue capturado mediante una cámara digital y almacenada en una computadora, donde se

procedió a determinar la calidad y la concentración de DNA para su posterior dilución.

- **Análisis mediante AFLP.**

Metódica de AFLP:

El DNA extraído de las muestras fueron digeridas con enzimas de restricción *EcoRI* y *MseI* (New England Biolabs), para luego ligarlas con adaptadores (Invitrogen) a través con la enzima T₄ Ligasa. La técnica de AFLP presenta dos etapas de amplificación en PCR: (i) la amplificación de fragmentos con iniciadores "preselectivos" (Invitrogen), para luego (ii) amplificarlo con varias combinaciones de iniciadores "selectivos"; donde posteriormente se separan los fragmentos amplificados mediante electroforesis para luego ser revelado los marcadores polimórficos. En el presente trabajo se utilizó cuatro pares de iniciadores o primers.

Cuadro 02. Pares de iniciadores (Primer) seleccionados para realizar la caracterización del Sacha Inchi.

Nombre	PRIMER -ECO	PRIMER-MSE
<u>E38M49</u>	5' GAC TGC GTA CCA ATT C ACT 3'	5' GAT GAG TCC TGA GTA A CAG 3'
<u>E33M40</u>	5' GAC TGC GTA CCA ATT C AAG 3'	5' GAT GAG TCC TGA GTA A AGC 3'
<u>E13M59</u>	5' GAC TGC GTA CCA ATT C AG 3'	5' GAT GAG TCC TGA GTA A CTA 3'
<u>E45M61</u>	5' GAC TGC GTA CCA ATT C ATG 3'	5' GAT GAG TCC TGA GTA A CTG 3'

Procedimiento:

1. Digestión restrictiva de DNA genómico

Se preparó la muestra en tubos de PCR con los componentes para la digestión (**Cuadro 03**), luego se centrifugó para facilitar que los componentes se mezclen y posteriormente se incubó a 37° C por 3 horas.

Cuadro 03. Reacción de digestión de DNA genómico (Mezcla A)

Componente	Muestra
Buffer de reacción 5X (kit)	5 uL
DNA muestra (250 ng en ≤ 18 uL)	≤ 18 uL
Eco RI / MseI (kit)	2 uL
Agua destilada estéril (c.s.p.)	25 uL
Volumen Total	25 uL

2. Ligación de los Adaptadores

El DNA digerido se adicionó a la solución de ligación más la enzima T4 (**Cuadro 04**), la cual fue centrifugada e incubada a 20°C por 2 horas. Posteriormente se llevó a cabo una dilución 1:10 (mezcla B: Buffer TE), el sobrenadante de la mezcla se almacenó a -20 °C

Cuadro 04. Reacción de Ligación de Adaptadores (Mezcla B)

Componente	Volumen
Solución de Ligación de Adaptadores (kit)	24 UI
DNA ligasa T4 (kit)	1 UI

3. Reacción de Pre-Amplificación.

Se adicionó según el **Cuadro 05** (mezcla C). La mezcla se centrifugó brevemente y se le adicionó aceite mineral y se llevó a condiciones de PCR al cabo de 20 ciclos a: 94° C (30 seg.), 56° C (60 seg.), 72° C (60 seg.) y 4°C. Posteriormente se realizó la dilución de 1: 50 como sigue: 3 uL de la muestra y 147 uL de Buffer (TE). Ambas reacciones, diluídas y no diluídas, se almacenaron a -20° C.

Cuadro 05. (Mezcla C)

Componente	Volumen
DNA molde diluído (mezcla B diluída)	5 uL
Mix primer pre-amp (kit)	40 uL
Buffer PCR 10X con Mg. (kit)	5 uL
Taq DNA polimerasa (5 unidades/uL)	1 uL
Volumen Total	51 uL

4. Reacción de Amplificación selectiva (Prueba No Radiactiva)

Se adicionó los reactivos que se encuentra en el **Cuadro 06** (Mezcla D). Para cada par de primers, se agregó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y etiquetado como **Mix1**. En otro tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y etiquetado como **Mix 2**.

Cuadro 06. (Mezcla D)

Componente	Volumen
Primer Eco RI (elegir uno) kit	18 uL
Agua destilada estéril	32 uL
Volumen Total	50 uL

Mix 1

Componente	Volumen
Mezcla D	5 uL
Primer MseI (contiene dNTPs)	45 uL
Volumen Total (suficiente para 10 Rx)	50 uL

Mix 2

Componente	Volumen
Agua destilada estéril	79 uL
Buffer PCR 10X con Mg	20 uL
Taq DNA polimerasa (5 unidades / uL)	1 uL
Volumen Total (suficiente para 10 Rx)	100 uL

Cada Amplificación AFLP es reunida, se combinó lo siguiente en un tubo delgado de microcentrífuga de 0.2 ó 0.5 ul. **(Cuadro 07)**. Se realizó el siguiente programa de PCR, en el termociclador:

Cuadro 07. (Mezcla E)

Componente	Volumen
DNA muestra diluído preamplificado mezcla C diluída	5 uL
Mix 1 (primers / dNTPs)	5 uL
Mix 2 (Taq DNA polimerasa / buffer)	10 uL
Volumen Total	20 uL

Un ciclo a 94° C durante 30 segundos; 65° C durante 30 segundos y 72° C durante 60 segundos. Se disminuyó la temperatura de anidamiento cada ciclo 0.7° C durante 12 ciclos. Esto dió una fase touch down de 13 ciclos. Luego se llevó a cabo 23 ciclos a: 94° C por 30 segundos, 56° C por 30 segundos, y 72° C por 60 segundos, haciendo un tiempo total de 2 horas, 2 minutos.

- **Electroforesis en Gel de Acrilamida**

Principio:

La electroforesis es la migración de moléculas bajo un campo eléctrico, esta migración se da a través de una membrana con un tamiz determinado para que las moléculas empiecen a separarse en función a su peso molecular, este tamiz varía en función al tipo de electroforesis, para la técnica de AFLP se utiliza el gel de Acrilamida – Bisacrilamida.

La Acrilamida y la bisacrilamida son monómeros y dimeros respectivamente; en presencia del persulfato de amonio se liberan radicales libres los cuales permiten la polimerización de estos en un polímero; al adicionarle un

catalizador TEMED (N, N, N'-N'tetrametiletilenediamina), es iniciada una cadena de reacción en la cual los monómeros de acrilamida son polimerizados en cadenas largas. Cuando el agente funcional N, N' metilenbisacrilamida es incluida en la reacción de polimerización, las cadenas empiezan a entrecruzarse para formar el gel, cuya porosidad está determinado con la longitud de la cadena y el grado de entrecruzamiento.

Procedimiento:

1. Preparación de los vidrios

Se prepararon dos vidrios de secuenciamiento, los cuales fueron previamente limpiados con alcohol (70%), posteriormente se adicionó en uno de los vidrios 1.5 ml de alcohol , 5 ul solución Bind (SIGMA®) y 5 ul de Ac. acético, distribuyéndolo en el vidrio de forma homogénea y al segundo vidrio se adicionó 1 ml de alcohol y 200 ul de Sigmacote (SIGMA®). Se adicionaron los separadores a los vidrios y se sujetaron con clamps para luego adicionarles la solución de acrilamida-bisacrilamida. (6%).

2. Preparación del gel de Acrilamida- bisacrilamida (6%)

Se tomaron 60 ml. de Solución de acrilamida- bisacrilamida, adicionándole 360 ul de Persulfato de amonio (10%) y 36 ul de TEMED para la catalización de la reacción y posteriormente se cargó la solución al vidrio, donde se dejó que la mezcla catalice completamente para luego

llevarlo a la cámara electrofóretica vertical; una vez colocada en la cámara, se adicionó Buffer TBE 0.5X y 1X superior e inferior respectivamente, para luego realizar una pre- corrida a 1500 v por 30 minutos.

Se tomó 6 ul. del amplificado para cargarlo en el gel, la cual fue mezclada con tampón de carga (Formamida 96% v/v, 10mM EDTA pH 8, 0.05% Azul de Bromófenol y 0.05 % w/v xilencianol) a cada amplificado, así mismo se adicionó el marcador de peso molecular para determinar el peso de las bandas que se obtengan.

3. Tinción y Revelado de los Geles

Nos basamos según el protocolo de Bassam *et al* (1991)

A. Fijación

Una vez terminada la corrida, el gel se colocó en 1200 ml de solución de ácido acético glacial (10%) en agitación por 20 min., posteriormente se realizó dos enjuagues sucesivos con Agua por 3 minutos cada uno.

B. Tinción

Una vez enjuagado el vidrio se colocaron 1200 ml de Nitrato de plata (1gr. L^{-1}) por 30 min., el cual se encontró en agitación y posteriormente fue lavado con agua.

C. Revelado

Se agregó carbonato de sodio (30gr.L^{-1}) el cual fue previamente refrigerado a 4°C , se agitó hasta la observación de las bandas, la reacción fue detenida mediante ácido acético (10%) para luego enjuagar con agua y su posterior secado.

4.3.3. Tratamientos en estudio

Cuadro 08. Descripción de los tratamientos

TRATAMIENTOS	DOSIS DE RADIACIÓN
T1	0 gray (testigo)
T2	2 gray
T3	5 gray
T4	10 gray
T5	25 gray
T6	50 gray
T7	100 gray
T8	200 gray
T9	400 gray

4.4. Diseño experimental

4.4.1. Análisis fenológico y biométrico.

Se utilizó un diseño completamente al azar, con 9 tratamientos, 4 repeticiones y 25 semillas por unidad experimental que hicieron un total de 900 plantas para

todo el estudio. Los tratamientos se asignaron aleatoriamente sin ningún tipo de restricción debido a que las unidades experimentales son bastantes homogéneas. Se generó una base de datos en el software Microsoft Excel 2010 que fueron procesadas mediante un análisis de varianza y sometidas a una prueba de Duncan al 5% para ver las diferencias entre los tratamientos. Para los datos porcentuales (Variables fenológicas) se realizó la transformación respectiva utilizando la formula $\arcsen\sqrt{\%}$ y para los datos de conteo se utilizó $\sqrt{x+1}$ (Snedecor y Cochran, 1980).

4.4.2. Análisis Molecular.

- **Análisis de datos**

La evaluación de los polimorfismos fue registrada directamente a partir de los vidrios teñidos y revelados, utilizando para ello un trans-iluminador de luz blanca. Los datos fueron compilados como presencia (1) o ausencia (0) de las bandas polimórficas. La carencia o duda de un dato se registró como dato perdido (9), para posteriormente ser repetido. Estos datos fueron almacenados en hojas de Excel para su posterior análisis mediante el programa bioinformático NTsys.

- **Obtención de Matriz de similitud**

Para la obtención de datos mediante la matriz de similitud, estos se llevaron al programa Nt sys versión 2.1 (Rohlf, 2000), los cuales fueron procesados por

medio de análisis multivariado para obtener un agrupamiento basado en la distancia genética de Jaccard para datos cualitativos, se utilizó el índice de Jaccard ya que AFLP tiene una naturaleza dominante y el hecho que el algoritmo ignora las búsquedas 0/0 que teóricamente provee menos evidencia de relaciones (Reif et al, 2005 ;Tosto y Hopp, 2000). Para el análisis de Cluster y las relaciones fenéticas entre los genotipos son presentadas a través de dendrogramas usando Unweighted pair group method using arithmetic average (UPGMA).

4.4.3. Modelo aditivo lineal

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}.$$

Y_{ij} : es el valor o rendimiento observado en el i -ésimo tratamiento, j -ésima repetición.

μ : es el efecto de la media general.

T_i : es el efecto i -ésimo del tratamiento.

ε_{ij} : es el efecto del error experimental en el i -ésimo tratamiento, j -ésima repetición.

4.5. Análisis de varianza

Cuadro 09. Esquema del análisis de varianza

Fuente de Variabilidad	Grados de libertad
TRATAMIENTOS: <i>dosis de radiación</i>	$t-1 = 8$
Error	$t(r-1)=27$
Total	$rt-1 = 35$

Repeticiones $r: 4$

Tratamientos $t: 9$

V. RESULTADOS

5.1. Características de los estados fenológicos

5.1.1. Porcentaje de germinación

Cuadro 10: Análisis de varianza para el porcentaje de germinación en semillas de sachá Inchi irradiadas con rayos gamma.

Fuente de variación	G.L	S.C	C.M	F cal.
Tratamientos	8	1.83392222	0.22924028	12.36 **
Error	27	0.50077500	0.01854722	
Total	35	2.33469722		

$R^2 = 78.55 \%$ C.V.=10.73 % PROMEDIO= 86.39 %
 N.S= No significativo *=Significativo **= Altamente significativo

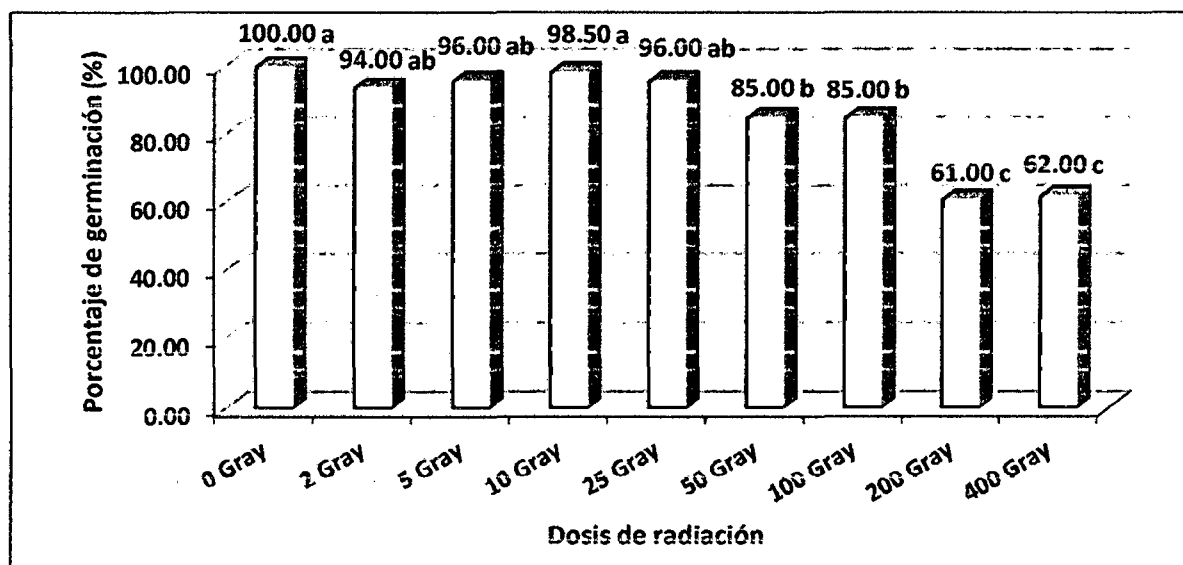


Figura 16: Prueba de Duncan ($p < 0,05$) para el porcentaje de germinación en semillas de sachá Inchi irradiadas con rayos gamma.

5.1.2. Porcentaje de emergencia

Cuadro 11: Análisis de varianza para el porcentaje de emergencia en semillas de sachá Inchi irradiadas con rayos gamma.

Fuente de variación	G.L	S.C	C.M	F cal.
Tratamientos	7	4.82683750	0.68954821	59.56 **
Error	24	0.27785000	0.01157708	
Total	31	5.10468750		

$R^2 = 94.56 \%$ C.V.=9.17 % PROMEDIO= 77.58 %
 N.S= No significativo *=Significativo **= Altamente significativo

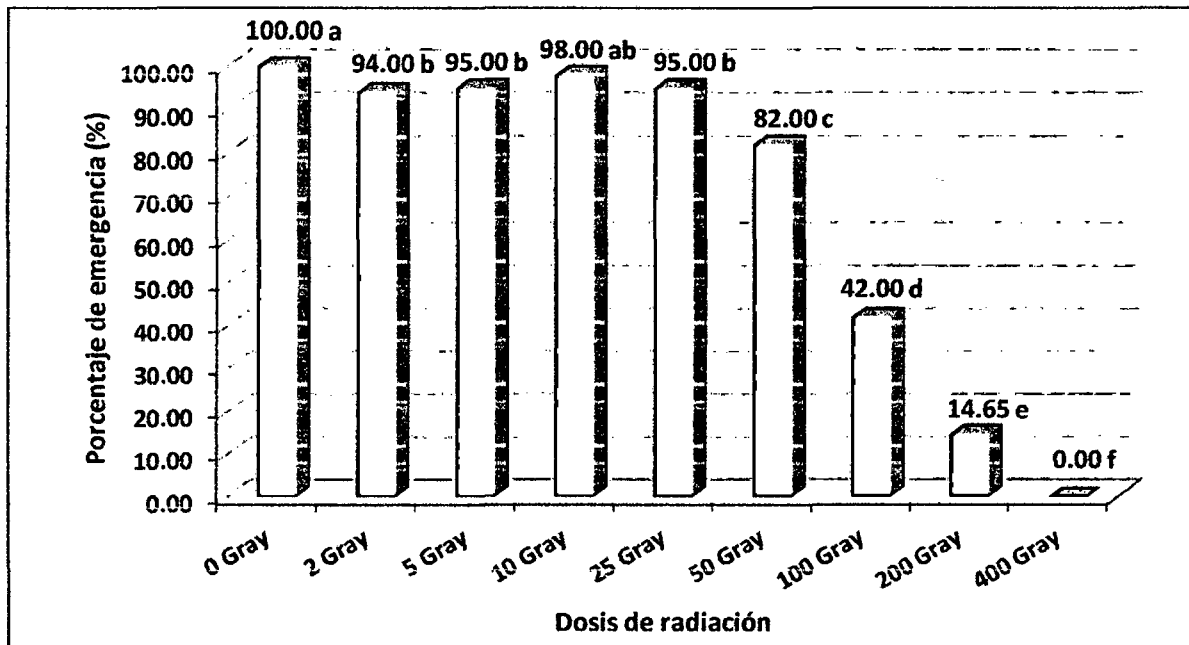


Figura 17: Prueba de Duncan ($p < 0,05$) para el porcentaje de emergencia en semillas de sachá Inchi irradiadas con rayos gamma.

5.1.3. Porcentaje de sobrevivencia

Cuadro 12: Análisis de varianza para el porcentaje de sobrevivencia en semillas de sachá Inchi irradiadas con rayos gamma.

Fuente de variación	G.L	S.C	C.M	F cal.
Tratamientos	7	4.5154719	0.6450674	17.82 **
Error	24	0.86872500	0.0361969	
Total	31	5.3841969		

$R^2 = 83.87 \%$ C.V.=20.35 % PROMEDIO= 63.63 %
 N.S= No significativo *=Significativo **= Altamente significativo

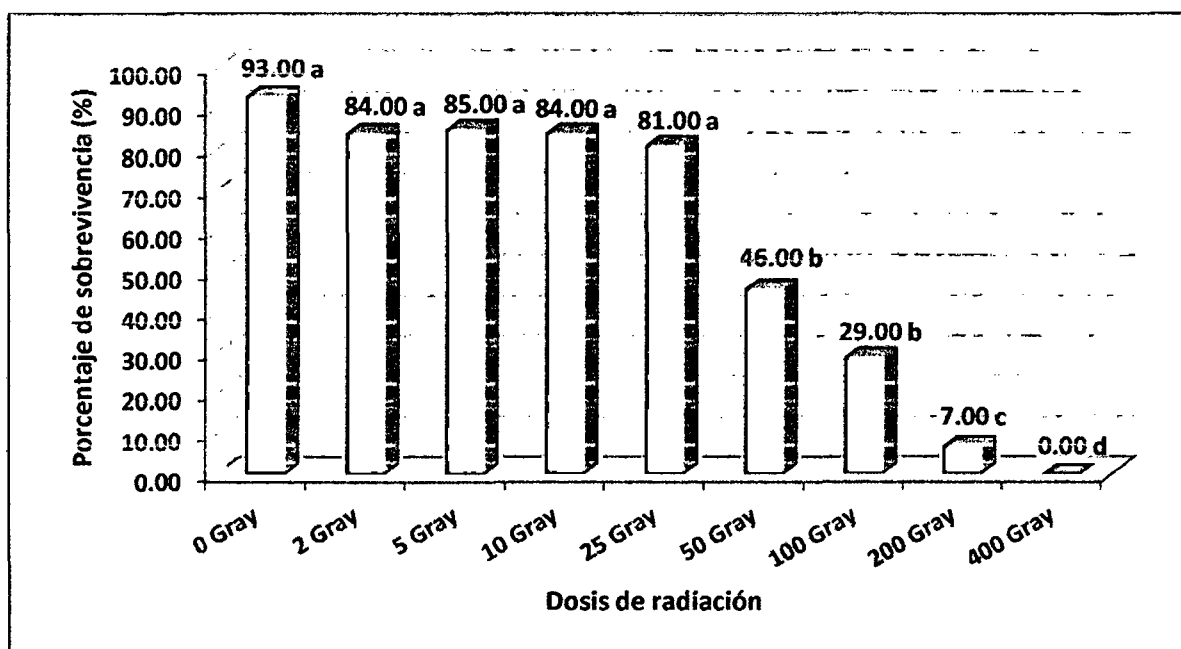


Figura 18: Prueba de Duncan ($p < 0,05$) para el porcentaje de sobrevivencia en semillas de sachá Inchi irradiadas con rayos gamma.

5.1.4. Porcentaje de mortalidad

Cuadro 13: Análisis de varianza para el porcentaje de mortalidad en semillas de sachá Inchi irradiadas con rayos gamma.

Fuente de variación	G.L	S.C	C.M	F cal.
Tratamientos	8	7.62175000	0.95271875	29.61 **
Error	27	0.86872500	0.03217500	
Total	35	8.49047500		

$R^2 = 89.77 \%$ C.V.=24.27 % PROMEDIO= 43.44 %
 N.S= No significativo *=Significativo **= Altamente significativo

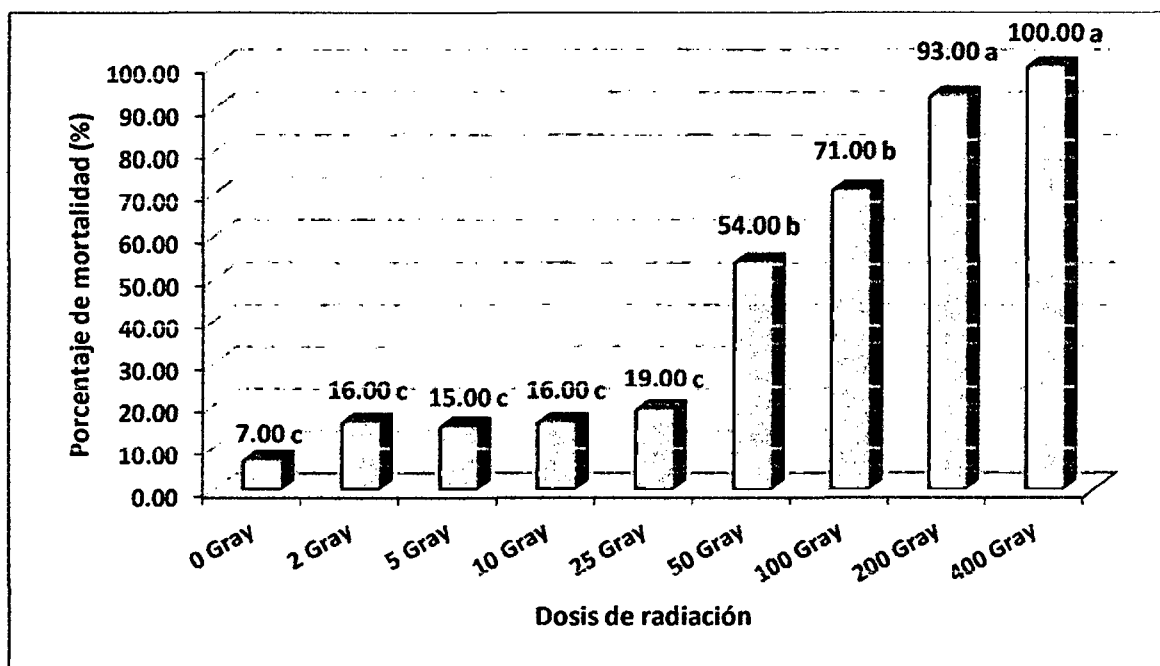


Figura 19: Prueba de Duncan ($p < 0,05$) para el porcentaje de mortalidad en semillas de sachá Inchi irradiadas con rayos gamma.

5.1.5. Dosis letal media (DL50)

Cuadro 14: Análisis de varianza para la dosis letal media (DL50) en semillas de sachá Inchi irradiadas con rayos gamma.

Fuente de variación	G.L	S.C	C.M	F cal.
Tratamientos	7	3.27054688	0.46722098	13.22 **
Error	24	0.84847500	0.03535313	
Total	31	4.11902188		

$R^2 = 79.40 \%$ C.V.=18.59 % PROMEDIO= 68.13 %
 N.S= No significativo *=Significativo **= Altamente significativo

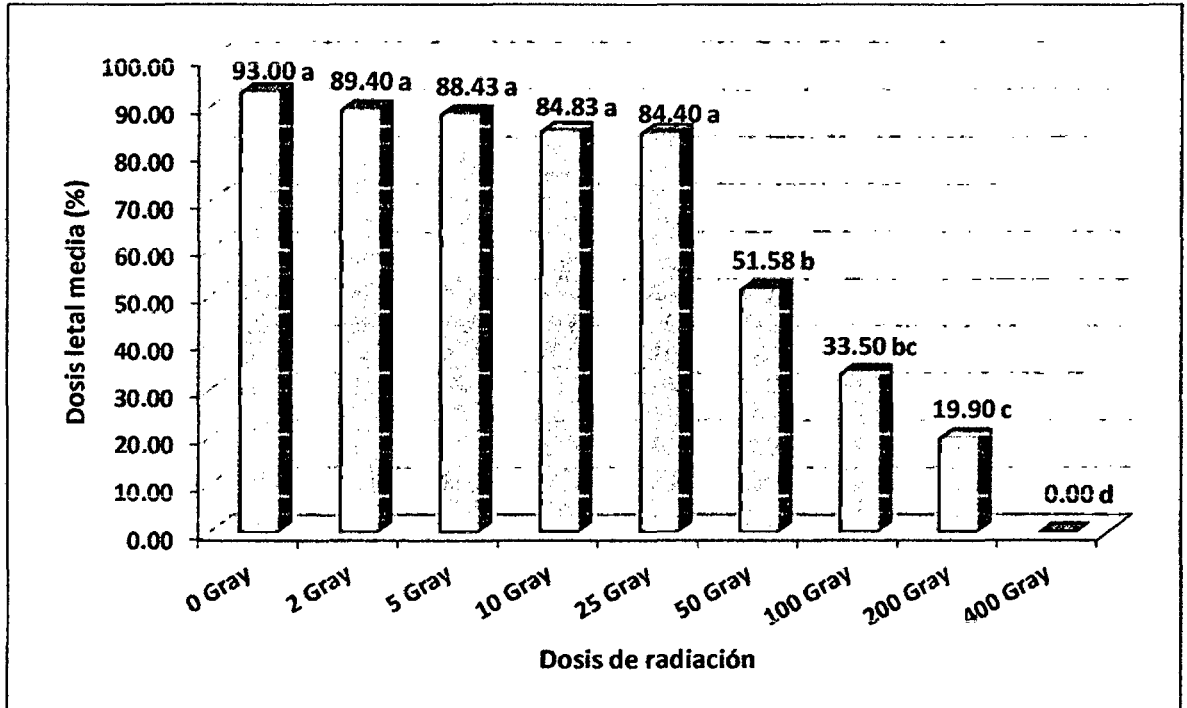


Figura 20: Prueba de Duncan ($p < 0,05$) para la dosis letal media (DL50) en semillas de sachá Inchi irradiadas con rayos gamma.

5.2. Características biométricas (Vegetativa)

5.2.1. Altura de planta (cm)

Cuadro 15: Análisis de varianza para la altura de plantas (cm) de sachá inchi generadas de semillas irradiadas con rayos gamma.

Fuente de variación	G.L	S.C	C.M	F cal.
Tratamientos	7	7211.483650	1030.211950	59.69 **
Error	24	414.202300	17.258429	
Total	31	7625.685950		

$R^2 = 94.57 \%$ C.V. = 11.88 % PROMEDIO = 34.96 cm.
 N.S = No significativo * = Significativo ** = Altamente significativo

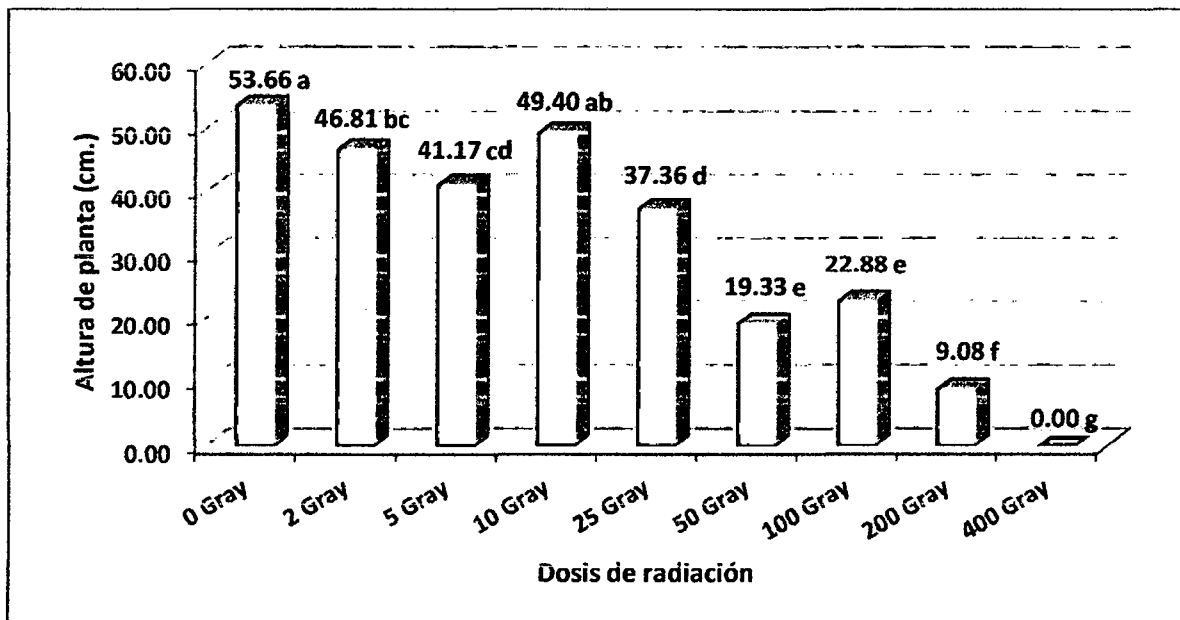


Figura 21: Prueba de Duncan ($p < 0,05$) para la altura de plantas de sachá inchi generadas de semillas irradiadas con rayos gamma.

5.2.2. Diámetro del tallo (mm)

Cuadro 16: Análisis de varianza para el diámetro de tallo (mm) en plantas de sachá inchi generadas de semillas irradiadas con rayos gamma.

Fuente de variación	G.L	S.C	C.M	F cal.
Tratamientos	7	0.00760000	0.00108571	16.29 **
Error	24	0.00160000	0.00006667	
Total	31	0.00920000		

$R^2 = 82.61 \%$ C.V.=1.53 % PROMEDIO= 0.53 mm
 N.S= No significativo *=Significativo **= Altamente significativo

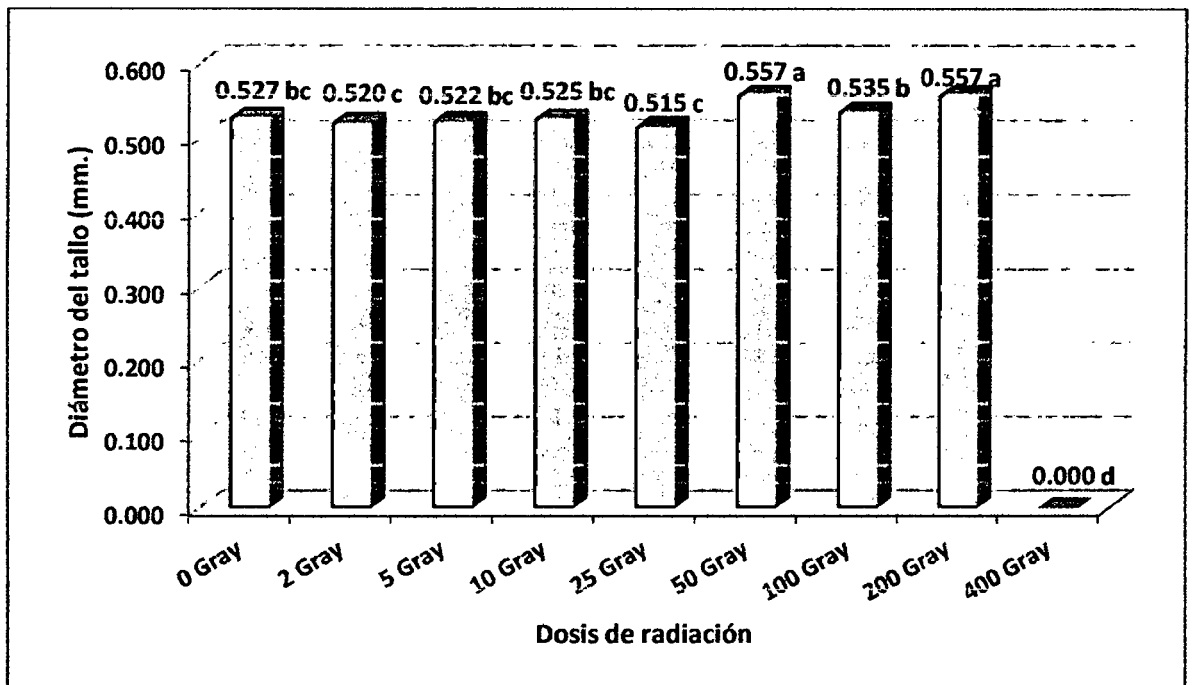


Figura 22: Prueba de Duncan ($p < 0,05$) para el diámetro de tallo en plantas de sachá inchi generadas de semillas irradiadas con rayos gamma.

5.2.3. Número de hojas (n°)

Cuadro 17: Análisis de varianza para el número de hojas en plantas de sachá inchi generadas de semillas irradiadas con rayos gamma.

Fuente de variación	G.L	S.C	C.M	F cal.
Tratamientos	7	0.41282187	0.05897455	3.82 **
Error	24	0.37057500	0.01544063	
Total	31	0.78339687		

$R^2 = 52.67 \%$ C.V.=3.95 % PROMEDIO= 8.92 Hojas.
 N.S= No significativo *=Significativo **= Altamente significativo

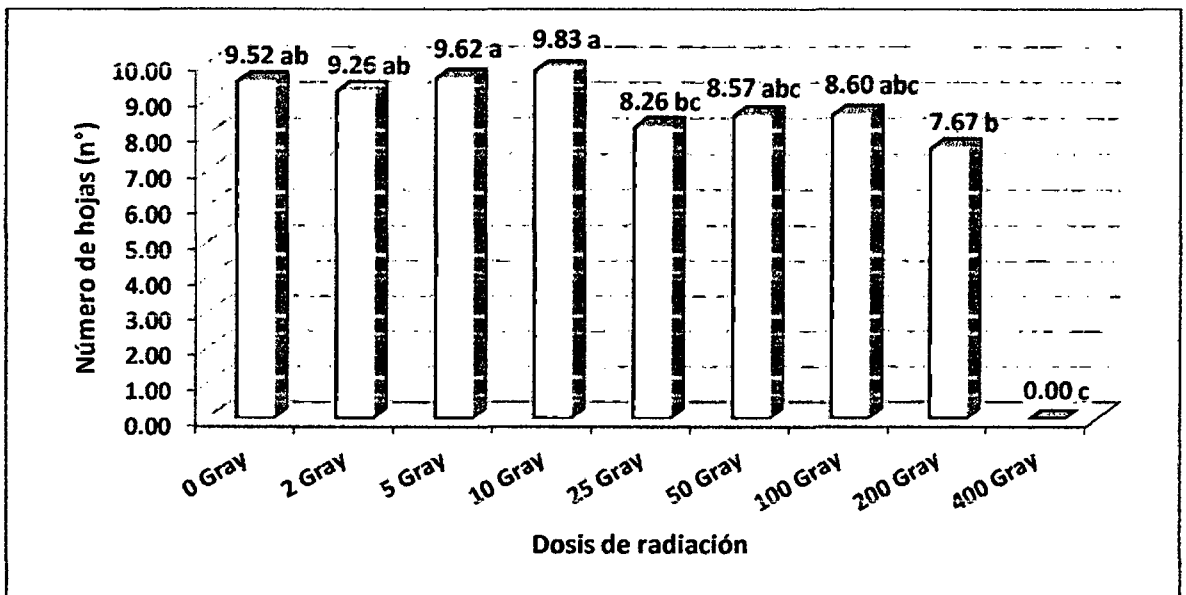


Figura 23: Prueba de Duncan ($p < 0,05$) para el número de hojas en plantas de sachá inchi generadas de semillas irradiadas con rayos gamma.

5.2.4. Longitud de raíces (cm.)

Cuadro 18: Análisis de varianza para la longitud de raíces (cm) en plantas de sachá inchi generadas de semillas irradiadas con rayos gamma.

Fuente de variación	G.L	S.C	C.M	F cal.
Tratamientos	7	155.8018000	22.2574000	26.70 **
Error	24	20.0092000	0.83371670	
Total	31	175.8110000		

R²= 88.62 % C.V.=5.89 % PROMEDIO= 15.50 cm.

N.S= No significativo *=Significativo **= Altamente significativo

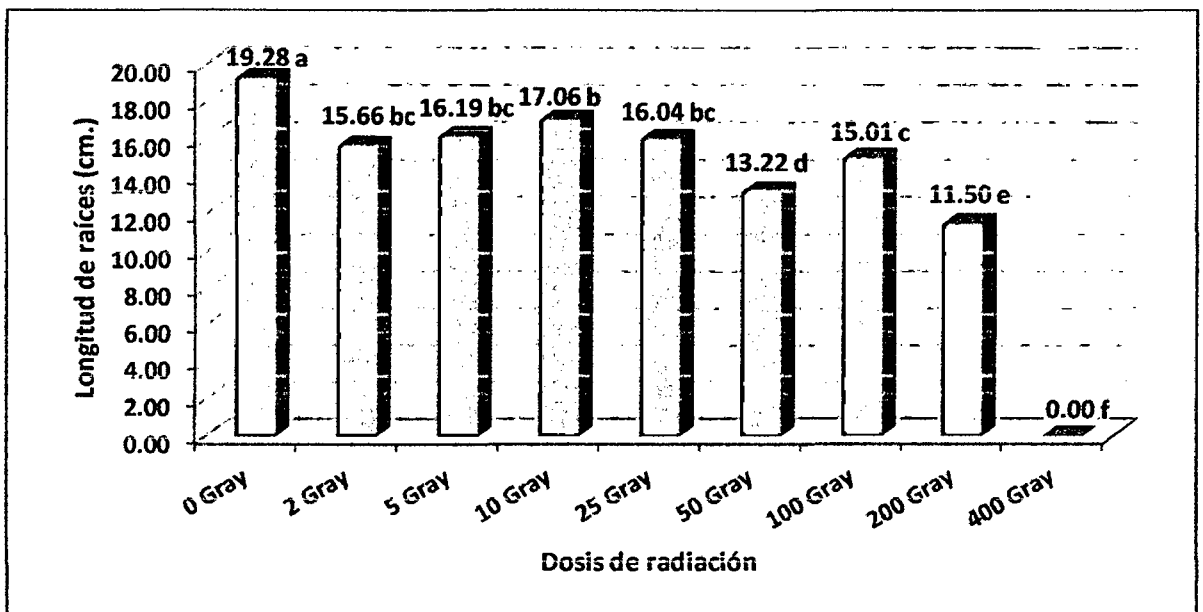


Figura 24: Prueba de Duncan ($p < 0,05$) para la longitud de raíces en plantas de sachá inchi generadas de semillas irradiadas con rayos gamma.

5.3. Análisis molecular mediante marcadores AFLP

5.3.1. Evaluación de la calidad de ADN

En la determinación de calidad de ADN en las muestras de semillas irradiadas de sachá inchi se observa ADN de buena calidad y de concentración aceptable para realizar el análisis AFLP. Se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, comparando las muestras de sachá inchi con un marcador de peso molecular conocido como fago lambda digerido con la enzima PstI (280 ng/ μ l) (Figura 26).

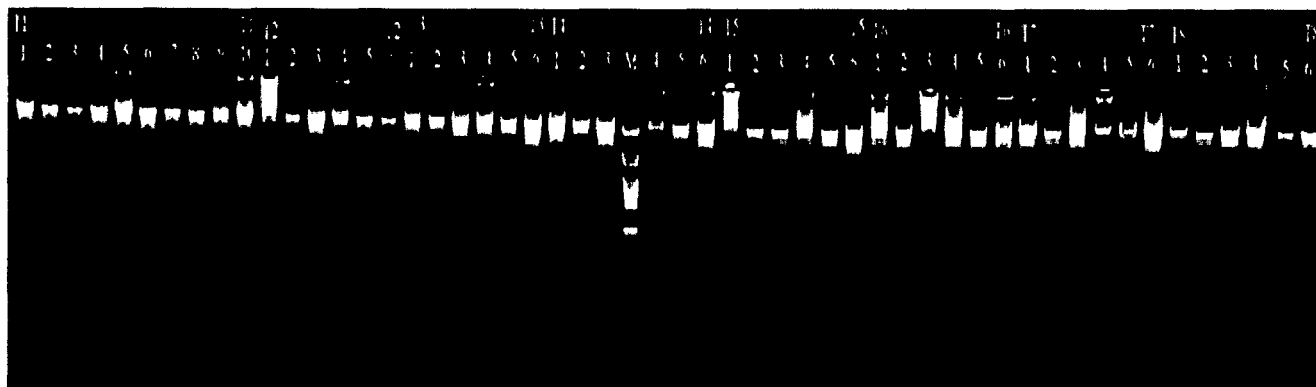


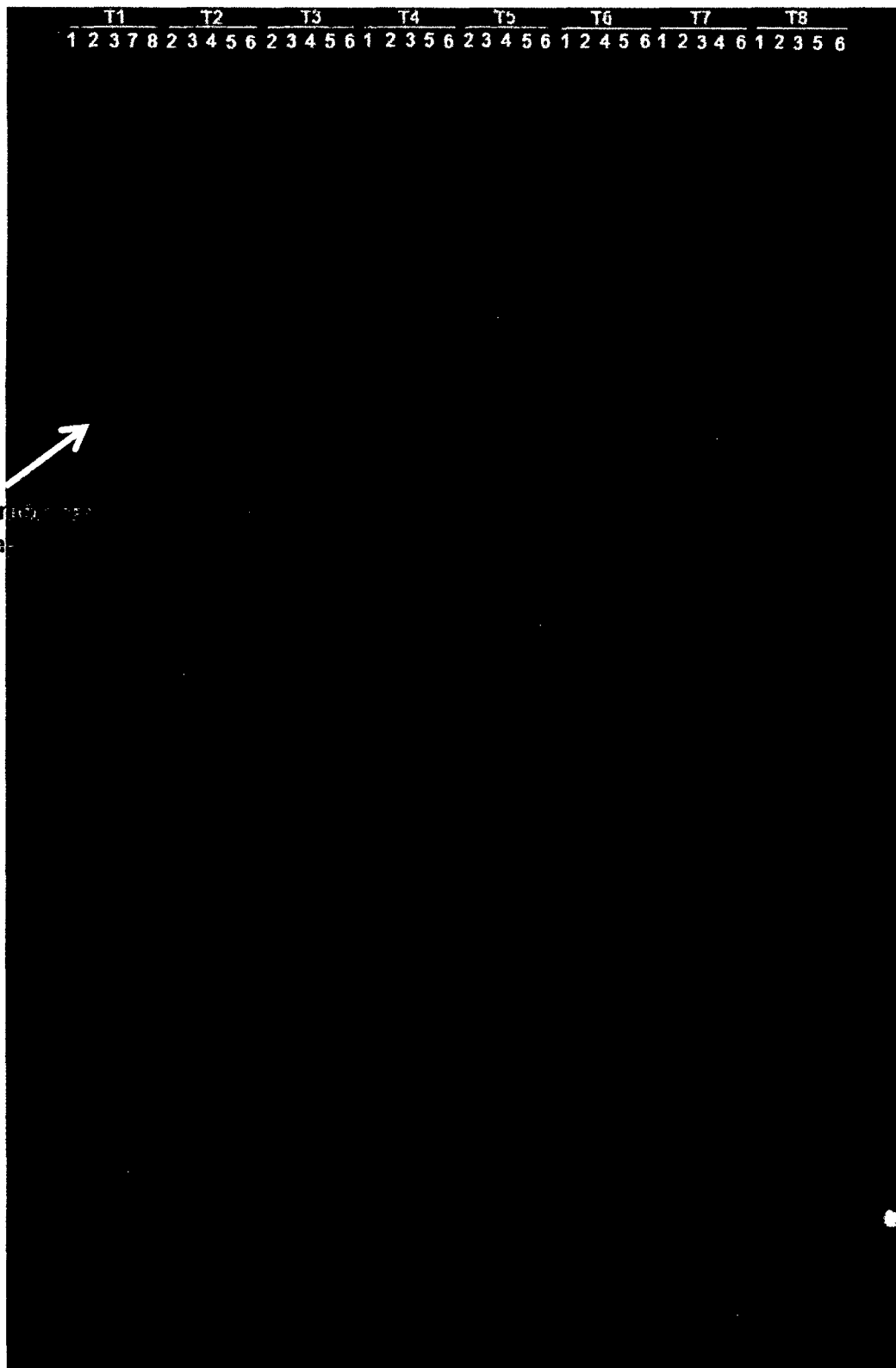
Figura 25. Calidad de ADN extraído de los 52 individuos de sachá inchi. (M: Peso Molecular del fago lambda).

5.3.2. Evaluación mediante marcadores moleculares AFLP

En los gráficos 27, 28, 29 y 30 se muestran los perfiles de las amplificaciones y las bandas generadas en las 40 muestras de sachá inchi en estudio, con cada uno de las combinaciones de 4 primers seleccionados.



Figura 26. Perfil de amplificación de 40 muestras de sachá inchi con la combinación de iniciadores E38 M49



Bandas polimórficas
(Informativa)

Figura 27. Perfil de amplificación de 40 muestras de sachá inchi con la combinación de iniciadores E33/M40.

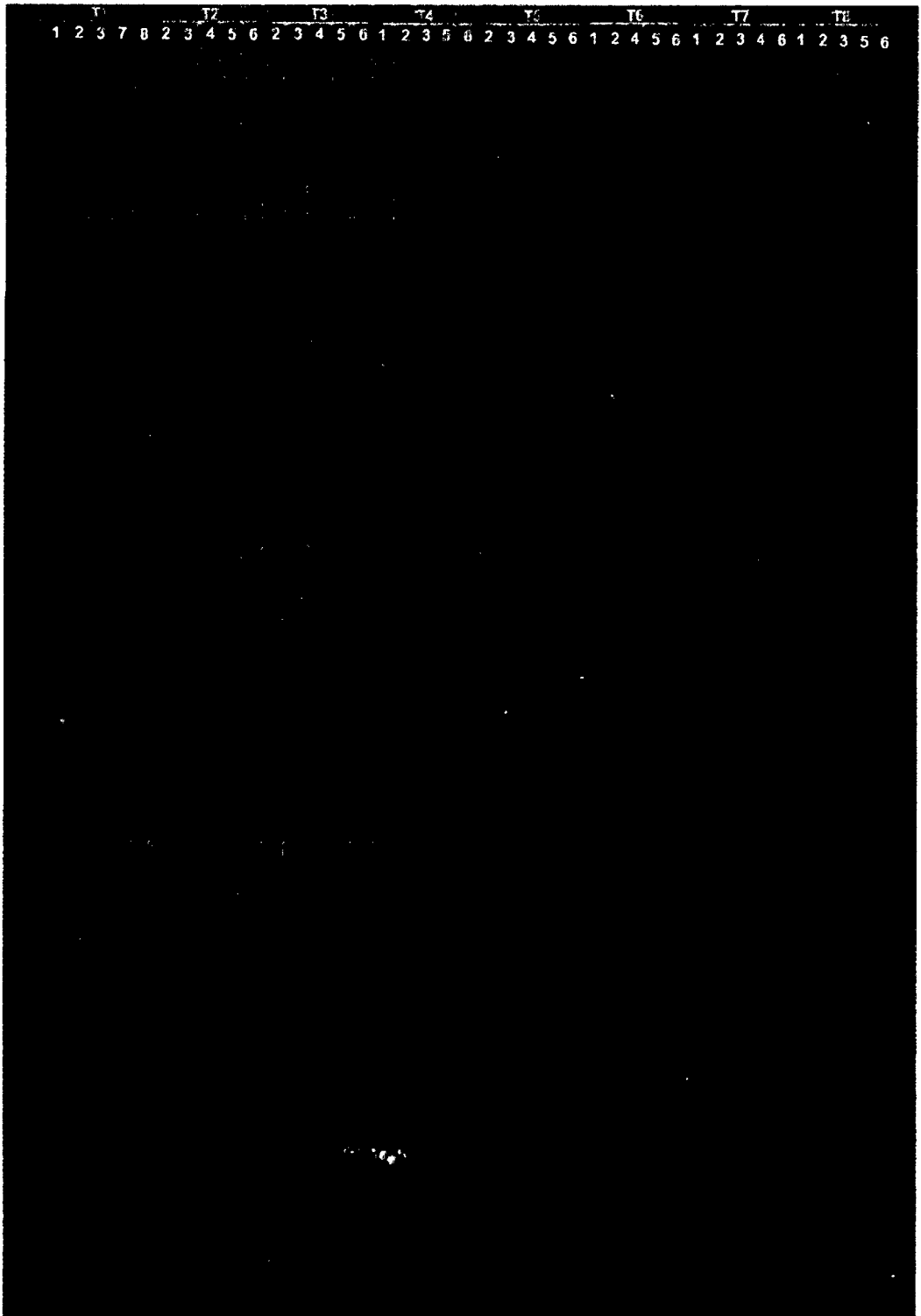


Figura 29. Perfil de amplificación de 40 muestras de Sacha inchi con la combinación de iniciadores **E45/M61**

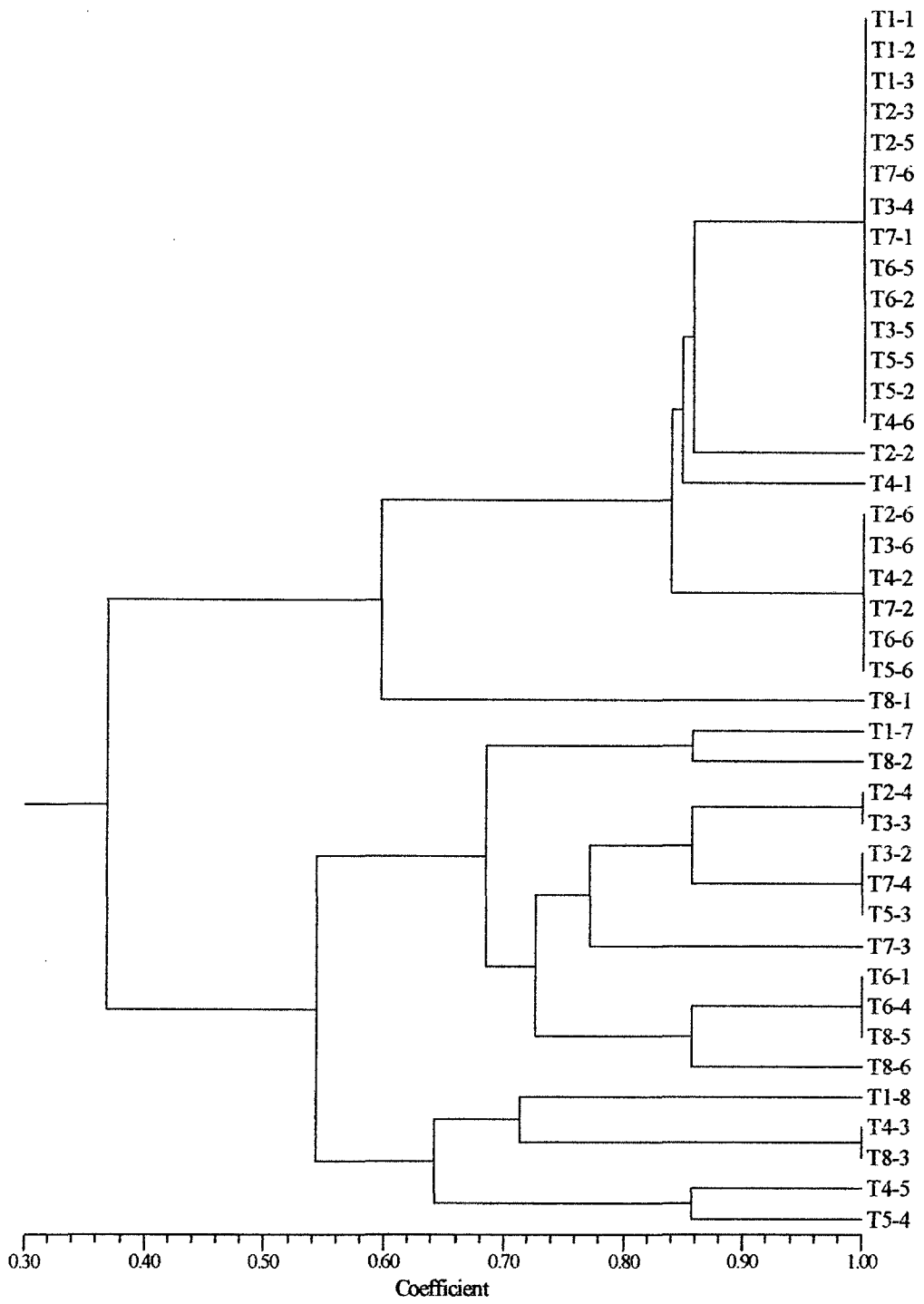


Figura 30. Dendrograma que agrupa las 40 muestras de Sacha inchi.

VI. DISCUSIONES

6.1. Características de los estados fenológicos

6.1.1. Porcentaje de germinación

El análisis de varianza (ANVA) al 5% de error mostrado en el (Cuadro 04), indica que existen diferencias altamente significativas entre los promedios del porcentaje de germinación, mostrando un coeficiente de determinación (R^2) de 78.55% que describe que si existió efecto de las dosis de rayos gamma en las semillas de Sacha Inchi para los resultados obtenidos, así mismo el coeficiente de variabilidad (C.V) fue de 10.33%, resultado que se encuentra entre los rangos aceptables para las evaluaciones en campo (Calzada, 1982).

Para discriminar las mejores dosis de rayos gamma se utilizó la prueba de rango múltiple Duncan al 95% de confiabilidad (Grafico 01), observándose que el T1 (0 gray-Testigo) y T4 (10 gray) con promedios de 100.00% y 98.50% de germinación respectivamente son estadísticamente iguales superando al resto de tratamientos. El T3 (5 gray) y T5 (25 gray) con 96% de germinación promedio y T2 (2 gray) con una germinación promedio de 94% también muestran igualdad estadística pero estas a su vez superan a los tratamientos restantes. El más bajo promedio de germinación se obtuvo en el T8 (200 gray) y T9 (400 gray) con medias de 61.00% y 62.00% respectivamente siendo estos más inferiores que los demás.

Para considerar germinadas, se tomó en cuenta la aparición de la radícula o raíz principal debajo del suelo (sustrato). La variación en los resultados obtenidos para el porcentaje de germinación es visible en las semillas irradiadas y no irradiadas. A medida que la dosis de radiación fue aumentada el poder de germinación disminuyó hasta 61.00%, mientras que el testigo mantuvo su capacidad con 100.00%. Las semillas que lograron germinar a elevadas dosis de radiación mostraron raíces cortas, engrosadas y pocas definidas, por lo que resultaron ser menos vigorosas y no lograron emerger y sobrevivir.

Las altas exposiciones de irradiación usualmente inhiben la germinación de la semilla en especies de cultivos agrícolas y forestales (Akhaury *et al.*, 1993; Thapa *et al.*, 1999), considerando, además que las bajas exposiciones estimulan mayor porcentaje de germinación de semillas (Taylor, 1968; Chauhan, 1978). Las razones de esta estimulación se debe principalmente a la aceleración en las tasas de división celular (Zaka, 2004), así como también a la activación de auxinas (Gunckel y Sparrow, 1991).

La reducción y/o estimulación de la germinación podría haber sido debido al efecto de mutagenos generados en el tejido meristemático de la semilla y la disminución en las dosis más altas pueden ser atribuidas a disturbios a nivel celular (causada ya sea en nivel fisiológico o físico) incluyendo daños y perjuicios cromosomal. Thapa (2004) dieron cuenta de eso en *Pinus kesiya* y *Pinus wallichiana*, en donde el porcentaje de germinación disminuyó con el incremento

de las dosis de rayos gamma. También se reportaron en *J. curcas* (Songsri et al., 2011)

6.1.2. Porcentaje de emergencia

El análisis de varianza (ANVA) que se muestra en el (cuadro 05), nos muestra que al 5% de error existen diferencias altamente significantes entre los promedios del porcentaje de emergencia, debido a que si hubo efecto de las dosis de rayos gamma en las semillas de Sacha Inchi para estos resultados ya que se obtuvo un coeficiente de determinación (R^2) de 94.56% y un coeficiente de variabilidad (C.V) de 9.17% valor aceptable en los rangos de dispersión para las evaluaciones en campo (Calzada, 1982).

Los resultados obtenidos para el comparador DUNCAN al 95% de confianza (Gráfico 02), muestran que el T1 (0 gray) es superior a los demás tratamientos en estudio con un promedio de 100.00% de emergencia. El T4 (10 gray) con 98.00% de emergencia es inferior al T1 (0 gray) pero mayor que los T3 (5 gray) y T5 (25 gray) con 95.00% de emergencia promedio y T2 (2 gray) con 94.00% de emergencia que son a su vez estadísticamente idénticos. Con 42.00% y 14.65% de emergencia los T7 (100 gray) y T8 (200 gray) respectivamente fueron superados ampliamente por el resto de tratamientos convirtiéndose de esta manera en los resultados más bajos obtenidos para esta variable. El T9 (400 gray) no genero plantas emergidas debido a la letalidad de la dosis, ya que la

alta intensidad de radiación atrofió a las semillas causando su muerte y posterior pudrición.

El porcentaje de emergencia de las plantas tratadas demostró una relación bien definida según la tasa de dosis, lo cual decreció con el incremento según la concentración de las mismas. Se consideraron semillas emergidas a aquellas que mostraron un desarrollo del hipocotilo y tallo con la aparición de las primeras hojas verdaderas por encima del suelo (sustrato). En general el desarrollo de las funciones fisiológicas es inversamente proporcional a las dosis empleadas dependiendo de la habilidad de la planta para desarrollar inhibición (Broertjes, 1972 y Eliot, 1964).

Esta disminución de la capacidad de división celular a medida que se aumenta la dosis de radiación se ve reflejada en los resultados obtenidos, ya que los rayos gamma por ser un tipo de radiación ionizante, tienen una alta capacidad de penetración y su acción letal en las células se mide usualmente como pérdida de la actividad mitótica (Ahnström, 1995).

6.1.3. Porcentaje de sobrevivencia

El análisis de varianza en el (cuadro 06) al 5% de error, indica que entre los promedios del porcentaje de sobrevivencia existen diferencias significativas muy altas, mostrando un coeficiente de determinación (R^2) de 83.87% que refiere que si existió relevancia de los efectos causados por los rayos gamma en las semillas de Sacha Inchi, además para el coeficiente de variabilidad (C.V) se obtuvo un

valor de 20.35% que está dentro de los rangos aceptables para las evaluaciones en campo (calzada, 1982).

En el (Gráfico 03), la prueba de comparación DUNCAN al 95% de confiabilidad nos indica que el T1 (0 gray) con 93%, T2 (2 gray) con 84%, T3 (5 gray) con 85%, T4 (10 gray) con 84% y T5 (25 gray) con 81% son los que obtuvieron mayores resultados en el porcentaje de sobrevivencia ya que se muestran estadísticamente iguales, superando a los demás tratamientos en estudio. El tratamiento que obtuvo menor porcentaje de sobrevivencia siendo superado por el resto de tratamientos fue el T8 (200 gray) con 7.00% de promedio. El T9 (400 gray) no generó plantas sobrevivientes debido a la letalidad de la dosis, ya que la alta intensidad de radiación provocó la muerte y posterior pudrición de las semillas.

A pesar de que los tratamientos con las dosis más inferiores de rayos gamma y el testigo son estadísticamente iguales, existe un resultado más alto numéricamente en supervivencia con 93% para el control frente a las semillas que han sido sometidas a radiación. El porcentaje de sobrevivencia fue adversamente afectado por las dosis más altas de rayos gamma, esto quiere decir que las plantas de semillas irradiadas que llegaron a sobrevivir disminuyeron radicalmente con el incremento del nivel de irradiación.

Las radiaciones pueden producir tres tipos de efectos sobre las células una de ellas es el *Efecto de tipo fisiológico* que producen alteraciones químicas de ciertas moléculas que afectan el funcionamiento normal de la célula, llegando a

causar la muerte. Esto debido a que tiene repercusión sobre la síntesis de ADN y se puede alterar mucho la mitosis, produciéndose el aglutamiento y rompimiento de los cromosomas (Swanson, 1958).

6.1.4. Porcentaje de mortalidad

En el (cuadro 07), el análisis de varianza al 5% de error nos permite observar diferencias estadísticas altamente significativas en los resultados obtenidos para el porcentaje de mortalidad, en donde se tiene que el coeficiente de determinación (R^2) con 89.77% indica que las dosis de rayos gamma si tuvo incidencia en los resultados, además el coeficiente de variabilidad (C.V) con un valor de 24.27% nos da a conocer que los datos obtenidos se encuentran en los rangos de dispersión aceptable para las evaluaciones en campo (Calzada, 1982).

La prueba de comparación de medias realizado con el comparador DUNCAN al 95% de confianza en el (Gráfico 04), nos muestra que el T9 (400 gray) y T8 (200 gray) con 100.00% y 93.00% de mortalidad respectivamente son estadísticamente iguales, siendo estos resultados mayores que los demás tratamientos en estudio. Los valores más bajos e inferiores en el porcentaje de mortalidad se encuentran en el T1 (0 gray) con 7.00%, T3 (5 gray) con 15.00%, T2 (2 gray) y T4 (10 gray) ambos con 16.00% y T5 (25 gray) con 19.00%, ya que se muestran estadísticamente iguales.

Las dosis altas de rayos gamma tiene gran potencial en alterar los rasgos de la planta a nivel celular debido a que su longitud de onda de alta frecuencia tienen fotones altos que causan daño a la célula induciendo variantes a nivel fisiológico como la mortalidad. La inhibición de la división celular es una de las reacciones inmediatas a la irradiación, que aparece en seguida, aunque su grado y duración varían con la dosis. Si bien la inhibición de la mitosis puede resultar pasajera, la lesión radiológica que la misma produce a nivel génico y cromosómico puede ser muy letal para las células en división, que en conjunto son muy sensibles a la radiación causando la muerte (Viccini y de Carvalho, 2001).

Además uno de los efectos de las radiaciones sobre las células es el *Efecto de tipo fisiológico* que producen alteraciones químicas de ciertas moléculas que afectan el funcionamiento normal, llegando a causar la muerte. Esto debido a que tiene repercusión sobre la síntesis de ADN alterando mucho la mitosis, produciéndose el aglutamiento y rompimiento de los cromosomas (Swanson, 1958).

Esto se refleja en los resultados obtenidos ya que a medida que hubo un incremento de las dosis, la sensibilidad de las semillas y plantas tratadas fue en crecimiento en donde la lesión radiológica generada se ve manifestada en la letalidad como es el caso del T9 (400 gray) con un resultado de 100 % de mortandad.

6.1.5. Dosis letal media

El análisis de varianza (ANVA) que se muestra en el (Cuadro 08), demuestran que al 5% de error existen diferencias altamente significativas para los valores obtenidos en las dosis letales medias, esto debido a que la variación de los resultados se generó por el efecto de las dosis de rayos gamma en las semillas de Sacha Inchi, reflejado en el coeficiente de determinación (R^2) con 79.40%, además el coeficiente de variabilidad (C.V) con un valor de 18.59% nos indica que los resultados obtenidos están considerados en los rangos aceptables para las evaluaciones en campo (Calzada, 1982).

DUNCAN al 95% de confianza (Gráfico 05), demostró que el T1 (0 gray) con 93.00%, T2 (2 gray) con 89.40%, T3 (5 gray) con 88.43%, T4 (10 gray) con 84.83% y T5 (25 gray) con 84.40% son estadísticamente iguales y que fueron los tratamientos con mejores resultados superando al resto de tratamientos en función a la capacidad de generar más del 50.00% de plantas sobrevivientes (DL50). El T6 (50 gray) con una dosis letal media de 51.58% se encuentra en segundo lugar superando a los tratamientos faltantes. La dosis letal media más baja superada por todos los tratamientos fue el T8 (200 gray) con 19.90%. Finalmente el T9 (400 gray) no generó plantas sobrevivientes debido a la letalidad de la dosis causando la muerte de todas las semillas.

En general los tratamientos que generaron por lo menos el 50% de plantas sobrevivientes con capacidad de regeneración y posterior crecimiento están

entre los rangos de 2 gray y 50 gray de dosis respectivamente. Esto debido a que los tratamientos comprendidos en dichos valores de energía muestran más de la mitad de plántulas generadas después de la irradiación.

La letalidad de las dosis altas de rayos gamma que se observan en los tratamientos que superan los rangos aceptables para la obtención de la DL50 ya que en algunos casos no generó plantas sobrevivientes a pesar de presentar germinación, se debe a que las exposiciones superiores de irradiación pueden causar agravio en semillas (Mehetre *et al.*, 1994) y usualmente las funciones de efectos inhibitorios en semillas de angiospermas y gimnospermas (Akhaury y Singh 1993). También se debe a que la lesión radiológica generada que tiene repercusión sobre la síntesis de ADN alterando mucho la mitosis, produciéndose el aglutamiento y rompimiento de los cromosomas (Swanson, 1958), está provoca la letalidad en las células en división, que en conjunto son muy sensibles a la radiación causando la muerte (Viccini y de Carvalho, 2001).

6.2. Características biométricas (vegetativas)

6.2.1. Altura de planta

El (Cuadro 09), nos muestra el análisis de varianza al 5% de error cuyos resultados señalan que existen diferencias altamente significativas entre los promedios de las alturas obtenidos por tratamientos. Estas a su vez indican que si existió incidencia de la radiación gamma en los resultados obtenidos para altura (cm), debido a que el coeficiente de determinación (R^2) fue de 94.57% y el

coeficiente de variabilidad (C.V.) con 11.82% dan a conocer que los datos obtenidos están dentro del rango de dispersión aceptable para investigación en campo (Calzada, 1982).

Al realizar la prueba de comparación con DUNCAN al 95% de confianza (Gráfico 06), se obtiene que el T1 (0 gray-testigo) con 53.66 cm de altura es mayor al resto de tratamientos en estudio. El que ocupa el segundo lugar con un promedio de 49.40 cm de altura es el T4 (10 gray) superando a su vez a los tratamientos faltantes; también se observa un decrecimiento de altura en el T2 (2 gray) con 46.81 cm, T3 (5 gray) con 41.17 cm, T5 (25 gray) con 37.36 cm y ocupando los más bajos resultados el T7 (100 gray) y T6 (50 gray) con 22.88 y 19.33 cm de altura. El más bajo promedio obtenido superado por todos los tratamientos fue el T8 (200 gray) con 9.08 cm de altura.

La radiación gamma tiene efectos inhibitorios en los rasgos fisiológicos y físicos (Khan y Goyal, 2009). El efecto inhibitorio de los mutágenos en la altura de planta fue evidente debido a la disminución que se generó por causa de un aumento de dosis o concentración de radiación gamma. Esta reducción y el retardo del crecimiento a mayor dosis de radiación gamma, esta atribuida a los efectos mutagénicos provocado en el sistema fisiológico (Gaul, 1977). Otras causas de la reducción en el crecimiento de las plantas están basadas en la destrucción de auxinas, cambios en el contenido de ácido ascórbico y los disturbios fisiológicos y bioquímicos (Srivastava y Tyagi, 1986)

6.2.2. Diámetro de tallo

El análisis de varianza (ANVA) al 5% de error mostrado en el (Cuadro 10), indica que existen diferencias altamente significativas entre los promedios del diámetro del tallo, mostrando un coeficiente de determinación (R^2) de 82.61% que describe que si existió efecto de las dosis de rayos gamma en las semillas de Sacha Inchi para los resultados obtenidos, así mismo el coeficiente de variabilidad (C.V) fue de 1.53%, resultado que se encuentra entre los rangos aceptables para las evaluaciones en campo (Calzada, 1982).

Para la discriminación de las mejores dosis de radiación gamma se utilizó la prueba de rango múltiple Duncan al 95% de confiabilidad (Grafico 07), observándose que el T6 (50 gray) y T8 (200 gray) con promedios de 0.557 mm de diámetro son estadísticamente iguales superando al resto de tratamientos. El T7 (100 gray) con 0.535 mm de diámetro ocupó el segundo lugar en los resultados obtenidos. El T1 (0 gray-testigo) con 0.527 mm, T4 (10 gray) con 0.525 mm y T3 (5 gray) con 0.522 mm de promedio en diámetro respectivamente muestran igualdad estadística superando a su vez a los tratamientos restantes. El más bajo promedio de diámetro de tallo se obtuvo en el T2 (2 gray) y T5 (25 gray) con medias de 0.520 y 0.515 mm respectivamente siendo estos más inferiores que los demás.

Los resultados obtenidos indican que para el diámetro de tallo se genera un efecto congruente frente al incremento de las dosis de radiación gamma, ya que

un comportamiento común de los atributos fenológicos y morfológicos, es presentar tendencias a disminuir sus valores en respuesta al incremento de las concentraciones de radiación gamma, pero frente al grosor de tallo la ley que menciona que todo atributo morfológico y fenológico es inversamente proporcional al incremento de dosis se manifiesta en forma diferente ya que a concentraciones más altas de radiación gamma existe un aumento del diámetro del tallo y para el presente estudio se puede determinar que a mayor incremento de dosis de radiación gamma mayor diámetro de tallo.

6.2.3. Número de hojas

El análisis de varianza (ANVA) que se muestra en el (cuadro 11), nos muestra que al 5% de error existen diferencias altamente significantes entre los promedios para el número de hojas, el coeficiente de determinación (R^2) de 52.67% nos indica que no existió incidencia de la radiación gamma en las semillas de sachá Inchi para el número de hojas. El coeficiente de variabilidad (C.V) mostró un valor de 3.95% que es aceptable para trabajos de investigación en campo por encontrarse dentro del rango de dispersión permitidos (Calzada, 1982).

Al realizar la prueba de comparación con DUNCAN al 95% de confianza (Gráfico 08), se obtiene que el T4 (10 gray) y el T3 (5 gray) son estadísticamente iguales pero diferentes numéricamente con 9.83 y 9.62 números de hojas respectivamente. Ambos tratamientos fueron superiores al resto en los

resultados obtenidos. El T1 (0 gray-Testigo) con 9.52 y el T2 (2 gray) con 9.26 de promedio en números de hojas ocuparon el segundo lugar en los resultados superando a su vez al T7 (100 gray) y al T6 (50 gray) que son estadísticamente iguales con medias de 8.60 y 8.57 en función al número de hojas. Los más bajos resultados se obtuvieron en el T5 (25 gray) con 8.26 números de hojas y el T8 (200 gray) con 7.67 de promedio.

No se puede afirmar que las dosis de rayos gamma en las semillas de Sacha Inchi causaron las diferencias existentes en los valores obtenidos. En consecuencia las diferencias existentes en los resultados para el número de hojas posiblemente fueron generadas por la naturaleza del trabajo y las condiciones y factores externos que se presentaron. Esta teoría es sustentada por el valor obtenido en el coeficiente de determinación que muestra que está por debajo del 70% dando muestra que no hay relevancia de las dosis de radiación gamma en esta variable.

6.2.4. Longitud de raíz

El análisis de varianza en el (cuadro 12) al 5% de error, indica que entre los promedios del porcentaje de sobrevivencia existen diferencias significativas muy altas, mostrando un coeficiente de determinación (R^2) de 88.62% que refiere que si existió relevancia de los efectos causados por los rayos gamma en las semillas de Sacha Inchi, además para el coeficiente de variabilidad (C.V) se obtuvo un

valor de 5.89% que está dentro de los rangos aceptables para las evaluaciones en campo (calzada, 1982).

En el (Gráfico 09), la prueba de comparación DUNCAN al 95% de confiabilidad nos indica que el T1 (0 gray-Testigo) con 19.28 cm de longitud de raíz supera al resto de tratamientos, el T4 (10 gray) con 17.06 cm fue el resultado que ocupó en segunda instancia un mejor resultado frente a los demás tratamientos. El T3 (5 gray) con 16.19 cm, T5 (25 gray) con 16.04 cm y T2 (2 gray) con 15.66 cm de longitud de raíces muestran igualdad estadísticas superando a los tratamientos faltantes. Lo más bajos resultados en longitud de raíz se obtuvieron en el T7 (100 gray) con 15.01 cm, T6 (50 gray) con 13.22 cm y finalmente el T8 (200 gray) con 11.50 cm.

Los resultados reportan que el tratamiento testigo (0 gray) supero en longitud de raíz al resto de tratamientos que fueron sometidos a concentraciones de radiación gamma. Esto indica que las radiaciones tuvo un efecto inhibitorio adverso para las semillas irradiadas, en donde se muestra que las semillas expuestas a más altas dosis produjeron raíces reducidas. Shakoore *et al.*, (1978) y Khalil *et al.*, (1986) atribuyen este decrecimiento como respuesta a que cuando existe mayor intensidad de radiación gamma produce una reducción de la actividad mitótica en el meristema de los tejidos finos además a una notable reducción en el contenido de humedad respectivamente. El soporte a los resultados obtenidos en la presente investigación que menciona una disminución en la longitud de raíz por el incremento de dosis de radiación gamma fueron

reportadas recientemente en otros cultivos por Toker *et al.*, (2005), Kon *et al.*, (2007).

6.3. Análisis molecular

En los gráficos 27, 28, 29 y 30 se muestran los perfiles de las amplificaciones de las 40 muestras de sachá inchi en estudio, con cada uno de las combinaciones de los primers seleccionados. Con las 4 combinaciones analizadas se han registrado 7 marcadores que representan el 6.2% de un total 113 bandas amplificadas de ADN, indicando que se ha generado una moderada variabilidad genética con la inducción de mutaciones mediante rayos gamma. Ninguno de los marcadores fue asociado exclusivamente a un grupo de tratamiento debido a que la inducción de mutaciones fue realizada al azar. Sin embargo, existen grupos de muestras por tratamiento muy similares.

Los distintos tratamientos presentan una moderada variabilidad genética inducida dentro de ellos y entre ellos, considerando que las muestras de semillas irradiadas corresponden a una accesión con alto nivel de homocigosis. Además no se ha asociado marcadores específicos para diferenciar los distintos tratamientos existentes.

Se ha demostrado la inducción de variabilidad genética aplicando radiación gamma mediante marcadores AFLP en *Diospyros kaki* (Naval *et al.*, 2013), mediante marcadores RADP en *Ipomoea batatas* (Dhakshanamoorthy *et al.*, 2011) y mediante marcadores RAM en *Passiflora edulis* (Pabón, 2011).

El análisis de agrupamiento fue realizado con 40 muestras. Según los 7 marcadores AFLP evaluados forman 6 grupos a un coeficiente de similitud de 0.7. El primer grupo está formado por muestras de los tratamientos T1, T2, T3, T4, T5, T6 y T7. El segundo grupo está formado por una muestra de T8. El tercer grupo está formado por una muestra de los tratamientos T1 y T8, El cuarto grupo está formado por los tratamientos T2, T3, T5, T6, T7 y T8. El quinto grupo está formado T1, T4 y T8 y el sexto grupo está formado por una muestra de los tratamientos T4 y T5.

El tratamiento T6 que representa la dosis letal media está distribuido en distintos grupos mostrando una moderada inducción de variabilidad genética. En *Diospyros kaki*, el análisis mediante marcadores AFLP reveló 29.8 % de polimorfismo en la inducción de variabilidad con 20 Gy (Cobalto 60) (Naval *et al.*, 2013).

VII. CONCLUSIONES

- 7.1. Para las variables fenológicas, se tiene que el tratamiento testigo-semillas sin irradiar mostró mejor comportamiento y resultado frente a las semillas irradiadas. De manera tal que los estados de germinación, emergencia y sobrevivencia generaron un descenso en su capacidad fisiológica a medida que se aumentaba la dosis de radiación. En otro sentido los tratamientos que fueron expuestos a más de 25 gray de energía mostraron un descenso en los resultados aumentando de esta forma su mortalidad.
- 7.2. Para las variables biométricas el tratamiento testigo (0 gray) mostró mejores resultados para la variable altura y longitud de raíces. En función a las semillas irradiadas el tratamiento que generó mayor ganancia en altura, número de hojas y longitud de raíces fue el T4 (10 gray). Los demás resultados indican que a medida que la intensidad de radiación gamma va en aumento, se produce una disminución en la capacidad de desarrollo de la planta, excepto en la variable diámetro que los resultados fueron directamente proporcional a las dosis de radiación gamma empleada.
- 7.3. La dosis letal media (DL50), considerando que esto representa más del 50 % de plantas sobrevivientes para las semillas irradiadas, se encuentra en el T6 (50 gray), con un valor de 51.58 % de plantas sobrevivientes.

7.4. El análisis molecular mediante marcadores AFLP muestra que con 4 primers analizados se registró 7 marcadores polimórficos que representa el 6.2 % de un total de 113 bandas amplificadas de ADN, indicando que se ha generado una moderada variabilidad genética con la inducción de mutaciones mediante rayos gamma.

VIII. RECOMENDACIONES

- 8.1.** Evaluar el comportamiento en campo definitivo de las semillas irradiadas que obtuvieron los mejores resultados a nivel de vivero y genético en función a su desarrollo agronómico y productivo.
- 8.2.** Luego de haber establecido la dosis letal media realizar investigaciones morfológicas y genéticas más específicas de los mejores tratamientos seleccionados en grandes poblaciones.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. AHLOOWALIA, B. S.; MALUSZYNSKI, M. 2001. Induced mutations a new paradigm in plant breeding. *Euphytica* 118(2): 167- 173.
2. AHNSTRÖM, G. 1995. Radiobiology. In: Manual on Mutation Breeding. Second Edition. IAEA. FAO. 21-27 p. (Technical Reports Series No 119).
3. AKHAURY, K.D.N. AND A.K. SINGH. 1993. Effect of Gamma-rays on the seed output of *Vicia* species. *Neo Botanic*. 1(1-2): 63-67.
4. ARÉVALO, G. 1995. Informes de Resultados de Investigación. Programa Nacional de Investigación en Recursos Genéticos y Biotecnología E.E. "El Porvenir." Años 1990 – 1995.
5. ARÉVALO, G. 1989-1995. Informes de Resultados de Investigación.
6. ARÉVALO, G. 1989-1996. Informes de Resultados de Investigación. Programa Nacional de Investigación en Recursos Genéticos y Biotecnología. E.E. "El Porvenir". 20 p.
7. AZOFEIFA-DELGADO, 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*. Vol. 17(2): 221-242 pp.
8. BAILEY, L.L. 1949. Manual of cultivated plants. The Mac Millan Co. New York. 118 p.
9. BASSMAN, BJ.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, PM. 1991. Fast and Sensitive Silver Staining of DNA in Polyacrylamide Gels. *Anal. Biochem* 196:80-83.

10. BIBLIOTECA CONMEMORATIVA ORTON, 1987. Bibliografía corta sobre Plukenetia. Euphorbiaceae. Comunicación DC/SIT-55 del 27 de Enero, N° 3242.
11. BLAKE, J. ZAERR, J.B., et al., 1979. Moisture stress to improve cold hardiness and morphology of Douglas- Controlled fir seedings. Forest Science, 25: 576-582.
12. BOREN, A. 1988. Melhoramiento de plantas. Editorial UFV. Brasil.
13. BRACK, A. 1999. Plukenetia volúbilis L. Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. PNUD. Cuzco – Perú. 550 p.
14. BRUNNER, H. 1986. Method of induction of mutations. IAEA. FAO, Austria. 62 p.
15. CACHIQUE, H.D. 2006. Estudio de la Biología Floral Y Reproductiva en el Cultivo De Sacha Inchi (Plukenetia Volubilis L.). Tesis Ing. Agrónomo, Tarapoto, Perú. Universidad Nacional de San Martín. 85p.
16. CALZADA, B. 1982. Métodos Estadísticos para la Investigación.
17. CAMARENA, M.; CHURA, H.; BLAS, S. 2008. Mejoramiento genético y biotecnológico de plantas. Primera Edición. Universidad Nacional Agraria La Molina-Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica. Pg 278.
18. CHAUHAN, YS. 1978. Gamma rays-induced variation in the development of S. khasianum Clarke. J. Indian Bot. Soc. 57:347-352.
19. CHÁVEZ TAFUR-BELLO, I. 1991. Efecto comparativo de diferentes fuentes mutagénicas en cebada (Hordeum vulgare) var. Buenavista. Tesis UNALM – Facultad de Agronomía

20. CORNEJO Y VALLES, 1991. "El Sacha Inchi, Planta Nativa de Importancia Proteica y Aceitera promisorio de la Selva Alta". Separatas 8p.
21. DHAKSHANAMOORTHY, D.; SELVARAJ, R.; CHIDAMBARAM, A.L.A. 2011. Induced mutagenesis in *Jatropha curcas* L. using gamma rays and detection of DNA polymorphism through RAPD marker. C.R. Biologies. 334: 24 - 30.
22. DE ROBERTIS, E.H.F.; HIB, J.; PONZIO, R. Biología Celular y Molecular. 15a ed. Buenos Aire : El Ateneo, 2001 : 470 p.
23. DESMARAIS, E.; LANELUC, I. & LAGNEL, J. 1998. Direct amplification of length polymorphisms (DALP) or how to get and characterize new genetic markers in many species. Nucleic Acids Research, 1998, Vol. 26, 6:1458 - 1465 pp.
24. DOYLE, J.J. & J.L. DOYLE. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.
25. ERHEMBER, G. 1959. Induced Mutation in Plants. Mechanics and Principles. Genétic Agraria pp 369-389.
26. FAO/IAEA, 1991. Plant Mutation breeding for crop improvement Proc. Of Sympium, Viena, 1990; IAEA, Viena.
27. FERREIRA, M.E. & GRATAPAGLIA, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN, 220 pp.
28. FURINI, A. Y WUNDER, J. 2004. Analysis of eggplant (*Solanum melongena*) related germplasm: morphological and AFLP data contribute to phylogenetic interpretations and germplasm utilization. Theor Appl Genet 108: 197-208.

29. GAUL, H. 1977. Mutagen effects observable in the first generation. I. plant injury and lethality, II. Cytological effects, II sterility In: Manual on Mutation Breeding (second edition). IAEA technical report series No. 119, IAEA, Vienna, Austria, pp. 85-99.
30. GILLESPIE, L.J. 1993. A synopsis of Neotropical Plukenetia (Euphorbiaceae) including two new species. Systematic Botany 18 (4): 575 – 592.
31. GRATTAPAGLIA, D. Y FERREIRA, M. 1995. Introducción al Uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético. Brasil- EMBRAPA
32. GUNCKEL, J.E.; SPARROW, A.H. 1991. Ionizing radiation: biochemical, physiological and morphological aspects of their effects on plants. W. Ruland (Ed.), Plant Physiolo. XVI, Springer Verlag, Berlin. pp. 555-611.
33. HAMAKER, B.R.; VALLES, C.; GILMAN, R.; HARDMEIER, R.M.; CLARK, D.; GARCÍA, H.H.; GONZALES, A.E.; KOHLSTAD, I.; CASTRO, M. 1992. Amino Acid and Fatty Acid Profiles of the Inca Peanut (*Plukenetia volubilis* L.), Cereal Chem. Vol. 69:461–463.
34. IAEA, 1995 Manual on Mutation Breeding. International Atomic Energy Agency. Technical Reports. Series N| 119. Vienna. Pp. 33 – 42.
35. INIEA – SUDIRGEB - EEA. “EL PORVENIR, Cultivo de Sacha Inchi_Junio 2006 AVANCES EN IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS DE “SACHA INCHI”, (*Plukenetia volubilis* L.) CON CARACTERÍSTICAS DESEABLES Y SOBRESALIENTES.
36. INNIS, S.M. 1991. Essential fatty acids in growth and development. prog. Lipid res. vol. 30:39-103 pp.

37. ITIS-INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM

<http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=845447> [Consulta:19 de diciembre del 2014 a las 10.30 am]

- 38. KARP, A.; EDWARDS, K. 1998. DNA markers: a global overview. In: G. Caetano-Anollés, P.M. eds. DNA markers: protocols, applications and overviews. Gresshoff. New York. 1-13 pp.**
- 39. KHAN, S. AND S. GOYAL. 2009. Improvement of mungbean varieties through induced mutations. Afr. J. Plant Sci., 3: 174-180**
- 40. KHALIL, S.J.; S. REHMAN.; K. AFRIDI. AND M.T. JAN. 1986. Damage induced by gamma irradiation in morphological and chemical characteristics of barley. Sarhad J. Agric. 2: 45-54.**
- 41. KON, E.; O.H. AHMED.; S. SAAMIN. AND N.M. MAJID. 2007. Gamma Radiosensitivity Study on Long Bean (*Vigna sesquipedalis*). Am. J. Applied Sci. 4(12): 1090-1093.**
- 42. KÖRÖSI, F. & PAL, I. 1987. The effect of ionizing irradiation on plant organism. I. A review. Bull. of the Univ. of Agric Sci. Gödöllő. 1:23**
- 43. KUMAR, A.; MISHRA, MN. 2004. Effect of gamma-rays, EMS and NMU on germination, seedling vigour, pollen viability and plant survival in M1and M2 generation of Okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). Adv. Plant Sci. 17:295-297.**
- 44. LABRADA, R.A. & PÉREZ, S. 1983. Método modificado de Sandwich para la siembra de semillas en condiciones de laboratorio y casa de Cristal. Ciencias Agrícolas. 15:131**

45. MC-BRIDE, J.F. 1951. Euphorbiaceae. In Flora of Perú. Botanical series vol. 13, part. III. Field Museum History, Pág. 115-118.
46. MANCO, E. 2006. INIA (Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria); Subdirección De Recursos Genéticos Y Biotecnología Estación Experimental Agraria "El Porvenir" – Tarapoto. 8p.
47. MANCO, E. 2006. Informe Anual 2005 "Situación y Avances del Cultivo de Sacha Inchi en el Perú". Dirección Nacional de Investigación en Recursos Genéticos y Biotecnología. 30 p.
48. MANCO, E. 2004. sachá Inchi, planta prometidora de la Amazonía Peruana. EL PORVENIR AGRARIO, INIEA – Tarapoto.1 (1):11.
49. MEHETRE, S.S.; C.R. MAHAJAN. AND P.M. DHUMAL. 1994. Effect of different doses of gamma irradiation on germination and survival of soybean. Soybean Genetics Newsletter. 21: 108-112.
50. MILAN, R.D. 1966. Factors Governing Plant Radiosensitive, in: Conference in Radioactives Isotopes in Agriculture. Michigan State University. pp 154-161
51. MOSTACERO, J.; F., MEJÍA & O. GAMARRA. 2002. Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú. Trujillo, Perú: Edit. Normas Legales S.A.C.
52. MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G. & ERLICH, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. Vol. 51:263-273-
53. NAVAJAS, M. & FETON, B. 2000. The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review Experimental and Applied Acarology. 2001 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. Vol. 24: 751–774 pp.

54. NAVAL, M.; ZURIAGA, E.; BADENES, M.L. 2013. AFLP analysis of mutations induced by gamma irradiation in "Rojo Brillante" persimmon. *Acta Horticulturae*. 996: 117-121.
55. NOVAK, F.; H. BRUNNER. 1992. Plant breeding: Induced mutation technology for crop improvement. *IAEA bulletin*, 4: 25-33p.
56. NYBON AND KOCH, A. 1965. Induce Mutations and Breeding Methods in Vegetatively Propagated Plants. The Use of Induced Mutation in Plant Breeding/Report of the FAO/IAEA. Technical Meeting, held. In Rome. 1 Edicion. Pergamos. Press. Pp. 661-667.
57. PABÓN, L.A. 2011. Inducción de mutaciones mediante radiaciones gamma de (*Passiflora edulis* Sim var. *edulis*). Tesis para optar el grado de Magister en Ciencias en Biología – Línea Genética. Universidad Nacional de Colombia. 105 pp.
58. PHILLIPS-MORA, W. 1998. Biología molecular y marcadores moleculares en la agricultura. Memoria II Congreso Nacional de Estudiantes del sector Agropecuario Costarricense. IICA-EARTH-CATIE. 77-87 pp.
59. PHILLIPS-MORA, W.; RODRÍGUEZ, H. & FRITZ, P., 1995. Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Serie técnica. Informe técnico # 252. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 183 pp.
60. PORRAS, M.H. 2005. Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) conocido como "maní del monte". PERUAGRO. Lima, Perú. Año II. Edición V. pp 17 – 19.
61. POWELL, W. 1992. Plant genomes, gene markers, and linkage maps. In: Moss, J. P. ed. *Biotechnology and crop improvement in Asia*. Patancheru, India. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. 297-322 pp.

62. PREDIERI, S.; R.H. ZIMMERMAN. 2001. Pear mutagenesis: In vitro treatment with gamma rays and field selection for productivity and fruit traits. *Euphytica* 3: 217–227p
63. PROGRAMA NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN RECURSOS GENÉTICOS Y BIOTECNOLOGÍA. E.E. "El Porvenir". 20 p.
64. RAGHAVA, R.P. Y RAGHAVA, N. 1989. Effects of gamma irradiation on fresh and dry weights of plant parts in *Physalis L.* *Geobios.* 16:261-264.
65. RALLO, P.; BELAJ, A.; DE LA ROSA, R. & TRUJILLO, I. 2002. Marcadores moleculares (en línea). Córdoba, España. Consultado 1 ago. 2002. Disponible en http://www.extremadura21.com/caudal/hemeroteca/mayo-junio_2000/almazara/almazara1.htm.
66. REIF, JC.; ZHANG, P.; DREISIGACHER, S.; WARBURTON, ML.; GINKEL, M. VAN.; HOISINGTON, D., BOHN, M.; MELCHINGER, AE. 2005. Wheat genetic diversity trends during domestication and breeding. *Theor Appl Genet* 110:859–864
67. RODRÍGUEZ, A.; CORAZON-GUIVIN, M.; CACHIQUE, D.; MEJÍA, K.; DEL CASTILLO, D.; JEAN-FRANÇOIS, R.; GARCÍA-DÁVILA, C. 2010. Diferenciación morfológica y por ISSR (Inter simple sequence repeats) de especies del género *Plukenetia* (Euphorbiaceae) de la Amazonía peruana: propuesta de una nueva especie. *Rev. peru biol.*, vol.17, no.3, p.325-330.
68. ROHLF, F.J. 2000. Statistical power comparisons among alternative morphometric methods. *Amer. J. Phys. Anthropol.*, 111:463-478. #1052

69. ROMERO, M. Y GÓMEZ, L. 1996. Cultivo de la cebada en el Perú, Universidad Nacional Agraria La Molina, Programa de Cereales. Lima – Perú. 43p.
70. SHAKOOR, A.; M. HASSAN.; M. SALEEM.; M.S. SADIQ. AND M.A. HAQ. 1978. Radio-sensitivity in four spring wheat varieties. *The Nucleus*. 15: 23-26.
71. SINGH, B. 1994. Plant Breeding. Principles and Methods. Firth Edition. Kalyani Publishers. Ludhiana, India. 667 p.
72. SNEDECOR, W.; COCHRAN, G. 1980. Statistical methods, 7ed. University Press, Iowa, EE. UU. 507 pp
73. SONGSRI, P.; SURIHARN, B.; SANITCHON, J.; SRISAWANGWONG, S.; KESMALA, T. 2011. Effect of gamma radiation on germination and growth characteristics of physic nut (*Jatropha curcas* L.). *J. Biol. Sci.* 11:268-274.
74. SOUKUP, J. 1987., Vocabulario de los Nombres Vulgares de la Flora Peruana y Catálogo de los Géneros. Editorial Salesiana. Lima – Perú. 436 p.
75. SRIVASTAVA, H.K. AND B.R. TYAGI. 1986. Effects of seed irradiation on yield and quality of essential oil in Palmarosa (*Cymbopogon Martinii* Stapf.) *Euphytica* 35:369–380.
76. STRYER, L. 1988. Bioquímica. New York. 220 pp.
77. SUDIRGEB-INIEA, 2006. Sub Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología (SUDIRGEB), Folleto explicativo.
78. SUTTON, B.; HARMON, P.1971. Fundamentos de Ecología. Serie instrucción programada, LIMUSA. Mexico-293p.
79. TAYLOR, FG. 1968. Some effect of acute gamma radiation in giant sequoia seedlings. *Radiat. Bot.* 8:67-70.

80. THAPA, CB. 2004. Effect of acute exposure of gamma rays on seed germination and seedling growth of *Pinus kesiya* Gord and *P. wallichiana* A.B. Jacks. *Our Nature* 2:13-17.
81. THAPA, CB. 1999. Effect of acute exposure of gamma rays on seed germination of *Pinus kesiya* Gord and *P. wallichiana* A.B. Jacks, *Botanica orientalis. J. Plant Sci.* 120-121.
82. TOKER, C.; B. UZUN.; H. CANCI. AND F.O. CEYLAN. 2005. Effects of gamma irradiation on the shoot length of *Cicer* seeds. *Radiat. Phys. Chem.* 73(6): 365-367.
83. TOSTO, D.S.; AND HOPP, H.E. 2000. Suitability of AFLP markers for the study of genomic relationships within the *Oxalis tuberosa* alliance. *Plant Syst. Evol* 223: 201-209
84. VALLES, C. 1995. Sacha Inchi, Importante Oleaginosa Selvática. *Pura Selva*, p. 40-41.
85. VALLES, C. 1995. El Sacha Inchi, Planta Nativa de Importancia Proteica y Aceitera Promisoria para la Selva Alta. *Separatas* 8p.
86. VARGAS, 2008. "Determinación de la Viabilidad de la Semilla de Sacha Inchi (*Plukenetia Volubilis*) bajo condiciones de almacenamiento en cámara fría y condiciones normales en Tarapoto". 11- 12p.
87. VELA SAAVEDRA LILEY, 1995. Ensayos para la extracción y caracterización de aceite de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) en el departamento de San Martín. Tesis para optar el título profesional de: Ingeniera agroindustrial. Universidad Nacional de San Martín.

88. VICCINI, L.F.; CARVALHO, C.R. 2001. Analysis of gamma radiation induced chromosome variations in maize (*Zea mays* L.). *Caryologia*. 54: 319-327.
89. ZAKA, R.; CHENAL, C.; MISSET, MT. 2004. Effect of low doses of short-term gamma radiation on growth and development through two generations of *Pisum sativum*. *Sci. Total Environ.* 320:121-129.
doi:10.1016/j.scitotenv.2003.08.010.

X. RESUMEN

El estudio buscó generar variabilidad genética por la vía de mutaciones inducidas mediante la técnica nuclear basada en la utilización de radiación gamma. La primera etapa del estudio se realizó en el vivero del Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana, en donde se evaluó las características biométricas y fenológicas de las plantas generadas a través de semillas irradiadas. Previo a la siembra se realizó la dosimetría de las semillas para estimar el tiempo a emplearse para la irradiación de las dosis (tratamiento). Esta irradiación se realizó con la fuente de energía de Radiación Gamma de Cobalto 60. Se utilizaron 100 semillas por tratamiento, en donde las dosis empleadas como tratamientos fueron de 2, 5, 10, 25, 50, 100, 200, y 400 gray de energía respectivamente (8 dosis de radiación y 1 testigo). Posterior a la irradiación, las semillas fueron sembradas bajo un diseño completamente al azar con 4 repeticiones, y los promedios de los resultados fueron sometidos a una prueba de Duncan al 5% para ver las diferencias entre los tratamientos. La segunda etapa consistió en el análisis molecular con Marcadores AFLP (Longitud de Fragmentos Polimórficos de DNA Amplificados), esta consta de cuatro pasos; primero se realizó la extracción del DNA a partir de hojas frescas de sacha Inchi, tomando 5 muestras por tratamiento, utilizando la metodología del CTAB al 2% de Doyle y Doyle (1990), luego se determinó la calidad y concentración del DNA, para después realizar la amplificación vía PCR utilizando 4 Primers y de esta forma finalmente correr las bandas mediante electroforesis en gel de acrilamida. Esta actividad se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina (IBT) en Lima-Perú. Los

resultados obtenidos en las variables fenológicas fueron tomadas de evaluaciones periódicas durante 60 días. Todas muestran diferencias altamente significantes; es así que el tratamiento testigo (semillas sin irradiar), mostró mejor comportamiento y resultado frente a las semillas irradiadas; de manera tal que los estados de germinación, emergencia y sobrevivencia generaron un descenso en su capacidad fisiológica a medida que se aumentaba la dosis de radiación. Así mismo en relación a los tratamientos que fueron expuestos a las radiaciones, el que mostro mejor resultado superando al resto de tratamientos fue el T4 (10 gray). Los tratamientos con dosis mayores a 25 gray de energía mostraron un descenso en los resultados aumentando de esta forma su mortalidad. En las variables biométricas el tratamiento testigo (0 gray) mostró mejores resultados para la variable altura y longitud de raíces, mientras que para las semillas irradiadas el tratamiento que generó mayor ganancia en altura (40.49 cm), número de hojas (9.83 hojas) y longitud de raíces (17.06 cm) fue el T4 (10 gray). Los demás resultados indican que a medida que la intensidad de radiación gamma va en aumento, se produce una disminución en la capacidad de desarrollo de la planta, excepto en la variable diámetro que los resultados fueron directamente proporcional a las dosis de radiación gamma empleada. La dosis letal media (DL50), para las semillas irradiadas, se encuentra en el T6 (50 gray), con una valor de 51.58 % de plantas sobrevivientes. Finalmente el análisis molecular mediante marcadores AFLP muestra que con 4 primers analizados se registró 7 marcadores polimórficos que representa el 6.2 % de un total de 113 bandas amplificadas de ADN, indicando que se ha generado una moderada variabilidad genética con la inducción de mutaciones mediante rayos gamma.

XI. SUMMARY

The objective of the study was to generate genetic variability through mutation induction using gamma rays. The first phase of the study was conducted in the nursery of the Research Institute of the Peruvian Amazon, where was evaluated biometric and phenological characteristics of plants obtained using irradiated seeds. Before planting the seeds was realized dosimetry of the seeds to estimate the time to be used in the irradiation of each treatment. The irradiation was made with gamma rays of Cobalt 60. The experiment had 8 treatments and 1 control (2, 5, 10, 25, 50, 100, 200, y 400 gray) and we used 100 seeds per treatment. The seeds were planted under a completely randomized design with 4 repetitions and the results were subjected to a comparison test of means (Duncan = 5%). The second phase consisted in the molecular analysis with AFLP markers (Amplified fragment length polymorphism). This phase involved 4 steps: (1) DNA extraction was made from fresh leaves of sachá inchi, taking 5 samples per treatment, using the methodology of CTAB 2% (Doyle & Doyle, 1990); (2) determination of DNA quality and concentration; (3) PCR amplification using 4 primers and (4) polyacrylamide gel electrophoresis. This activity was conducted in the Molecular Biology Laboratory of the Biotechnology Institute (IBT) of the La Molina National Agrarian University – Lima. The results obtained in the phenological variables were taken from periodic evaluations for 60 days. All treatments show highly significant differences and the control (non-irradiated seeds) showed better performance and results in comparison to irradiated seeds; so the germination, emergence, survival and physiological capacity of the plants decreased with increasing radiation dose.

In relation to the treatments that were exposed to radiation, the one that showed better results surpass all other treatments was T4 (10 gray). Treatments with doses greater than 25 gray increasing mortality showed a decline in the results. In the biometric variables, the control treatment (0 gray) showed better results for the variable height and length of roots, while for the seeds irradiated, the treatment that generated greater gain in height (40.49 cm), number of leaves (9.83 leaves) and root length (17.06 cm) was T4 (10 gray). Other results indicate that when the intensity of gamma radiation is increasing there is a decrease in the ability of plant development, except in the diameter of plants that the results were directly proportional to the dose of gamma radiation used. The median lethal dose (DL50) to the irradiated seeds is in the T6 (50 gray), with a value of 51.58% of surviving plants.

Finally, molecular analysis using AFLP markers shows that with 4 primers analyzed were obtained 7 polymorphic markers representing 6.2% of a total of 113 DNA bands amplified, indicating the generation of a moderate genetic variability through mutation induction by gamma rays.

ANEXOS

Cuadro 19: Posibles características mutagénicas encontradas en plantas de sachá inchi

EFFECTOS MORFOLÓGICOS EN PLANTAS GENERADAS POR LAS RADIACIONES	TRATAMIENTO
Necrosamiento del brote principal	* T2,T6
Encrespamientos de hojas	* T2, T3,T4,T5,T6,T7,T8
Yema apical atrofiada	* T4,
Inducción de brotes laterales	* T4,T6
Achaparramiento de planta	* T5,T6,T7,T8
Talios deformados	* T5,T7
Engrosamiento de tallo	* T6,T7,T8
Elongación de hojas	* T6,T7,T8
Bifurcación de la yema apical	* T6,T7
Inducción de tres guías principales	* T6

T2=2 gray; T3=5 gray; T4=10 gray; T5=25 gray; T6=50 gray; T7=100 gray; T8=200 gray

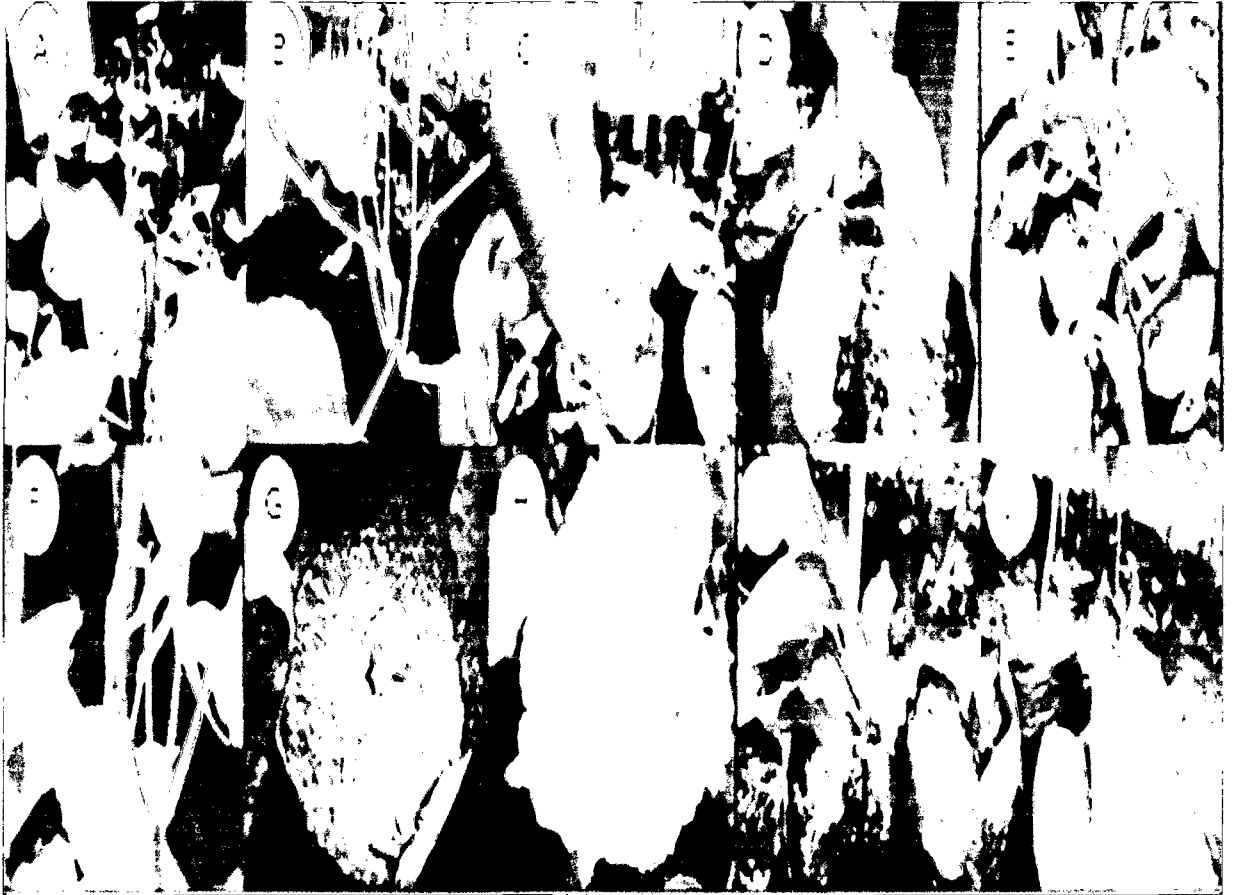


Figura 31: Efectos morfológicos en plantas generadas por las radiaciones:
Bifurcación de la yema apical (A), Inducción de brotes laterales (B), Yema apical atrofiada (C), Engrosamiento de tallo (D), Tallos deformados (E), Inducción de tres guías principales (F), Achaparramiento de planta (G), Encrespamientos de hojas (H), Elongación de hojas (I), Necrosamiento del brote principal (J).