



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-  
NoComercial-CompartirIgual 2.5 Perú](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/).

Vea una copia de esta licencia en  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>

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



**TESIS**

**“ESTUDIO DE LA PLOIDÍA EN *Plukenetia volubilis* L,  
(SACHA INCHI)”**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**PRESENTADO POR EL BACHILLER:**

**MANUEL ALEJANDRO BORBOR TORRES**

**TARAPOTO – PERÚ**

**2010**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN – TARAPOTO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL**  
**ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA**  
**ÁREA DE MEJORAMIENTO Y PROTECCIÓN DE CULTIVOS**

**TESIS**

**“ESTUDIO DE LA PLOIDIA EN *Plukenetia volubilis* L,  
(SACHA INCHI)”**


**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**ASESORES**


  
-----  
**ING. MARIA EMILIA RUIZ SÁNCHEZ**  
**ASESOR**

  
-----  
**ING. GLORIA ARÉVALO GARAZATÚA**  
**COASESOR**

**MIEMBROS DEL JURADO**

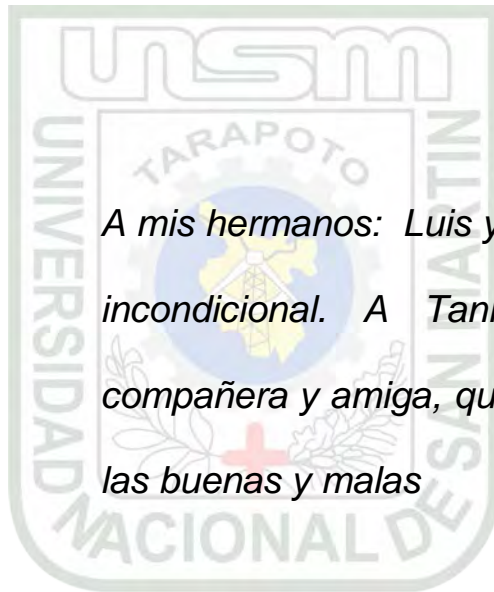
  
-----  
**ING. M.Sc. GUILLERMO VÁSQUEZ RAMÍREZ**  
**PRESIDENTE**

  
-----  
**ING. ELÍAS TORRES FLORES**  
**SECRETARIO**

  
-----  
**ING. JORGE LUIS PELAEZ RIVERA**  
**MIEMBRO**

## DEDICATORIA

*A mis padres: Pedro Tercero Borbor Perez y Cora Luisa Torres Pinedo por su cariño, apoyo y comprensión, mi eterna gratitud.*



*A mis hermanos: Luis y Pedro por su apoyo incondicional. A Tania, mi enamorada, compañera y amiga, quien esta presente en las buenas y malas*

## AGRADECIMIENTOS

1. **Innovación y Competitividad para el Agro Peruano - INCAGRO**, por financiar el Subproyecto “Generación de líneas élites de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) de alta productividad, con altos contenidos de aceites omega y tolerantes a nemátodos (*Meloidogyne* sp) para su cultivo en la región amazónica”, dentro del cuál se pudo desarrollar el presente trabajo de investigación.
2. **Instituto Nacional de Innovación Agraria INIA**, profesionales, técnicos, y personal de campo que labora en la Estación Experimental Agraria “El Porvenir”, por el apoyo brindado durante el desarrollo del presente trabajo de Investigación.
3. **Instituto de Cultivos Tropicales – ICT**, como Alianza Estratégica del Subproyecto, por la disposición de sus laboratorios.
4. **Universidad Nacional de San Martín**, por la disposición de sus laboratorios la cual me permitió realizar ensayos preliminares.
5. A la ingeniera **Gloria Arévalo Garzatúa**, coordinadora técnica y especialista en mejoramiento genético del cultivo de sachá inchi, de la Estación Experimental Agraria “El Porvenir” - INIA, por haberme brindado la oportunidad de realizar el presente trabajo de investigación bajo su asesoramiento, y permitirme conocer más a fondo el cultivo de sachá inchi.

## INDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
III. REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1. Generalidades sobre <i>Plukenetia volubilis</i> L.	4
3.1.1. Origen y distribución geográfica	4
3.1.2. Descripción taxonómica	6
3.1.3. Descripción botánica	6
3.1.4. Periodo vegetativo del cultivo de sacha inchi	7
3.1.5. Mejoramiento genético e información sobre selecciones de ecotipos de sacha inchi	8
3.1.6. Utilización y perspectivas	9
3.1. Generalidades sobre estudios citológicos.	11
3.2.1. División sin reducción: Mitosis	11
3.2.2. División con reducción: Meiosis	12
3.2.3. Definición de cromosomas	14
3.2.4. Composición química y estructura de los cromosomas	14
3.2.5. Morfología de los cromosomas	17
3.2.6. Constantes cromosómicas	18
3.2.7. Cariotipo: idiograma	19
3.2.8. Variaciones de la estructura de los cromosomas	20
3.2.9. Variación en el número cromosómico	21
3.2.10. Efectos de la poliploidía en el fenotipo	23
3.2.11. Origen de los poliploides	25
3.2.12. Factores que promueven la poliploidía	28
3.2.13. Extensión e importancia de la ploidía en las plantas cultivadas	28
3.2.14. Estudios de cromosomas en vegetales	31
3.2.15. Generalidades del conteo cromosómico	34

	<b>Pág.</b>
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	48
4.1. MATERIALES	48
4.1.1. Material vegetal	48
4.1.2. Materiales de laboratorio	50
4.2. METODOLOGÍA	52
4.2.1. Ubicación del campo experimental	52
4.2.1.1. Ubicación geográfica	52
4.2.1.2. Ubicación política	53
4.2.2. Conducción del experimento	53
4.2.2.1 Cosecha y secado	53
4.2.2.2. Siembra	54
4.2.2.3. Obtención de raíces	56
4.2.2.4. Hora de colección	57
4.2.2.5. Determinación de la técnica para el contaje de cromosomas	60
1. Prefijadores	60
2. Fijación	61
3. Hidrólisis	62
4. Tinción	62
5. Aplastado o squash	63
6. Observación	64
4.2.3. Parámetros evaluados	65
1. Determinación de la hora de colección	65
2. Determinación de concentraciones de prefijadores para el contaje cromosómico.	65
3. Determinación del número cromosómico	66
4.2.4. Análisis Estadístico	68
V. RESULTADOS	69
5.1. Obtención de raíces	69
5.2. Hora de colección	69
5.3. Prefijadores	73

5.4. Número cromosómico	76
	<b>Pág.</b>
VI. DISCUSIONES	81
6.1. Hora de colección	81
6.2. Prefijadores	81
6.3. Fijador	83
6.4. Hidrólisis	83
6.5. Tinción	84
6.6. Número cromosómico	84
VII CONCLUSIONES	87
VIII RECOMENDACIONES	88
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
RESUMEN	
SUMMARY	
ANEXOS	





## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Pág.</b>
Cuadro N° 01: Duración de las fases de desarrollo de sachá inchi	8
Cuadro N° 02: Contenido de proteínas y ácidos grasos en sachá inchi y otras Oleaginosas	10
Cuadro N° 03: Material genético estudiado	48
Cuadro N° 04: Prefijadores evaluados	61
Cuadro N° 05: N° cromosómico con > y < frecuencia en <i>P. volubilis</i> y <i>P. huayllabambana</i>	76

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

	<b>Pág.</b>
Gráfico N° 01: Secuencia del ciclo celular en <i>Plukenetia volubilis</i> L.	70
Gráfico N° 02: Secuencia de los índices de fases de <i>Plukenetia volubilis</i> L. (Profase)	71
Gráfico N° 03: Secuencia de los índices de fases de <i>Plukenetia volubilis</i> L. (Metafase)	71
Gráfico N° 04: Secuencia de los índices de fases de <i>Plukenetia volubilis</i> L. (Anafase)	71
Gráfico N° 05: Secuencia de los índices de fases de <i>Plukenetia volubilis</i> L. (Telofase)	71
Gráfico N° 06: Prefijación con colchicina a 2, 4, 6 y 8 horas	73
Gráfico N° 07: Prefijación con 8-Hidroxiquinolina a 2, 4, 6 y 8 horas	74
Gráfico N° 08: Prefijación con agua destilada helada a 2, 4, 6 y 8 horas	75
Gráfico N° 09: Número de cromosomas observados en 10 accesiones promisorias de <i>Plukenetia volubilis</i> L. y 02 ecotipos silvestres: Apangurayacu ( <i>Plukenetia volubilis</i> L.) y Lamas ( <i>Plukenetia huayllabambana</i> )	80

## I. INTRODUCCIÓN

*Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” es una oleaginosa de la familia Euphorbiaceae, en el Perú se encuentra en los departamentos de San Martín, Ucayali, Amazonas, Madre de Dios, Junín, Cuzco, Huánuco y Loreto.

El cultivo de sacha inchi a tomado importancia económica en los últimos años, dado a su excelente potencial agroindustrial, debido a su alto contenido de grasas insaturadas (omega 3, 6 y 9), proteínas y vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles), en cantidades elevadas, en comparación con otras oleaginosas.

El Instituto Nacional de Investigación Agraria-INIA “El Porvenir”, desde 1988 viene realizando trabajos de investigación en sacha inchi a través de la Sub Dirección de investigación en Recursos Genéticos y Biotecnología – SUBDIRGEB y el Programa Nacional de Investigación de Cultivos Agroindustriales; manteniéndose alrededor de 52 accesiones de *P. volubilis*, recientemente colectados 19 ecotipos silvestres de *P. volubilis* y 01 de *Plukenetia huayllabambana* en diferentes zonas agroecológicas del Perú; priorizándose la caracterización morfológica y evaluación de dicho material genético, no contándose con la caracterización a nivel citogenético del material colectado y conservado; para tener mejores herramientas en el conocimiento y caracterización citogenética del cultivo, con fines de manejo de germoplasma y posteriores estudios de mejoramiento genético.

Para determinar el número de cromosomas se necesita contar con una técnica citológica adecuada que brinde preparaciones que posean células metafásicas con los cromosomas bien distribuidos y que muestren su morfología. No existe

técnica citológica universal, generalmente las diferentes especies tienen sus propias exigencias y no responden igual a una determinada técnica, por lo tanto desde el punto de vista funcional es conveniente que cada laboratorio desarrolle su propia técnica (Blas *et. al*, 1996).

Al no tener referencias sobre su citogenética, por ser *Plukenetia volubilis* una especie promisoría, cuyo interés se ha desarrollado recientemente, desconociéndose su número cromosómico y consecuentemente su nivel de ploidía, se fijó como objetivo de estudio de la presente investigación: determinar los niveles de ploidía, índice mitótico y número cromosómico de las especies, así como estandarizar la metodología del conteo cromosómico de *Plukenetia volubilis* L.; en el marco del Sub proyecto “Generación de líneas élites de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) de alta productividad, con alto contenido de aceites omega y tolerantes a nemátodos (*Meloidogyne* sp) para su cultivo en la región amazónica” financiado por INCAGRO ( Innovación y Competitividad para el Agro Peruano).

## II. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general.

Determinar los niveles de ploidía de 10 accesiones de la Colección Nacional de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) de la Estación Experimental Agraria “El Porvenir” y 02 ecotipos silvestres colectadas en la provincia de Lamas.

### 2.2. Objetivos específicos.

2.2.1 Determinar la hora de colección de ápices radiculares en las distintas etapas de la mitosis en preparaciones citológicas de *Plukenetia volubilis* L.

2.2.2 Estandarizar la metodología de contaje de cromosomas en *Plukenetia volubilis* L. y *Plukenetia huayllabambana*.

2.2.2 Determinar el número de cromosomas en *Plukenetia volubilis* L. y en la especie *Plukenetia huayllabambana*.

### III. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1 Generalidades sobre *Plukenetia volubilis* L.

##### 3.1.1 Origen y distribución geográfica.

**Guillespie (1993), Jiménez (1993), Webster (1994) y Missouri Botanical Garden (2007)**, citados por **Manco (2008)**, indican que el sachá inchi pertenece a la familia euphorbiaceae, género *Plukenetia*; el cual comprende 17 especies que están distribuidas en Centroamérica, América del Sur, África, Madagascar y Asia.

**Missouri Botanical Garden (2007)**, mencionado por **Manco (2008)**, reporta en el Perú la existencia de 6 especies de *Plukenetia*; *P. volubilis* L.; *P. lorentensis* Ule.; *P. brachybotrya* Muell. Arg.; *P. penninervia* Muell. Arg.; *P. polyadenia* Muell. Arg. y *P. verrucosa* Sm.; siendo *P. volubilis* la especie con importancia económica dado su excelente potencial agroindustrial.

**Bussmann et al. (2009)**, indica que *Plukenetia huayllabambana* R. W. Bussmann, C. Téllez & A. Glenn sp. Nov. es descrita una especie de *Plukenetia* de la Amazonía Peruana; parece ser endémica en zonas rocosas en la selva densa de la región de Mendoza. La especie es similar a *Plukenetia volubilis* L., una especie ampliamente conocida del Caribe y América Latina y *Plukenetia stipellata* L.J.Gillespie, el cual es solo conocida en América Central, ambas especies sólo crecen cerca a los 1200 m.s.n.m., mientras que *Plukenetia huayllabambana* a sido sólo

encontrado encima de los 1300 m.s.n.m. La nueva especie es diferente en su número mínimo de estambres, frutos y semillas grandes.

**Manco (2008)**, menciona que *Plukenetia volubilis* L. posiblemente fue cultivada por los Incas desde hace 3000 a 5000 años al haberse encontrado en la costa peruana, en tumbas incaicas, huacos fitomorfos que representan al fruto y a la planta trepadora que fue llevada del antisuyo (selva) durante el imperio incaico. En el Perú se le encuentra en estado silvestre, y tiene un rango de distribución tanto en selva baja como en selva alta; se le encuentra en diversos lugares de Amazonas, Cajamarca, San Martín, Ucayali, Huánuco, Junín, Pasco, Loreto, Cusco y Madre de Dios. En San Martín se encuentra en toda la cuenca del Huallaga, en la provincia de Lamas, en los Valles de Sisa y del Ponaza, en Alto Mayo y Bajo Mayo, Shanusi y Pongo de Cainarachi. Su territorio se extiende desde los 30 m.s.n.m. hasta los 2110 m.s.n.m.

### 3.1.2 Descripción taxonómica.

**Mcbride (1951)**, citado por **Vela (1995)**, indica la siguiente clasificación:

Reyno	:	Vegetal
División	:	Spermatophyta
Sub división	:	Angiospermae
Clase	:	Dicotiledónea
Orden	:	Euphorbiales
Familia	:	Euphorbiaceae
Genero	:	<i>Plukenetia</i>
Especie	:	<i>volubilis</i> L.

**Arévalo (1996)**, menciona que la especie *P. volubilis* L., es conocida de acuerdo al idioma o lugar con los siguientes nombres: sachá inchi, sachá inchi, sachá maní, maní del monte, maní del inca, inca peanut.

### 3.1.3 Descripción botánica.

**Field Museum S.A. y Valles (1990)**, mencionados por **Arévalo (1996)**, indican que el sachá inchi es una planta voluble semileñosa y perenne que alcanza una altura de 2 m aproximadamente. Sus hojas son alternas, acorazonadas, puntiagudas de 10 a 12 cm de largo y de 8 a 10 cm de ancho, con peciolo de 2-6 cm de largo. Las nervaduras nacen en la base de la hoja, orientándose la

nervadura central hacia el ápice. Por lo general los bordes son dentados.

**Arévalo (1990-1995) y Valles (1992)**, mencionados por **Arévalo (1996)**, indican que en la base de la hoja, mayormente justo al inicio del pedúnculo, muchas presentan una estípula. Las flores masculinas son pequeñas, blanquecinas y dispuestas en racimos. En la base del racimo y lateralmente, se encuentran una a dos flores femeninas. Los frutos son cápsulas de 3 a 5 cm de diámetro, dehiscentes, de color verde que cuando maduran se ponen de un color marrón negruzco. Usualmente están formados por cuatro cápsulas, algunos frutos presentan de cinco, a siete cápsulas. Dentro de las cápsulas se encuentran las semillas de color marrón-oscuro, con nervaduras notorias, ovals de 1,5 a 2 cm de diámetro y de 48 a 100 g de peso, ligeramente abultada en el centro y aplastada hacia los bordes, con un hileum bien diferenciado. Al abrirla encontramos los cotiledones a manera de almendras y cubiertos de una película blanquecina. En condiciones de medio ambiente y al aire libre, la semilla se conserva por más de un año.

#### **3.1.4 Periodo vegetativo del cultivo de sacha inchi**

Según **Manco (2008)**, la duración de las fases de desarrollo del cultivo de sacha inchi en dos sistemas de siembra se detalla en el cuadro N° 01.



**Cuadro N° 01:** Duración de las fases de desarrollo de sachá inchi

Fases de desarrollo	Siembra directa (d.d.s)	Siembra indirecta	
		Almácigo (d.d.a.)	Transplante (d.d.t.)*
Germinación	14 a 16	11 a 14	.....
Emisión de guías	48 a 50	.....	20 a 41
Inicio de floración	88 a 135	.....	86 a 139
Inicio de fructificación	122 a 168	.....	119 a 182
Inicio de cosecha	180 a 220	.....	202 a 249

\*Trasplante a los 45 d.d.a.

(d.d.s.) = Días después de la siembra.

(d.d.t.) = Días después del trasplante.

(d.d.a.) = Días después del almácigo.

### 3.1.5 Mejoramiento genético e información sobre selecciones de ecotipos de sachá inchi.

**Arévalo (1996)**, manifiesta que las investigaciones del cultivo de “sachá inchi” o “mani del monte”, se inician en 1988, por el Programa Nacional de Investigación en Recursos Genéticos y Biotecnología, de la Estación Experimental “El Porvenir”, en la línea de Mejoramiento Genético, con recolección de información sobre diversos usos y modalidades del cultivo, así como colección y evaluación de ecotipos de *Plukenetia volúbilis* L.

**Cachique (2005)**, indica que la polinización cruzada (Alogamia) es el sistema más eficiente de reproducción, el cual nos indica que existe una alta variabilidad genética en *Plukenetia volúbilis* L. mas

aún si se trata de un campo en condición de monocultivo (Banco de germoplasma).

**Arévalo (1990 -1995)**, mencionado por **Arevalo (1996)**, señala que el germoplasma básico de "sacha inchi" (*Plukenetia volubilis* L.) con que cuenta la Estación Experimental "El Porvenir", está constituido por 72 accesiones recolectadas en diferentes zonas agroecológicas de San Martín y la Región Amazonas, incluyendo localidades del Trapecio Amazónico y tramos fronterizos con Brasil y Colombia. Debido a su alta variabilidad genética de este material, se han seleccionado los ecotipos: Pinto Recodo, Tambo Yaguas, Muyuy y Río Putumayo, que alcanzaron los más altos rendimientos de semilla en el primer año de evaluación, con tutores vivos, podas agresivas y bajo condiciones de suelo y clima no muy adecuados para el cultivo. La Estación Experimental "Calzada" y en la Estación Experimental Pucallpa, de los ecotipos evaluados Pinto Recodo, y Cumbaza fueron los sobresalientes en rendimiento de semilla seca. El sacha inchi presenta una variabilidad muy amplia, observándose ecotipos que difieren grandemente en área de follaje, tamaño y forma de sus hojas, semillas, así como en su capacidad de producción por planta y contenidos de aceite de grano.

### **3.1.6 Utilización y perspectivas**

**Arévalo (1996)**, indica que el "Sacha inchi" es un producto de consumo muy popular en la población nativa y mestiza de algunas

áreas rurales de San Martín. La semilla actualmente se consume tostada, cocida con sal, en confituras (turrón), en mantequilla y como ingrediente de diversos platos típicos como: inchi cucho (ají con maní), lechona api (mazamorra de plátano con maní), inchi capi (sopa de gallina con maní o sopa de res con maní), en los cuales reemplaza al maní. En algunos lugares se obtienen aceites en forma artesanal para la alimentación y combustible de iluminación.

**Manco (2008)**, menciona que se tiene reportes de análisis realizadas en la Universidad de Correll (USA) que indican que la almendra de las semillas contiene 48.7% de aceite y 33.3% de proteína; además se señala que el aceite de sachá inchi contiene un alto contenido de ácidos grasos insaturados (oleico u Omega 9, linoleico u Omega 6 y linolénico u Omega 3) por lo que se le considera como un aceite de bajo contenido de colesterol.

**Cuadro N°02:** Contenido de proteínas y ácidos grasos en Sachá Inchi y otras oleaginosas

Nutriente (%)	Semillas de oleaginosas							
	Sachá inchi	Soya	Maíz	Maní	Girasol	Algodón	Palma	Oliva
Proteínas	<b>33.3</b>	28		23	24	32.9		
Aceite Total	<b>54</b>	19		45	48	16		
Palmítico	<b>3.85</b>	10.5	11	12	7.5	18.4	45	13
Esteárico	<b>2.54</b>	3.2	2	2.2	5.3	2.4	4	3
<b>Total Ácidos Saturados</b>	<b>6.4</b>	13.7	13	14.2	12.8	20.8	49	19
Oleico	<b>8.28</b>	22.3	28	43.3	29.3	18.7	40	71
Linoleico	<b>36.8</b>	54.5	58	36.8	57.9	57.7	10	10
Linolénico	<b>48.61</b>	8.3	1			0.5		1
<b>Total Ácidos Insaturados</b>	<b>93.6</b>	85.1	87	80.1	87.2	76.9	50	82

**Valles (1991)**, menciona que el cultivo del Sacha Inchi en chacras familiares de dos a tres hectáreas, tendría un beneficio social y económico para la unidad familiar campesina y rural en general: al favorecer la permanencia del producto pequeño en su finca, mejora su ingesta proteica y disminución de la motivación del incremento del cultivo de la Coca; como también indica que por su corto periodo de inicio de cosecha; crecimiento y desarrollo en suelos ácidos, con pendiente o erosionados; constituye una alternativa para la reforestación económica y autosostenida de la Selva Alta y, cultivo de importancia para la obtención de aceites comestibles y derivados proteico para la alimentación humana y animal, especialmente en áreas rurales.

### **3.2. Generalidades sobre estudios citológicos.**

#### **3.2.1. División sin reducción: Mitosis.**

**Lynch et al. (1987)**, menciona que es el fenómeno merced al cual una célula somática se divide para formar dos células hijas, cada uno de las cuales recibe el mismo número de cromosomas y el mismo conjunto de material genético que tenía la célula inicial.

**López (1995)**, indica que la mitosis comprende una serie de fases continuas conocidas como profase, metafase, anafase y telofase. Los cromosomas se duplican individualmente en la **interfase**. En esta fase y en la **profase** temprana, los

cromosomas se ven como filamentos extendidos y delgados. Al finalizar la **profase**, se transforman en bastones cortos y compactos por el empaquetamiento de fibras nucleoproteicas. En la **metafase** se produce un huso entre dos centríolos y los cromosomas se colocan en un solo plano formando lo que se denomina placa ecuatorial de la célula. En la **anafase**, cada cromosoma hijo se separa para dirigirse al polo celular correspondiente. Finalmente en la **telofase** se forma dos núcleos a partir de cada uno de los dos grupos polares de los cromosomas hijos. Simultáneamente, dependiendo del tipo de célula, sea ésta vegetal o animal, se produce la cariocinesis o separación citoplasmática en dos territorios, que es variable, según la célula de que se trate.

### **3.2.2. División con reducción: Meiosis.**

**Ayala & Kiger (1984)**, señala que la meiosis es la secuencia de dos divisiones nucleares que conducen a la formación de dos gametos. Durante la meiosis cada célula se divide dos veces mientras que los cromosomas sólo se duplican una vez, de tal forma que los gametos resultantes tienen únicamente la mitad de los cromosomas que tiene la célula original.

**Lynch et al. (1987)**, menciona que la meiosis se puede dividir en ocho etapas: Leptoteno, cigoteno, paquiteno, diploteno,

diacinesis, metafase, anafase y telofase. Las tres últimas son semejantes a las fases correspondientes de la mitosis.

**Leptoteno.** Los cromosomas se encuentran dispersos como formaciones filamentosas únicas en todo el núcleo.

**Cigoteno.** Los cromosomas se han vuelto más cortos y gruesos, y los pares homólogos se han dispuesto al lado unos de otros; o sea, se aparean los cromosomas correspondientes que provienen respectivamente del padre y la madre.

**Paquiteno.** La condensación de los 23 pares de cromosomas es mayor, y cada cromátide se duplica; el cromátide en espejo queda unido al original a nivel del centrómero de este último.

**Diptoteno: diacinesis.** Los dos cromosomas homólogos apareados se presentan ahora como tétradas. En dichos puntos de contacto, o quiasmas, hay intercambio de material genético, de modo que los gametos resultantes poseen genes de ambos padres simultáneamente. En la diacinesis, las tétradas se siguen condensando, y los quiasmas emigran hacia los extremos de los cromosomas.

**Metafase de la meiosis.** La membrana nuclear desaparece, y los 23 pares de cromosomas de doble filamento se disponen en el plano ecuatorial.

**Anafase de la meiosis.** Cada integrante de doble filamento de los 23 pares de cromosomas homólogos se aleja de su compañero.

**Telofase de la meiosis.** Reaparecen las membranas nucleares, y la célula germinativa se divide; cada célula hija, o gameto, posee ahora 23 cromosomas.

**Segunda división de la meiosis.** Es una división mitótica.

### 3.2.3. Definición de cromosomas.

**Ayala & Kiger (1984)**, define a los cromosomas como cuerpos largos y filiformes que, durante la división celular, se contraen haciéndose mas gruesas y cortos, en los que se puede distinguir un centrómero y uno de dos brazos cromosómicos.

**Robles (1987)**, citado por **Blas (1997)**, indica que los cromosomas son cuerpos microscópicos que se tiñen intensamente y que son visibles en el núcleo de una célula en el momento de la división.

**Sáez & Cardoso (1978)**, citado por **Blas (1997)**, menciona que los cromosomas contienen la información necesaria para el funcionamiento celular, así como de la morfogénesis y reproducción de los organismos. Los cambios del material genético contenido en años son las causas de la variación, mutación y selección de los seres vivos.

### 3.2.4. Composición química y estructura de los cromosomas.

**Gardner et al. (2000)**, menciona que el análisis químico de cromatina indica que consiste principalmente de DNA y

proteínas, con cantidades menores de RNA. Las proteínas son de dos clases principales: 1) proteínas básicas (cargadas positivamente a pH neutro) denominados histonas y 2) un grupo heterogéneo de proteínas, en su mayoría ácidas (con cargas negativas a pH neutro), que se conocen colectivamente como proteínas cromosómicas no histonas. Las histonas tienen una función estructural importante en la cromatina, las histonas de todas las plantas y los animales superiores consisten en cinco proteínas principales diferentes. Estas cinco histonas principales, denominadas H1, H2a, H2b, H3 Y H4. Se encuentran formando complejos específicos con el DNA para formar las subunidades estructurales básicas de la cromatina, pequeñas (aproximadamente 110 Å de diámetro por 60 Å de altura) “cuentas” elipsoidales denominadas nucleosomas. Las histonas son básicas por que contienen de 20 a 30% de argina y lisina, que son dos aminoácidos con carga positiva. Por otra parte, la fracción de proteínas no histonas consiste en un gran número de proteínas muy heterogéneas. De este modo, las proteínas cromosómicas no histonas probablemente tienen que ver con la regulación de la expresión de genes o grupos específicos de genes. Cada cromosoma contiene una sola molécula gigante de DNA que se extiende de un extremo a través del centrómero hasta el otro extremo del cromosoma.



**Dubinín (1976)**, indica que las moléculas de RNA que se encuentra en los cromosomas no forman parte de su estructura. El papel de este ácido se encuentra relacionado con la transmisión de la información de los genes para la síntesis de las proteínas.

**Bianchi (1978), Lehninger (1987), reissig (1983)**, mencionado por **Blas (1997)**, indica que los cromosomas se pueden distinguir las siguientes estructuras. **a) Cromátida**, está constituido por una fibra elemental, un filamento uniforme, denominado cromonema o una fibra de cromatina, plegada y empaquetada. **b) Centrómero**, es la zona del cromosoma encargada de unir a ésta con las fibras del aparato mitótico. Esta unión permite que cada cromatidio (durante la anafase de la mitosis) o cada cromosoma homólogo (durante la primera anafase de la meiosis) se dirijan hacia los polos. **c) Constricción secundaria**, llamadas así para diferenciarlas de las constricciones primarias o centrómeros, estas constricciones generalmente se ubica en una región próximo al extremo del cromosoma y termina en un corpúsculo denominado satélite, lo cual es un rasgo característico del cariotipo. **d) Telómeros**, son componentes estructurales de los cromosomas ubicados en ambos extremos de los mismos. Aparentemente presenta polaridad, por lo que confieren individualmente al material genético comprendido entre ellos, impidiendo que los

cromosomas se fusionen entre sí a menos que se presenten rupturas.

### **3.2.5. Morfología de los cromosomas.**

**Dubinín (1976)**, indica que cada cromosoma posee una forma y un contenido genético individual. Los cromosomas cambian de longitud al recorrer el ciclo celular, conservando a plenitud la información genética que le es propia. Estos se encuentran estirados al máximo en la interfase. Por el contrario, en la mitosis, cuando los cromosomas se encuentran en la metafase y están preparándose para distribuirse a las células hijas, se acortan al máximo debido a su disposición especial y la espiralización del filamento nucleoproteico al unirse los enlaces químicos entre el DNA y las proteínas. Al iniciarse la interfase y al terminar la mitosis, los cromosomas se alargan desenrollándose y despiralizándose. El estudio de la estructura de los núcleos de diferentes especies proporciona mejores resultados al ser analizados los cromosomas en la metafase, ya que encuentran en estado de contracción. En este caso es muy fácil contarlos y estudiar las particularidades individuales. El análisis de estos cromosomas en la metafase demostró que el número y la estructura de los mismos es característico para cada especie de organismos vivientes. El centrómero determina la forma del cromosoma en la metafase. Al situarse los centrómeros cerca del extremo, el cromosoma adopta el

aspecto bastoncito y se denomina **telocéntrico**. Si el centrómero se encuentra en el medio, el cromosoma adoptará el aspecto de estructura en forma de X y se denominará **metacéntrico**. Los cromosomas con otra posición de los centrómeros, tienen los brazos desiguales denominándose **submetacéntricos** o **acrocéntricos**.

### 3.2.6. Constantes cromosómicas.

**Sáez & Cardoso (1978)**, **Talledo et al. (1995)**, mencionados por **Blas (1997)**, indican que las constantes cromosómicas son las características que individualizan a los cromosomas de una especie. Tales constantes se ponen de manifiesto en el cromosoma durante la división celular, especialmente en la metafase; y las más importantes son: número, dimensiones relativas, morfología. Hay otras constantes, tales como organización interna, comportamiento, contracción lineal, grado de condensación (espiralización) y volumen, que se encuentran en ciertas condiciones sujetas a variaciones fisiológicas. Sin embargo **Valladolid et al. (2004)**, menciona que una propiedad importante de los cromosomas es el hecho de que casi siempre el número de cromosomas en las células es constante, a nivel del individuo y entre todos los individuos de la misma especie. Esta propiedad es sumamente útil en estudios filogenéticos en la solución de problemas sistemáticos (citotaxonomía).

**Sáez & Cardoso (1978), Talledo et al (1995)**, citado por **Blas (1997)**, menciona que el número de cromosomas fue una de las primeras constantes que se estudiaron para explicar la individualidad a través de las generaciones celulares del individuo, la especie, el género o grupos de mayor jerarquía taxonómica. Se cree en forma generalizada que el número de cromosomas es invariable en todas las células de un organismo, la misma que tiene excepciones. Las células sexuales poseen un número constante de cromosomas, y algunas células somáticas del mismo individuo pueden tener un número diferente debido a adaptaciones funcionales de las mismas.

**Blas (1997)**, indica que la morfología de cromosomas es de mucha importancia para la identificación de los mismos. El criterio empleado se basa en la posición del centrómero, de las constricciones secundarias, satélites y además signos que caracterizan el complemento cromosómico en general o, el de determinados cromosomas en particular. El tamaño y especialmente la longitud relativa con respecto a la suma de un conjunto cromosómico haploide, es otra constante imprescindible para la individualización del cromosoma.

### **3.2.7. Cariotipo: idiograma**

**Lynch et al. (1987)**, define el cariotipo al conjunto total de cromosomas de una célula dada, dispuesto en forma

sistemática, reuniendo pares homólogos, tamaño relativo, posición del centrómero, satélites, etc. El nombre implica además que el cariotipo es representativo de la constitución cromosómica de la totalidad o una parte del individuo de donde proviene una célula estudiada. Se llama idiograma a la representación esquemática del cariotipo. Se puede obtener por mediciones de cromosomas de muchas células diferentes.

### 3.2.8. Variaciones de la estructura de los cromosomas

**Gardner et al. (2000)**, menciona que los cambios estructurales requieren rompimiento de los cromosomas. Más de un rompimiento puede ocurrir en un solo cromosoma o juego de cromosomas y las partes rotas podrían reunirse en nuevos arreglos. Cualquier extremo roto podría unirse con cualquier otro extremo roto, lo que resulta en potencia en nuevos arreglos de ligamiento. La pérdida o adición de un segmento de cromosoma podría también ocurrir en el proceso. Más de un tipo de aberración podría ocurrir al mismo tiempo. Por ejemplo, una sección podría romperse y perderse durante la formación de una inversión o una translocación; esto produce simultáneamente una deficiencia. La identificación de aberraciones cromosómicas por observación es un gran problema para los citogenetistas por que los miembros de una par carecen generalmente de marcadores visibles para identificar áreas diferentes a todos lo largo. Las constricciones primarias y secundarias y la longitud

total son útiles, pero se necesitan más marcadores. La primera demostración citológica de rearrreglos de cromosomas en plantas la realizó B. McClintock en el maíz. Trabajando con la etapa paquíteno y otras etapas de la profase meiótica que presentan cromosomas grandes para la observación microscópica, ella demostró finalmente que las configuraciones irregulares derivadas de rearrreglos cromosómicos en el proceso de apareamiento conducían a cuatro tipos diferentes de cambios estructurales: 1) deficiencias (partes de cromosomas perdidos o suprimidas), 2) duplicación (partes añadidas o duplicadas), 3) inversiones (secciones separadas y reunidas en orden inverso), 4) translocaciones (partes de cromosomas separadas y unidas a cromosomas no homólogos). Sin embargo Blas (1997) indica que estos cambios pueden ser espontáneos y también cabe inducirlos experimentalmente con agentes físicos, químicos y biológicos como los virus.

### 3.2.9. Variación en el número cromosómico

**Stansfield (1983)**, citado por **Blas (1997)**, menciona que cada especie tiene un número característico de cromosomas. En la naturaleza es muy poco común encontrar variaciones en el número de juegos cromosómicos (ploidía). Dentro de los cambios en número de cromosomas se considera las siguientes alteraciones: Haploidía, poliploidía (autopoliploidía, alopoliploidía), aneuploidía y euploidía.

**Mendoza (2005)**, menciona que el término ploidía se refiere al número de juegos de cromosomas, complementos cromosómicos o genomas encontrados en una célula.

El mismo autor afirma que los aneuploides o ploidía no verdadera, es la situación anormal en la que uno o unos pocos cromosomas de un juego normal de cromosomas (genoma) están ausentes o presentes en proporción menor o mayor al número normal de las dos copias que tiene cada cromosoma en las células diploides. Pueden darse muchas combinaciones aneuploides; en la cual Montoya (1980), menciona los siguientes ejemplos: si le faltan los dos miembros de un par de cromosomas del complemento normal de las células somáticas, el organismo se denomina nulisómico ( $2n-2$ ). Al individuo monosómico le falta un cromosoma del complemento normal ( $2n-1$ ); el trisómico, tiene dos juegos completos de cromosomas más un cromosoma extra ( $2n+1$ ); los tetrasómicos tienen un par de cromosomas homólogos ( $2n+2$ ). Sin embargo si existe un cromosoma extra un cromosoma extra de cada uno de dos pares diferentes el organismo se llama doble trisómico. A las muchas otras combinaciones posibles se aplica una terminología similar.

**López (1995)**, indica que las mutaciones causadas por la presencia de dos o más genomas en las células somáticas reciben el nombre de euploides y, más generalmente, el de

poliploides. Los organismos que contienen tres genomas o juegos completos de cromosomas se denominan triploides. A los que contienen cuatro, seies y ocho genomas se les denomina, tetraploides, hexaploides y octoploides respectivamente. Dentro de los euploides se pueden considerar dos clases distintas a saber, los autopoliploides y los alopoliploides. Los primeros son poliploides producidos por multiplicación completa del número normal de cromosomas de la especie; por ejemplo, un autotetraploide contiene cuatro juegos idénticos de cromosomas. Los alopoliploides son poliploides cuyos juegos o dotaciones repetidas no son idénticos genéticamente, por prevenir cada juego posiblemente, de especies distintas.

### **3.2.10. Efectos de la poliploidía en el fenotipo.**

**Montoya (1980)** menciona que los aneuploides son generalmente menos vigorosos que sus genitores diploides. Los individuos nulisómicos y monosómicos suelen ser viables solamente en las especies con antecesores poliploides en las que la duplicación previa de cromosomas parece suplir los materiales cromosómicos que faltan. Sin embargo, Stansfield (1992), indica que los nulisómicos resultan comúnmente letal para diploides; por el contrario algunos poliploides pueden perder dos homólogos de un complemento y aún sobrevivir; mientras que los monosómicos en plantas rara vez en funcional. En los animales, la pérdida de un cromosoma completo resulta



con frecuencia en un desequilibrio genético, el cual se manifiesta por la mortalidad elevada o fertilidad reducida. En algunas especies no se encuentran individuos trisómicos probablemente por que hasta el desequilibrio causado por un solo cromosoma es letal. En las especies que toleran los cromosomas extras, la trisomía ejerce generalmente un profundo efecto en la morfología, especialmente en las especies que parecen ser tipos diploides básicos. En algunas especies poliploides trigo por ejemplo, el grado de tolerancia a la repetición de ciertos cromosomas es grande y hasta los tetrasómicos pueden ser casi indistinguibles de las plantas diploides normales.

**Mendoza (2005)** indica que **Blakeslee en 1934** hizo la primera descripción morfológica de una serie completa de 12 trisómicos primarios (el cromosoma adicional es completamente homólogo a uno de los cromosomas del par normal de cromosomas del genoma) en el chamico (*Datura stramonium*). Cada trisómico ( $2n + 1$ ) difiere de la planta normal ( $2n$ ) en varias características: tamaño y forma de la cápsula, tamaño y longitud de las espinas, tamaño de planta, hábito de crecimiento y tamaño y forma de hojas, flores y estigma.

**Montoya (1980)**, menciona que un efecto común de la poliploidía es aumentar el tamaño de las porciones vegetativas

de la planta, que hace que los autopoliploides sean más frondosos y algo más vigorosos que sus progenitores correspondientes diploides. Sin embargo, este efecto no es general y muchos autopoliploides son débiles y pocos vigorosos. Algunos investigadores creen que en cada grupo de plantas existe un nivel óptimo de poliploidía. En la mayoría de los grupos este óptimo parece alcanzar niveles bastantes bajos de autopoliploidía, pero en algunos los octoploides o poliploides aún más altos son todavía tipos vigorosos. Los efectos fisiológicos y fenotípicos de la aloploidía son, por lo menos, tan difíciles de predecir como los de la autopoliploidía. Sin embargo, en general los aloploides combinan más o menos entremezcladas las características de las especies de que se derivan.

### **3.2.11. Origen de los poliploides.**

**Montoya (1980)** afirma que aparentemente todos los tipos de poliploidía tienen su origen en accidentes citológicos de una y otra clase. Los individuos monosómicos y trisómicos surgen esporádicamente a partir de gametos con  $n - 1$  o  $n + 1$  cromosomas. Estos gametos se producen como resultado de la no disyunción de algún par de cromosomas. Los monoploides y triploides son otra fuente de aneuploide. Sin embargo, los aneuploides parecen surgir más comúnmente como

consecuencia de dificultades en la meiosis causadas por genes asinápticos.

**Mendoza (2005)**, indica que el desarrollo de los aneuploides no es muy claro pero debe originarse de un proceso conocido como no disyunción. La no disyunción ocurre cuando los cromosomas homólogos que están apareados no se separan sea en la división meiótica I o en la división meiótica II. El resultado directo de este evento es que los gametos que se desarrollan llevarán más o menos cromosomas de lo que se espera de una meiosis y gametogénesis normales. Si la no disyunción ocurre en meiosis I, no hay formación de gametos normales y si ocurre en meiosis II, la mitad de los gametos serán normales y la mitad anormales.

- **Procesos de la no disyunción.**

No disyunción significa falla en la separación de cromosomas durante el proceso de división celular, sea esta mitótica o meiótica, lo que va a producir células hijas con números desbalanceados de cromosomas. La no disyunción durante la mitosis producirá células con  $(2n + 1)$  y otras con  $(2n - 1)$ . Si la no disyunción ocurre inmediatamente después de la fecundación, todas las células del nuevo cigote serán aneuploides. Si esta se produce mas tarde, el organismo podrá tener una

aneuploidía por sectores también conocida como un mosaico aneuploide.

- **Mosaicos cromosómicos.**

**Gardner et al. (2000)**, menciona que los individuos que tienen al menos dos líneas celulares, con diferentes cariotipos derivados de un cigoto, se originan de la no disyunción en una división de segmentación después de la fertilización. Una célula hija recibirá en consecuencia demasiados cromosomas y a la otra le faltarán. Cada célula originará una línea celular con su número cromosómico irregular. Las proporciones de las células que representan a las diferentes líneas celulares variarán en los diferentes tejidos, lo que hará que el grado de mosaicismo y el efecto en el organismo sean difíciles de predecir.

Mientras que la euploidía según **Montoya (1980)** indica que parece surgir corrientemente por accidentes en la meiosis que conducen a la formación de gametos sin reducir ( $2n$ ). También se producen poliploides con repeticiones completas de juegos cromosómicos básicos en células somáticas en las que un fallo de la mitosis ha producido la duplicación del complemento cromosómico.

### 3.2.12. Factores que promueven la poliploidía

**Grant (1971)**, citado por **Blas (1997)**, menciona: que factores externos e internos están involucrados tanto en el origen como en el establecimiento de nuevos poliploides siendo los principales los siguientes: 1) la existencia de especies diploides llevando diferentes genomas o subgenomas, 2) la hibridación natural entre estas especies, 3) hábito de crecimiento perenne para incrementar los cambios de duplicación somática como una compensación parcial en plantas anuales de vida corta. La reproducción autógena incrementa la unión de gametos no reducidos. Si alguna de estas 3 condiciones falta en cualquier grupo de plantas, la poliploidía esperada puede ser ausente o raro.

**Grant (1971)**, citado por **Blas (1997)**, menciona que existen muchas discusiones sobre otros factores como el clima, latitud, altitud, hábitat, sistemas de reproducción, hibridación, tamaño de las células, tamaños de cromosomas, estructuras de cromosomas, mecanismos de cromosomas sexuales, genotipo y otros factores.

### 3.2.13. Extensión e importancia de la ploidía en las plantas cultivadas

**Montoya (1980)**, indica que algunos autores estiman que por lo menos la tercera parte de las angiospermas son poliploides.

Entre las especies cultivadas, la proporción es tan grande o mayor. Esto indica que los accidentes citológicos mencionados anteriormente que conducen a la poliploidía son frecuentes y también indica la importancia evolutiva de la ploidía. Puede formarse una idea de la importancia de la poliploidía en las plantas cultivadas por la relación que acompaña del número de cromosomas en las especies cultivadas y silvestres.

**Valladolid (2004)**, afirma que una proporción grande de las especies de plantas superiores son poliploides, según Averett (1981), aproximadamente 36% de las angiospermas son poliploides, pero entre 70 y 80% puede presentar ploidía en su historia evolutiva, además, se alcanzan altos niveles de ploidía en varios géneros.

**Portieles et. al. (2002)**, indica que el género *Saccharum* se caracteriza por una poliploidía compleja de carácter aneuploide, presentando una dotación cromosómica de  $2n = 40, 42, 44, 54, 56, 64, 72, 80, 96, 112$  y  $128$ , por lo que se ha llevado a cabo estudios citológicos clásicos, para brindar información general sobre la citogenética de la caña de azúcar y para fundamentar los programas de mejoramiento.

**Gaspar (1997)**, menciona que algunas accesiones del germoplasma de oca y de acuerdo al número básico de

cromosómico  $x=8$ , encontró cuatro accesiones tetraploides ( $2n=4x=32$ ), nueve pentaploides ( $2n=5x=40$ ) y dos hexaploides ( $2n=6x=48$ ). En el germoplasma de isaño encontró de acuerdo al número básico de cromosomas = 13, ocho accesiones diploides ( $2n=2x=26$ ) y cinco triploides ( $2n=3x=39$ ). Estos resultados sugieren la existencia de una serie poliploide en ambas especies.

**Rodríguez y bueno (2005)**, encontró variabilidad genética en ecotipos de *Physalis peruviana* L., los ecotipos evaluados presentaron una dotación cromosómica de 24, 32 y 48 cromosomas, también exhibieron variaciones en las características morfológicas, concluyendo que la especie está en proceso de evolución y por ello presenta alteraciones numéricas.

**Basurto (2004)**, quien verificó el número cromosómico de 7 genotipos de algodón el cual reportó 52 cromosomas ( $4x=52$ ;  $x=13$ ). Sin embargo los genotipos Cluster de porte Mediano y de porte Bajo mostraron 38 cromosomas, lo cual sugiere la ocurrencia de aneuploidia.

**Blas (1997)**, reportó el número de cromosomas de 64 entradas de *Arracacia xanthorrhiza* B. cultivadas peruanas fue de  $2n=44$ ; mientras que en 10 entradas encontró 1 a 4 células con  $2n=88$

cromosomas, los cuales corresponderían a mixoploidía, que podrían ser debido a que la planta estuvo bajo estrés en las condiciones de La Molina-Lima, o por un proceso de infección viral (BMS) que induciría duplicación de cromosomas tal como ocurre en *Hordeum vulgare*.

#### 3.2.14. Estudios de cromosomas en vegetales

**Martín (1976)**, citado por **Ceballos & de la Cruz (2001)**, indica que en la familia de las Euphorbiaceae, usualmente, el número cromosómico básico es 8, aunque el rango de variación oscila entre 6 a 11; aproximadamente, el 50% de las especies son poliploides. Así el mismo autor menciona que según Perry (1941), todas las especies de la tribu *Manihoteae* incluyendo la yuca (*Manihot esculenta*) contienen 36 cromosomas y en la mayoría de los casos el apareamiento de los cromosomas forma bivalentes, sugiriendo que esta especie sería diploide. Sin embargo, existe cierta divergencia por parte de los investigadores en cuanto al grado de ploidía de esta especie. Para algunos autores, se trata de una especie diploide ( $2n= 36$  cromosomas) mientras que otros consideran que se trata de un poliploide, posiblemente un aloploide “tetra o hexaploide” (**Ceballos & de la Cruz, 2001**).

**Talledo et al. (1993)**, citado por **Talledo & Escobar (2004)**, indicaron que las investigaciones citológicas no sólo dan a

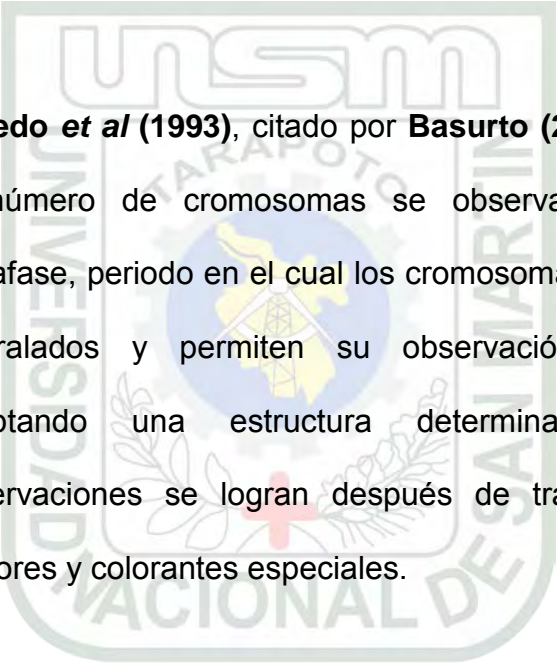


conocer las peculiaridades citogenéticas de los organismos (ciclo celular, número y morfología cromosómica), si no que gracias a la particular condición de los cromosomas como portadores de la herencia también nos permiten: i) utilizar criterios adicionales para la clasificación taxonómica y filogenética de las especies. ii) aclarar una serie de problemas evolutivos (tanto generales como referidos al origen de determinados grupos). iii) predecir el comportamiento de las muestras en los bancos de cultivos in Vitro. iv) asimismo constituyen un requisito indispensable para la caracterización a nivel molecular.

**Valladolid et al. (2004)**, indica que el número de cromosomas son datos útiles en el estudio de una especie y en la caracterización del germoplasma. Nos pueden mostrar las relaciones existentes entre especies dentro de un género o familia y clarificar el origen de los híbridos naturales y variedades cultivadas. Además, gran parte de las características reproductoras y evolutivas de las especies se explican por el conocimiento de sus rasgos citológicos.

**Talledo & Escobar (2004)**, indica que el ciclo celular, número y morfología cromosómica se estudian en las células en división de los tejidos meristemáticos, el endosperma de las semillas o en el polen. Los cromosomas se ven mejor en células de tejidos

que no contengan sustancias almacenadas. Por ello el estudio de los cromosomas se realiza principalmente en láminas preparadas a partir del meristemo radicular, la base de hojas jóvenes, los conos de crecimiento del tallo, así como en láminas de polen.



**Talledo et al (1993)**, citado por **Basurto (2004)**, menciona que el número de cromosomas se observa mejor durante la metafase, periodo en el cual los cromosomas están fuertemente espiralados y permiten su observación como organelos adoptando una estructura determinada. Las mejores observaciones se logran después de tratar los tejidos con fijadores y colorantes especiales.

**Huamán (1995)**, citado por **Blas (1997)**, afirma en la actualidad se usan varias técnicas para estudiar los cromosomas en los tejidos de las plantas. La técnica del aplastado (squash) es la más usada por su simplicidad y rapidez. Las etapas de pretratamiento, fijación y tinción de las células utilizados para la técnica de aplastado pueden variar, especialmente los reactivos químicos y tintes que se usan. Estas etapas dependen del estudio que se van a realizar y funcionamiento del citólogo que la emplea.

### 3.2.15 Generalidades del conteo cromosómico

#### 1. Recuento de cromosomas mitótico

**Valladolid et al. (2004)**, menciona que los primeros citólogos desarrollaron métodos basados principalmente en el uso de la parafina y el corte al micrómetro de secciones finas de la punta de la raíz para la observación de cromosomas bajo el microscopio óptico. Esta metodología dio buenos resultados en su tiempo, hasta la aparición de la técnica de aplastado de puntas de raíz con tinción monocromática descrito por Sharma y Sharma (1980) y Talledo et al. (1993), conocido como “squash”, empleados por **Basurto (2004)**, **Blas (1997)** y **Gutiérrez et al. (2002)**, que consiste en un número de pasos a seguir desde la obtención de raíces, hasta la observación de los cromosomas bajo el microscopio óptico.

#### 2. Germinación o enraizamiento

**Roth (1966)**, citado por **Valladolid et al. (2004)**, menciona que las células de un organismo poseen cromosomas, pero estos sólo son evidentes cuando la célula se encuentra en división mitótica. Por eso, para efectuar el conteo de cromosomas mitóticos se deben utilizar tejidos meristemáticos que se caracterizan por encontrarse en constante mitosis, poseer núcleos grandes y permanecer indiferenciados. Los tejidos meristemáticos localizados en la

zona apical de la raíz son los más utilizados en citología para el recuento y análisis de cromosomas mitóticos. Las raíces pueden obtenerse por germinación de las semillas sexuales en placa petri bajo condiciones asépticas, o mediante el enraizamiento de esquejes, brotes u órganos de reserva, en un sustrato apropiado (musgo, perlite, grava, agua corriente) **Valladolid et al. (2004)**

### 3. Determinación de la hora de recolección.

**Talledo et al. (1993)** citado por **Valladolid et al. (2004)**, menciona que un paso importante al pretratamiento es la determinación del índice mitótico, el cual nos permite conocer la hora más apropiada para el tratamiento previo de las raíces. Para tal fin se fijan las raíces en la mezcla de alcohol absoluto: ácido acético glacial (3:1 v/v) a diferentes horas del día. Después de macerar y teñir las muestras se procede a observarlas bajo el microscopio óptico. Se anotarán la frecuencia de interfase, profase, metafase y telofase por cada hora de colección. Luego de sistematizar esta información en forma de cuadros, se puede tener una idea de cual es la mejor hora de colección, es decir aquella donde se encuentre un mayor número de células metafísicas. Como el medio ambiente tiene influencia sobre la duración del ciclo celular, es posible que por cada localidad se obtenga una hora de recolección distinta.

**Ferrer et. al. (2007)**, menciona que la determinación del ciclo celular y de la hora mitótica constituyen las herramientas principales para aumentar la efectividad de los métodos químicos y físicos para la separación de cromosomas en especies vegetales.

**Basurto (2004)**, quien utilizó la metodología descrita por Talledo et al. (1993); determino que la hora más adecuada de 7 genotipos de algodón evaluadas desde las 09 hasta las 16 horas con cortes de 1 por cada hora, esta comprendido entre las 09 a 11 horas del día para la colección de raíces en condiciones de La Molina-Lima, debiéndose resaltar que en promedio se encontraron de 16.5 a 23 células metafásicas.

**Bias (1997)**, reportó mediante la metodología descrita por Talledo et al. (1993), que la colección mas adecuada de raíces de *Arracacia xanthorrhiza* B., en las condiciones de La Molina-Lima, debe hacerse entre las 09 a 12 horas en las 4 estaciones del año, evaluadas por un periodo comprendido desde las 07 hasta las 18 horas.

**Talledo & Escobar (2004)**, encontró que la mayor concentración de división celular en *Oxalis tuberosa* (Oca), evaluada por un periodo de 24 horas utilizando la metodología descrita por Talledo et al. (1993), esta comprendida entre las 7:30 y las 8:30 con un Índice Mitótico

(IM)=92.17%, sin embargo a las 23 horas alcanzó repentinamente un índice mitótico (IM)= 89.19%. Los Índices Mitóticos registrados a las 21:00 y 24:00 fueron bajos alcanzando un valor de 2% y 23%.

**Matos y Molina (1996)**, menciona que los cálculos del Índice Mitótico (IM) y los Índices de Fases (IF) en *Aloe vera* (zábila), se llevaron a cabo usando las ecuaciones utilizadas por Del Campo en trabajos realizados con Lirio (*Zephyranthes* sp.). De esta manera, el IM se obtuvo mediante la ecuación:  $IM = (\text{N}^\circ \text{ de células en mitosis} / \text{N}^\circ \text{ total de células}) \times 100$ . El cálculo de los IF se llevó a cabo utilizando la siguiente ecuación en cada una de las fases de la mitosis:  $IF = (\text{N}^\circ \text{ de células en fase} / \text{N}^\circ \text{ total células en mitosis}) \times 100$ . Asimismo los resultados obtenidos reportó que la mayor división celular en meristemas radicales de *Aloe vera* (zábila) es a las 7:00 am. reportando un índice mitótico de 15.24%.

**Ferrer et. al. (2007)**, determinó el Índice Mitótico (IM) para cada uno de los dos cultivares de *Gossypium hirsutum* L. y dos ecotipos de *Gossypium barbadense* L. empleando la relación entre el número de células en división mitótica con respecto al número total de células observadas en el campo microscópico. Por otro lado, se determinó el Índice de Fase (IF) mediante el número de células observadas en una fase

mitótica definida entre el número total de células en división, multiplicado por cien.

#### 4. Prefijación o pretratamiento

**Valladolid et al. (2004)**, indica que un paso importante en la estandarización de una metodología para el conteo de cromosomas es la determinación del mejor pretratamiento, para lo cual se tienen que probar diferentes inhibidores de mitosis, diferentes concentraciones, tiempos de exposición y temperaturas de tratamiento. Asimismo es el tratamiento que se realiza a las puntas de raíz con sustancias denominadas inhibidores de mitosis (colchicina, 8-hidroxiquinolina, 1-bromonaftaleno, bajas temperaturas positivas, etc.) para acumular el mayor número de células metafásicas en el meristemo.

**Talledo et al. (1993)**, citado por **Valladolid et al. (2004)**, menciona los inhibidores de mitosis actúan sobre el proceso de formación del huso acromático, impidiendo el paso hacia la anafase y causando el acortamiento y dispersión de los cromosomas.

**A continuación se indican los prefijadores utilizados:**

**a. Colchicina.**

**Mendoza (2005)**, define a la colchicina como un alcaloide extraído de la especie *Crocus sativus* que tiene la propiedad de inhibir la formación del huso mitótico de modo que permita la formación de células con dos juegos de cromosomas o dos genomas. Sin embargo las células diploides pueden proliferar en un sector de las plantas tratadas y luego, esos tejidos se usan para regenerar plantas ya duplicado de cromosomas. Por otra parte usando el cultivo de anteras, las formas recombinantes del producto de la meiosis de una  $F_1$  son fijados inmediatamente luego que el genoma de los monoploides es doblado usando la colchicina o algún otro método aparente.

**Speranza (2008)**, manifiesta que existen métodos de poliploidización, mediante el uso de colchicina aplicando a tejidos meristemáticos en la cual se consigue células tetraploides a partir de células diploides.

**Sharma & Sharma (1980), Talledo et al. (1993)**, citado por **Blas (1997)**, menciona que cualquier exceso en la concentración y tiempo de tratamiento puede inducir una concentración opresiva de los cromosomas y poliploidía.



**Blas (1997)**, menciona que la mejor concentración de colchicina para la determinación del número cromosómico de la Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* B.) es de 0.01% por 6 horas a 4°C.

**Basurto (2004)**, indica que la colchicina como prefijador a una concentración de 0.05% durante 2 horas de exposición a 20 °C., utilizó para la verificación del número cromosómico de 7 genotipos de algodón,

**Albornoz y Imery (2003)**, manifiesta que para el estudio citogenético de ocho poblaciones de *Aloe vera* L. utilizan como prefijador la colchicina 0.05% por dos horas.

#### **b. 8-hidroxiquinolina**

**Sharma & Sharma (1980)**, citado por **Blas (1997)**, indica que en una sustancia altamente liposoluble, que causa detención mitótica. El uso es desactivado, los brazos de los cromosomas se contraen, pero además permite a los cromosomas de la metafase mantener sus arreglos relativos en el plano ecuatorial. La constricción primaria y secundaria se hace más notoria y la brecha con el satélite se hace más notoria. La estructura centromérica puede analizarse fácilmente; es adecuado para especies

vegetales de cromosomas largos. Unas de sus limitaciones es el periodo de tratamiento largo.

**Blas (1997)**, reportó que la mejor concentración para el uso de 8-hidroxiquinolina como prefijador en la determinación del número cromosómico de la Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* B.), es de 0.0005M y 0.001M a 4°C tratadas durante 8 y 6 horas respectivamente.

**Gutiérrez et al. (2002)**, obtuvieron que a 0.0005M de 8-hidroxiquinolina con 6 horas de exposición dio resultados favorables para el conteo cromosómico en *Myrciaria dubia* H.B.K.MC.VAUGH. (Camu camu).

**Ramos et. al. (2002)**, menciona el uso del prefijador 8 hidroxiquinolina 0.02% (0.001M) durante 1,2 y 3 horas, para el estudio citogenético de accesiones de *Clitoria ternatea* (conchita).

**Portieles et. al. (2002)**, quienes determinaron el número cromosómico de un grupo de clones silvestres de origen desconocido y clones de fundación del complejo *Saccharum.*, mediante el uso de 8-hidroxiquinolina a 0.0001M por 3 horas a temperatura ambiente.

**Gaspar (1998)**, indica el uso del prefijador a 0.002M a 4°C a fin de acumular células metafásicas, para el estudio del nivel de ploidía en cultivares de oca (*Oxalis tuberosa* m.), papalisa (*Ullucus tuberosus* C) e isaño (*Tropaeolum tuberosum*).

**Mora et. al. (2005)**, indica el uso de 8-hidroxiquinolina a 0.002M durante 4 horas a temperatura ambiente para la comparación cariotipo de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus cladocalyx*.

c. **Agua helada**

**Talledo et al. (1993)**, citado por **Blas (1997)**, afirma: el uso del agua helada como prefijador es importante por que el enfriamiento causa una modificación general de la presión osmótica de las células, influyendo sobre la viscosidad del citoplasma y llevando a la dispersión de los cromosomas sobre la superficie celular así como su acortamiento, lo cual a permitido utilizar la acción de bajas temperaturas positivas para la prefijación del material.

**Blas (1997)**, comprobó que el uso de agua helada durante 24 horas de exposición a 4°C dio buenos

resultados en la determinación del número cromosómico de la *Arracacha xanthorrhiza* B.

## 5. Fijación

**Sharma y Sharma (1991)**, citado por **Blas (1997)**, menciona que las raíces prefijadas son luego fijadas con el fin de interrumpir rápidamente los procesos vitales de la muestra conservando invariable la estructura fina de las células, además de incrementar la naturaleza basófila de la cromatina haciéndola susceptible de ser coloreado.

**Talledo et al. (1993)**, citado por **Valladolid et al. (2004)**, indica que la conservación de los componentes de la célula viva se garantiza gracias a la transformación de los coloides celulares en geles insolubles más estables.

**Baker (1966)**, citado por **Valladolid et al. (2004)**, menciona que en la práctica se suele utilizar una mezcla de dos o más fijadores. Una de las mezclas más utilizadas en citología es la de Clark, que está formada por alcohol absoluto y ácido acético glacial en diferentes proporciones (3:1, 2:1, 1:1). Individualmente el alcohol absoluto y el ácido acético glacial no son buenos fijadores, pero cada uno compensa los defectos del otro. El efecto de contracción celular que causa el etanol, es compensado por el efecto de hinchamiento

celular del ácido acético. El etanol fija el citoplasma y el jugo nuclear, mientras que el ácido acético estabiliza las nucleoproteínas.

El fijador Carnoy (3 partes de etanol absoluto y 1 parte de ácido acético glacial), durante 24 horas a 4 °C, es de uso casi universal, ya que esta misma solución es utilizado en: Identificación morfológica y molecular de siete genotipos de algodón **(Basurto, 2004)**, Número cromosómico de la Arracacha "*Arracacia xanthorrhiza* B." **(Blas, 1997)**, Evaluación citogenética de ocho poblaciones de *Aloe vera* L. **(Albornoz y Imery, 2003)**, Estudio citogenético en células radicales de *Aloe vera* L. **(Matos y Molina, 1996)** y Determinación de un grupo de clones silvestres de un grupo de clones silvestres de origen desconocido y clones de fundación del complejo *Saccharum*. **(Portieles et. al., 2002)**.

## 6. Hidrólisis

**Valladolid et al. (2004)**, menciona que al momento de observar los cromosomas bajo el microscopio óptico, es importante que las células se encuentren dispersas formando una sola capa, evitando así la superposición. Para lograr este objetivo se deben destruir tanto la pared celular y la pectina de las uniones intercelulares. Para tal efecto se pueden utilizar agentes químicos o tratamientos enzimáticos

(celulasas y pectinasas). Entre los primeros, el más importante es el ácido clorhídrico 1 normal que provoca la disolución de las sales pécticas de la lámina media facilitando la separación de las células y el aclaramiento del citoplasma.

La concentración de HCL 1N a 60°C es la más utilizada en la mayoría de los cultivos, sin embargo solo difiere en el tiempo de permanencia en la solución: en Micropropagación y determinación cromosomal del género *Croton*. “Sangre de grado” el tiempo de exposición es de 12 a 18 minutos (**Ruiz, 2003**), “Identificación morfológica y molecular de siete genotipos de algodón” cuyo tiempo de exposición es de 10 a 12 minutos (**Basurto, 2004**), Determinación de un grupo de clones silvestres de un grupo de clones silvestres de origen desconocido y clones de fundación del complejo *Saccharum*. “caña de azucar” es de 15 minutos (**Portieles et. al., 2002**) y Número cromosómico de la Arracacha “*Arracacia xanthorrhiza* B.” es de 10 a 12 minutos (**Blas, 1997**).

## 7. Tinción

**Sharma y Sharma (1991), Baker (1966)**, citado por **Valladolid et al. (2004)**, menciona que para teñir los cromosomas se utilizan tintes básicos debido a la naturaleza ácida de la cromatina. Los tintes ácidos recolorean en el

citoplasma el cual es predominantemente básico. Las sustancias que son utilizadas como tintes se disuelven en agua en forma de iones coloreados. Estos iones se enlazan química y físicamente a las proteínas, sin perder su color. Entre los colorantes básicos absorbidos por los elementos del núcleo y utilizados frecuentemente en cariólogía se encuentra la orceína y el carmín. La coloración de feulgen, se basa en una reacción química. Existen además una serie de colorantes utilizados principalmente para la tinción diferencial de los cromosomas, giemsa, coloración argéntica, etc. **(Blas, 1997).**

**Basurto (2004)**, utilizó este colorante al 2% por 24 horas para el conteo cromosómico de 7 genotipos de algodón, asimismo en el Contaje cromosómico en *Myrciaria dubia* H.B.K.MC.VAUGH. "Camu camu" **(Gutiérrez et al., 2002)** y en la Determinación del número cromosómico de la **Arracacha** "*Arracacia xanthorrhiza* B." **(Blas, 1997).**

## **8. Aplastado o squash**

Una vez que las puntas de raíz han sido teñidas, se las ubica sobre un porta objeto. Luego de colocar el cubreobjeto sobre la punta de raíz, se dan pequeños golpes sobre éste con la punta de un lápiz con la finalidad de disgregar la punta de raíz. Seguidamente se ejerce presión uniformemente con

el pulgar sobre el cubreobjeto para que los cromosomas se dispersen y al hacerse visibles se encuentren en un mismo plano (**Valladolid et al., 2004**).

#### **9. Observación.**

La muestra debe ser analizada bajo un microscopio óptico. Se utiliza inicialmente un aumento de 10X x 10X para buscar células contables, luego a un aumento mayor de 10X x 40X con el fin de seleccionar las mejores células y finalmente con el objetivo de inmersión de 10X x 100X para realizar el recuento (**Valladolid et al., 2004**).

#### **10. Tratamiento de los datos.**

La MODA, es un diseño estadístico que se utiliza para estimar el número de cromosomas debido a la naturaleza del estudio. **Steel & torrie (1992)**, define como una medida de tendencia central, el valor de mas frecuente ocurrencia.



## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 MATERIALES

#### 4.1.1 Material Vegetal

Para el presente estudio se utilizaron semillas botánicas de reciente cosecha de 10 Accesiones promisorias de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.), procedentes de la Colección Nacional de la Subdirección de Investigación en Recursos Genéticos y Biotecnología de la Estación Experimental Agraria “El Porvenir” del INIA y 02 ecotipos silvestres: Apangurayacuyo (*Plukenetia volubilis* L.) y Lamas (*Plukenetia huayllabambana*), colectados en la Provincia de Lamas, Departamento de San Martín, en el marco del desarrollo del Sub-Proyecto “Generación de líneas élites de Sachá Inchi (*Plukenetia volubilis* L.), de alta productividad, con alto contenido de aceites omega y tolerantes a nemátodos (*Meloidogyne* spp.) para su cultivo en la región amazónica” (Cuadro N°03).

**Cuadro N° 03:** Material genético estudiado.

N° de orden	Accesión/Ecotipo	Procedencia
1	PER000394	Shilcayo-San Martín
2	PER000395	Pinto recodo- San Martín
3	PER000396	Cumbaza- San Martín
4	PER000397	Barranquita-San Martín
5	PER000405	Muyuy-Loreto
6	PER000406	Pacaya-Loreto
7	PER000409	Tamboyaguas-Loreto
8	PER000415	Tabatinga-Brasil
9	PER000416	Chazuta-San Martín
10	PER000420	Río Palmira-Loreto
11	Apangurayacu	Lamas-San Martín
12	Lamas	Lamas-San Martín



**Foto 01:** Cápsulas y semillas de la accesión PER000394



**Foto 02:** Cápsulas y semillas de la accesión PER000395



**Foto 03:** Cápsulas y semillas de la accesión PER000396



**Foto 04:** Cápsulas y semillas de la accesión PER000397



**Foto 07:** Cápsulas y semillas de la accesión PER000405



**Foto 08:** Cápsulas y semillas de la accesión PER000406



**Foto 07:** Cápsulas y semillas de la accesión PER000409



**Foto 08:** Cápsulas y semillas de la accesión PER000415



**Foto 09:** Cápsulas y semillas de la accesión PER000416



**Foto 10:** Cápsulas y semillas de la accesión PER000420



**Foto 11:** *P. volubilis* (Apangurayacu)



**Foto 12:** *P. huayllabambana* (Lamas)

#### 4.1.2 Materiales de laboratorio

##### a) Material de vidrio

- Beker de 100 y 600 ml
- Frascos de vidrio c/oscuro.
- Fiola de 100 y 1000 ml.
- Láminas porta objetos y cubre objetos
- Matraz de 50 ml.
- Placas petri de vidrio 100 x 15mm
- Probeta de 100 y 250 ml
- Tubos de ensayos de 30 ml

##### b) Equipos

- Agitador magnético
- Baño María
- Balanza analítica
- Cámara digital
- Laptop
- Micropipetas de 100ul, 1000ul y 5ml
- Microscópio
- Refrigeradora Soporte universal

##### c) Otros

- Aceite de inmersión
- Cling graf
- Estilete.
- Embudo de plástico

- Frascos de plásticos
- Guantes quirúrgicos
- Hoja de Bisturi N°10
- Lejía
- Mascarillas
- Mandil.
- Papel toalla.
- Papel filtro circular N° 5
- Papel aluminio
- Parafilm
- Plumon indeleble
- Pinza de acero inoxidable
- Rejillas de metal y de plástico
- Puntas o tips de 100-200ul,1000ul y 5ml
- Tubos de plástico eppendorf

**d) Reactivos**

- Ácido acético Glacial 99.7%
- Ácido clorhídrico 35%
- Alcohol puro 96°
- Colchicina 95%
- Etanol absoluto 99.7%
- 8 hidroxiquinolina
- Orceina

## 4.2 METODOLOGÍA

### 4.2.1 Ubicación del Experimento

El presente trabajo de investigación se ejecutó en el Área de Extracción de ADN y Citogenética, bajo condiciones ambientales, de los Laboratorios de la E.E.A “El Porvenir”, ubicado en el Km. 14,5 Carretera Sur “Fernando Belaunde Terry” – Distrito de Juan Guerra, Provincia y Región de San Martín, entre los meses de Agosto 2008 a Marzo 2009.



**Foto 13: ÁREA DE EXTRACCIÓN DE ADN Y CITOGENÉTICA**  
Laboratorio de Biología Molecular y Citogenética – E.E.A. “El Porvenir”

#### 4.2.1.1 Ubicación Geográfica.

Longitud Oeste : 76° 5'

Latitud Sur : 6° 35'

Altitud : 232 m.s.n.m

#### 4.2.1.2 Ubicación Política.

Distrito : Juan Guerra  
Provincia : San Martín  
Región : San Martín

#### 4.2.2 Conducción del Experimento.

##### 4.2.2.1 Cosecha y secado.

En el lote A1 de los campos experimentales de la E.E.A. “El Porvenir”, se cosecharon cápsulas de sachá inchi de cada una de las 10 accesiones promisorias en plena producción y de los 2 ecotipos silvestres se cosecharon en campos aislados de agricultores, en la Provincia de Lamas. Las cápsulas cosechadas fueron colocadas en bolsas plásticas con su respectiva identificación, luego se secaron a temperatura ambiente durante 24 horas, en el invernadero de la E.E.A. “El Porvenir” – INIA.



Foto 14, 15, 16: Cosecha de cápsulas de Sacha Inchi



**Foto 17, 18, 19:** *Secado de cápsulas de Sacha Inchi*

#### 4.2.2.2 Siembra.

Las semillas previamente desinfectadas con Hipoclorito de sodio al 2% (lejía), durante 10 minutos y posteriormente enjuagadas con agua destilada, se realizó la siembra en cámara húmeda preparadas especialmente con placas petric recubierta con una capa de papel toalla humedecido con agua destilada, colocándose 5 semillas de cada accesión por cámara húmeda, puestas a tempera ambiente (lab.).



**Foto 20, 21 y 22:** *Desinfección de semillas de sachu inchi*



**Foto 23, 24 y 25:** Siembra de semillas de Sacha Inchi en cámara húmeda (Placa petric con papel toalla humedecida con agua destilada)



**Foto 26, 27 y 28:** Siembra de semillas del ecotipo ecotipo Lama (*P huayllabambana*) en macetas

Sólo en caso del ecotipo silvestre Lamas (*Plukenetia huayllabambana*), las semillas se sembraron en macetas de arcilla (1.5kg) con arena lavada de río, debido a que presentaban un mayor tamaño que hacia dificultoso la pregerminación en cámara húmeda, los riegos se realizaron cada 2 a 3 días para mantener una humedad adecuada.

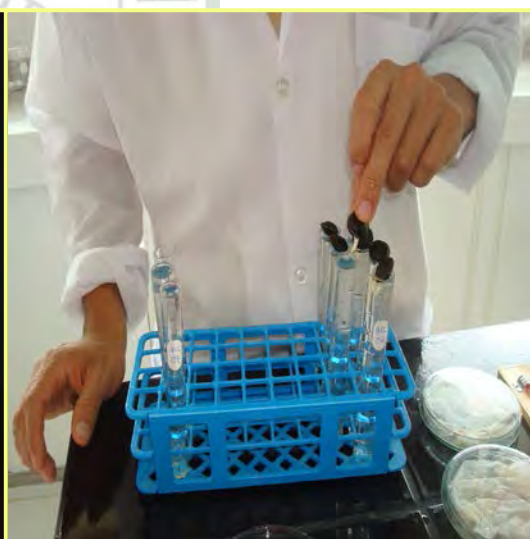


#### 4.2.2.3. Obtención de raíces.

Una vez germinadas las semillas, con una raíz principal 1 cm aproximadamente de longitud, fueron colocadas en tubos de ensayo de 30 ml con agua de caño renovada cada 24 horas para evitar la pudrición de las raíces, y así conseguir a los 4 a 7 días un enraizamiento de mayor proliferación de raíces secundarias.



**Foto 29:** Germinación de semillas de Sacha Inchi de 1 cm de longitud aproximadamente



**Foto 30:** Puesta de semillas germinadas de Sacha Inchi en tubos de ensayo con agua de caño.

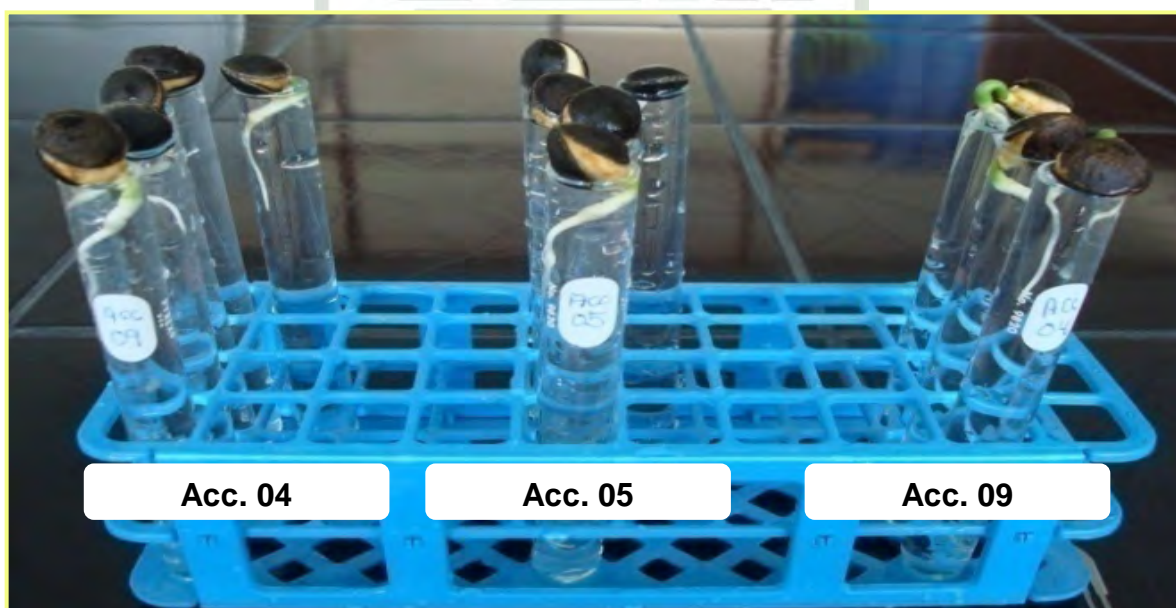


**Foto 31:** Obtención de mayor proliferación de raíces secundarias, aproximadamente a los 4 y 5 días después de la siembra

#### 4.2.2.4. Hora de colección

Para el análisis del número cromosómico es necesario establecer el periodo en el cual se dividen intensamente las células meristemáticas. En esta etapa se determinó previamente el Índice Mitótico (IM) e Índice de Fase (IF), para lo cual se trabajaron con tres accesiones representativas: 04 (PER000397), 05 (PER000405) y 09 (PER000416), siguiendo la metodología descrita por Talledo *et al.* (1993), mencionado por Valladolid *et al.* (2004), utilizado por Basurto (2004), Blas (1997) y Talledo & Escobar (2004), se efectuó de la siguiente manera: las raíces secundarias se cortaron cuando éstas alcanzaron de 1.5 a 2 cm de longitud en un lapso de tiempo comprendido desde las 07 hasta las 18 horas con intervalos de corte de 1 hora. Una vez cortadas las raíces, se colocaron en tubos eppendorf fijándose en Carnoy (3 partes de etanol absoluto: 1 parte de ácido acético glacial) y se mantuvieron en refrigeración a una temperatura de 4°C por 24 horas. Después de la fijación se lavó el material en agua destilada y se hidrolizó en Ácido Clorhídrico (HCL) 1N en baño maría a 60° C por 8 a 12 minutos. La tinción se realizó con aceto orceína al 2% por 24 horas puesto en refrigeración a 4°C. Se cortó el extremo de la raíz con un bisturí en una lámina porta objeto, cubriéndose luego con el cubre objeto se hizo el aplastado con el dedo pulgar procurando no producir deslizamiento del cubreobjeto. Las observaciones de las distintas etapas de la división celular se

realizaron mediante un microscopio óptico, a un aumento final de 1000 X y se registró con microfotografías 20 campos ópticos por accesión y por cada hora evaluada. Utilizando el programa Adobe Photoshop CS versión 8.0 en una computadora se evaluó las distintas etapas de la división celular de *Plukenetia volubilis* L. (Sacha inchi).



**Foto 32:** *Accesiones Representativas*



**Foto 33:** *Corte de ápices radiculares (1.5 a 2cm)*



**Foto 34:** FIJACIÓN en solución CARNOY (3 partes parte etanol absoluto y 1 de ácido acético), por 24 h. a 4 °C



**Foto 35:** HIDRÓLISIS en ácido clorhídrico (HCL) 1N, en baño maría a 60°C por 8 o 12 minutos.



**Foto 36:** TINCIÓN de los ápices radiculares en ácido orceína al 2%, por 24 horas de exposición a una temperatura de 4°C.



**Foto 37:** APLASTADO de los ápices radiculares en una lámina porta objeto



**Foto 37:** OBSERVACIONES microscópicas del proceso de división celular y toma de microfotografías



**Foto 38:** EVALUACIÓN de la hora de colección de *Plukenetia volubilis* L.

#### 4.2.2.5. Determinación de la técnica para el conteo de cromosomas.

Para la determinación del número de cromosomas de *Plukenetia volubilis* L. *Plukenetia huayllabambana*. se utilizó la técnica de aplastado de puntas de raíces con tinción monocromática tal como propone Sharma y Sharma (1980) y Talledo *et. al.* (1993), citado por Valladolid *et al.* (2004), con algunas modificaciones. Se desarrollaron los siguientes ensayos, para determinar los procedimientos más adecuados en las siguientes fases:

##### 1. Prefijadores.



Foto 39: *Accesión Representativa*



Foto 40: *Corte de las raicillas*



Foto 41: *PREFIJACIÓN de las raicillas*

En esta fase se utilizó los ápices radiculares de una de las accesiones en estudio empleándose tres agentes inhibidores mitóticos a una temperatura de 4 °C a diferentes concentraciones y tiempo de exposición de: 2, 4, 6 y 8 horas, indicados en el Cuadro N° 04. Para ello se utilizó 4 tubos eppendorf para colchicina e 8-hidroxiquinolina y 1 de agua destilada a una temperatura de 4°C, realizándose los procedimientos siguientes (Fijación-Maceración-Tinción-Aplastado-Observación).

**Cuadro N° 04:** Prefijadores evaluados

Pre-fijadores	Concentración [ ]	Temperatura (°C)	Tiempo (horas)
Colchicina	0.01%	4	2, 4, 6 y 8
	0.05%		
	0.5%		
	1%		
8-Hidroxiquinolina	0.0005M		
	0.001M		
	0.002M		
	0.003M		
Agua Destilada helada	100%		

## 2. Fijación.

Previo lavado con agua destilada los ápices radiculares, se fijaron en solución Carnoy 3:1 (3 partes de etanol absoluto y 1 parte de ácido acético glacial), durante 24 horas a 4 °C.



**Foto 42, 43 y 44:** FIJACIÓN en CARNOY 3:1 (3 etanol absoluto : 1 ácido acético glacial) por 24 horas a 4°C

### 3. Hidrólisis.

Los ápices radiculares se lavaron con agua destilada y se facilitó la hidrólisis de estas raíces aplicando ácido clorhídrico 1N en baño maria a 60 °C por 8 a 12 minutos.



Foto 45, 46 y 47: HIDRÓLISIS en ácido clorhídrico (HCL) 1N en baño maria a 60°C por 12

### 4. Tinción.

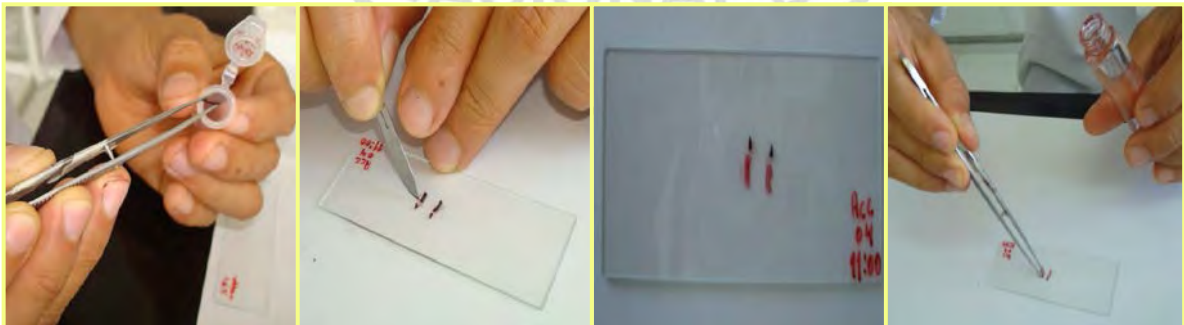
Las raíces se enjuagaron con agua destilada y se realizó la tinción con aceto orceína al 2% por 24 horas a 4 °C.



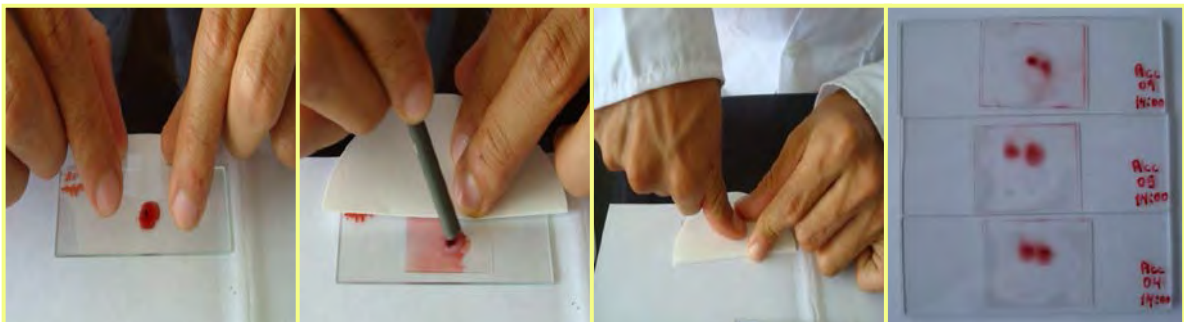
Foto 48, 49 y 50: TINCIÓN de los ápices radiculares con aceto orceína al 2% por 24 horas a 4°C

## 5. Aplastado o squash

Con la ayuda de un bisturí se cortaron aproximadamente entre 2 a 3 mm de longitud los extremos de los ápices radiculares de raíces teñidas sobre un porta objeto, añadiéndose una gota de ácido acético al 45% con el objetivo de aclarar el citoplasma. La muestra fue cubierta con el cubre objeto y se dieron ligeros movimientos circulares sobre éste con la base de un estilete, con la finalidad de disgregar la punta de raicilla. Se utilizó papel filtro para cubrir la muestra, evitando así el desplazamiento del cubre objeto y seguidamente se ejerció presión uniforme con el dedo pulgar sobre el cubre objeto para que los cromosomas se dispersen y al hacerse visibles se encuentren en un mismo plano.



**Foto 51, 52 y 53:** Corte de ápices radiculares de 2 a 3 mm aproximadamente en el porta objeto, luego se añade una gota de ácido acético al 45% con el objetivo de aclarar el citoplasma



**Foto 54, 55 y 56:** Puesta el cubre objeto se dio movimientos circulares, después se cubrió la muestra con papel filtro y ejerciendo presión con el dedo pulgar se obtendrá cromosomas dispuestos en un solo plano



## 6. Observación

La muestra preparada se observó en un microscopio óptico, utilizando inicialmente un aumento de 10X x 10X para buscar células contables, luego a un aumento mayor de 10X x 40X con el fin de seleccionar las mejores células y finalmente con el aumento de 10X x 100X utilizando aceite inmersión, localizándose las células en metafase con disposición de cromosomas altamente condensados y dispersos.



**Foto 57:** *Observaciones microscópicas utilizando inicialmente un aumento de 10X x 10X, luego un aumento mayor de 10X x 40X y finalmente con el aumento de 10X x 100X*

### 4.2.3. Parámetros evaluados.

#### 1. Determinación de la hora de colección.

Se determinó el Índice Mitótico (IM), empleando la relación entre el número de células en división mitótica con respecto al número total de células observadas en el campo microscópico multiplicado por cien (100). Por otro lado, se determinó el índice de fase (IF) mediante el número de células observadas en cada fase mitótica definida entre el número total de células en mitosis o división, multiplicado por cien (Ferrer *et. al.*, 2007 y Matos & Molina, 1996)

$IM = (N^{\circ} \text{ de células en división} / N^{\circ} \text{ total de células observadas}) \times 100.$

$IF = (N^{\circ} \text{ de células en cada fase} / N^{\circ} \text{ total de células en mitosis}) \times 100.$

#### 2 Determinación de concentraciones de prefijadores para el conteo cromosómico.

Por cada concentración se evaluó 90 células en metafase en tiempos establecidos en el cuadro N° 04 con tres muestras, así mismo se determinó la calidad de las preparaciones de acuerdo con la visualización de las células aptas para el conteo a través del microscopio.

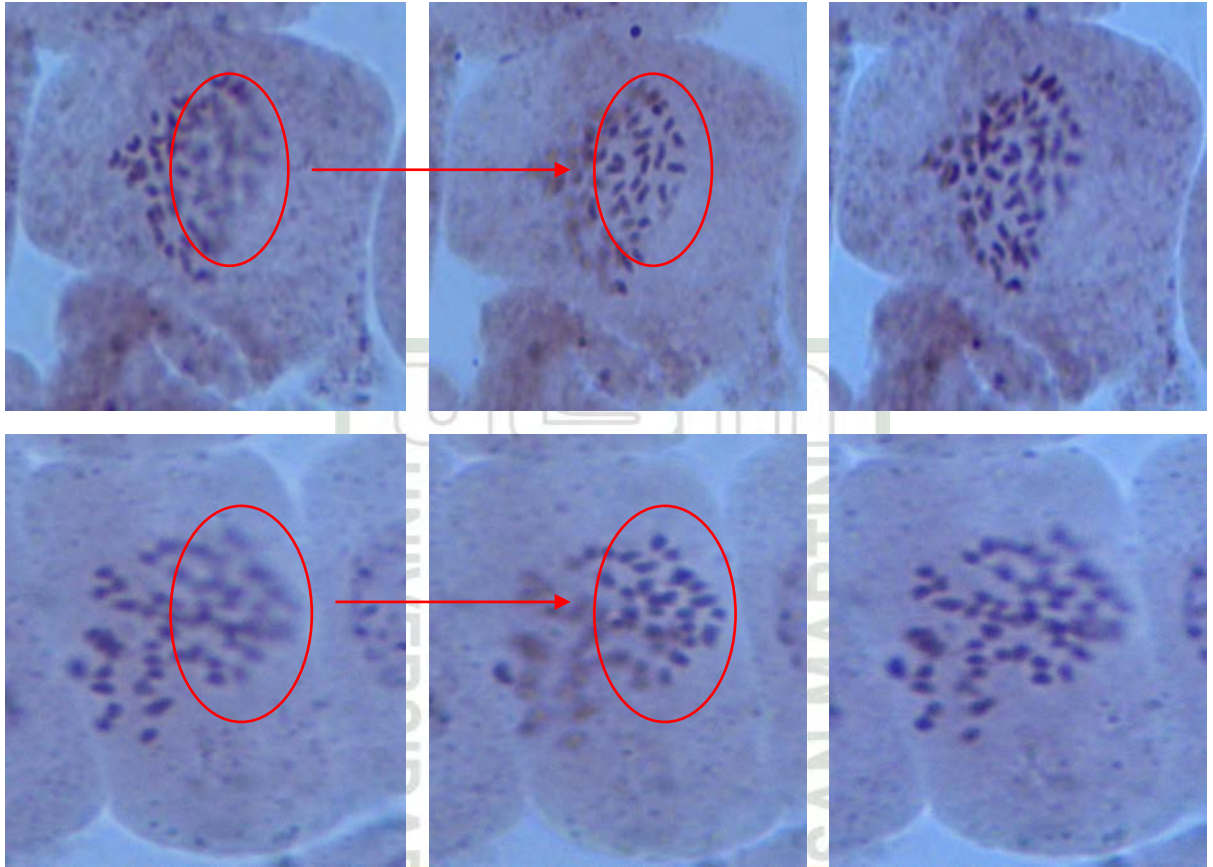
### 3. Determinación del número cromosómico

Se seleccionaron 30 células metafásicas de cada una de las 10 accesiones promisorias y 2 ecotipos silvestres, cuyas imágenes se capturaron con una cámara digital de 12.1 Megapixels adaptado al microscopio.



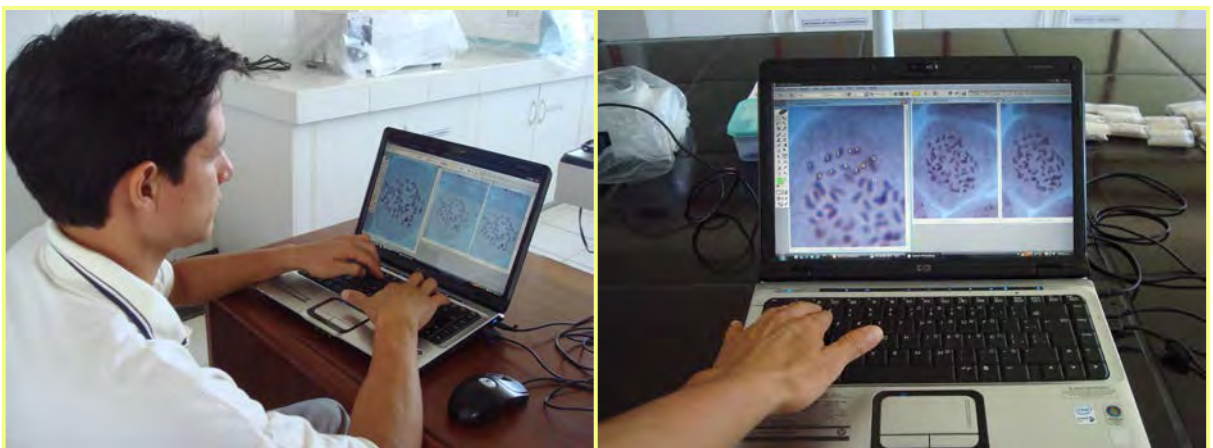
**Foto 58:** *Microfotografías de células metafásicas con cromosomas dispersos.*

Manipulando el macro y micrométrico del microscopio se tomaron tres microfotografías por cada célula seleccionada, con la finalidad de resaltar los cromosomas que no se encontraban en un mismo plano. De tal manera que en una de las fotografías se visualice un grupo de cromosomas que no se visualice con claridad en la otra fotografía.



**Foto 59, 60, 61, 62, 63 y 64:** Toma de 3 Microfotografías de una célula de Sacha Inchi, para resaltar los cromosomas que no se observan en un mismo plano

Utilizando el programa Adobe Photoshop CS versión 8.0 en una computadora se realizó el conteje cromosómico de 360 células de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L. y *Plukenetia huayllabambana*).



**Foto 65 y 66:** Contaje cromosómico de células metafásicas utilizando Adobe PhotoShop CS 8.0

#### 4.2.4. Análisis Estadístico

Por la naturaleza del estudio se determinó el número de cromosomas utilizando la moda, es decir el valor de más frecuente ocurrencia (Steel & Torrie, 1992), encontrado a partir de 30 células metafásicas correspondientes a cada uno de las 10 accesiones de *Plukenetia volubilis* L y 02 ecotipos silvestres (*Plukenetia volubilis* L y *Plukenetia huayllabambana*)



## V. RESULTADOS

### 5.1 Obtención de raíces

Se observó mayor enraizamiento en arena lavada de río, sin embargo dificultaba precisar el momento óptimo de realizar el corte de los ápices radiculares. El enraizamiento en agua de caño fue menor, pero nos permitió observar las raíces aptas para el corte, además nos permitió seguir disponiendo del material vegetal en estudio.

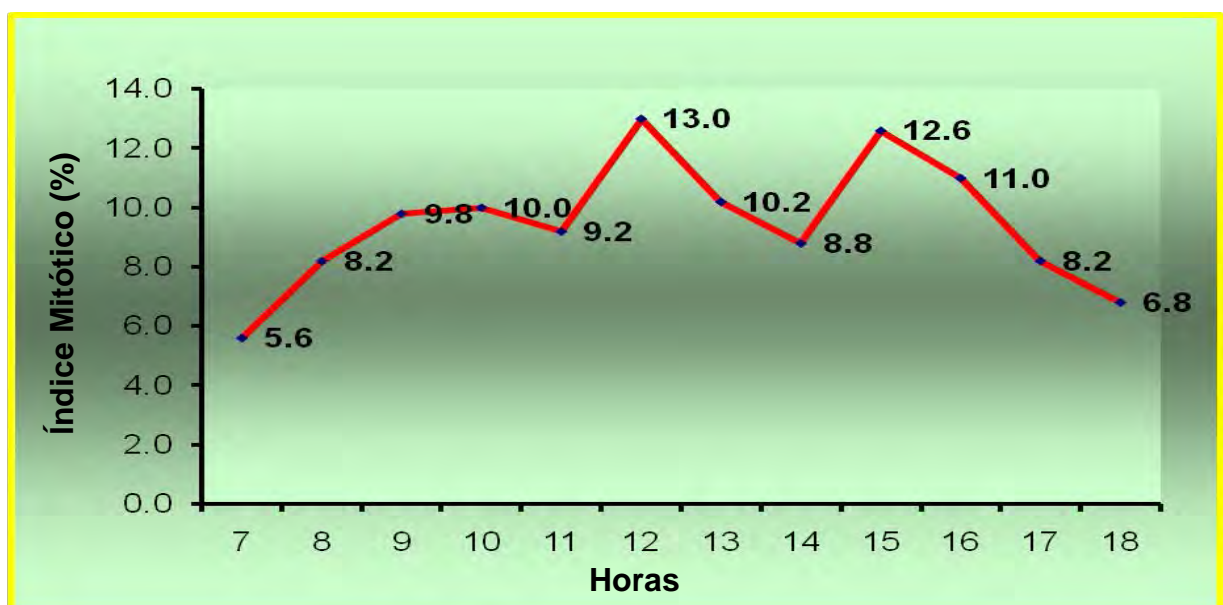
### 5.2 Hora de colección

En base a la evaluación cíclica para un periodo de 12 horas de los índice de fase (IF) e índice mitótico (IM), se estableció que la colecta más adecuada de raíces de *Plukenetia volubilis* L. en condiciones ambientales (Temperatura de 28.5°C) del Área de Extracción de ADN y Citogenética de los Laboratorio de la E.E.A. "El Porvenir"- Juan Guerra-San Martín, debe realizarse a las 12 horas en cualquier época del año, ya que se observan un mayor índice mitótico de 13 %, asimismo en esta hora ocurre una mayor frecuencia de células metafásicas. Durante las demás horas los IM fueron bajos, fluctuando entre 5.6% (7:00) y 11% (16:00). Sin embargo, el valor del IM registrado a las 15 horas también fue elevado, alcanzando el 12.6 %, lo cual se considera una alteración del flujo normal (Gráfico N° 01) de la división celular observados en otras especies como *Oxalis tuberosa* (Talledo & Escobar, 2004). Matos y Molina (1996), reportó que la mayor división celular en *Aloe vera* (zábila) ocurre a las 7:00 am. con un IM= 15.24%, este valor difiere poco con los resultados de *Plukenetia volubilis* L.; a diferencia de lo obtenido por Talledo & Escobar (2004) en *Oxalis*

*tuberosa* presentando un IM= 92.17%. Esta variación del IM podría deberse por efecto de la temperatura, al tipo de especie, tipo de célula, longitud de la raíz al ser cortada, hora de corte y otras posibles variables.

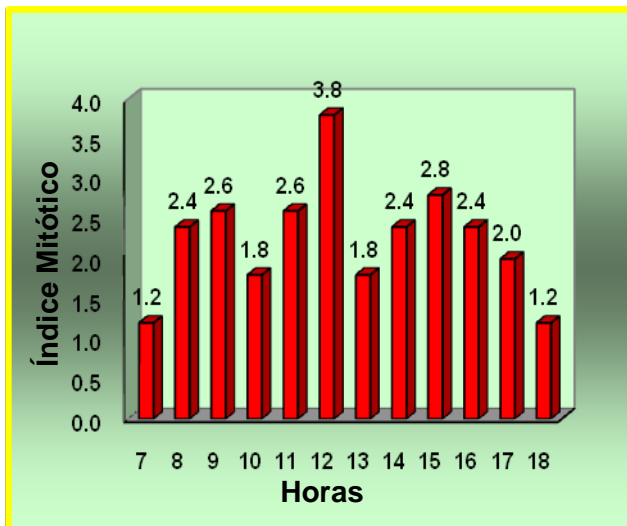
Los índices de fases obtenidos para células de meristemos radiculares de *Plukenetia volubilis* L. según el gráfico N° 02, nos indica que la mayor cantidad de células en profase ocurre a las 12:00 horas con un índice de fase de 3.8%, a diferencia de las 7:00 y 18:00 horas que se obtuvo un menor índice de fase de 1.2%, para la metafase se observó que a las 12:00 y 13:00 horas se reporta un mayor índice de fase con 4.8% y 4.2% respectivamente, ocupando la mayor parte de la población celular en división, a comparación de las 7:00 horas con bajo índice de fase de 1.4%. Las fases restantes acumulan células en mayor cantidad a las 10:00 horas (IF= 3.6%) en anafase y 15:00 horas (IF= 2.6%) en telofase. Esto nos indicaría la irregularidad del ciclo celular de *Plukenetia volubilis* L.

**Gráfico N°01:** Secuencia del ciclo celular en *Plukenetia volubilis* L, en condiciones de Laboratorio de la E.E.A. "El Porvenir", Juan Guerra 2008-2009

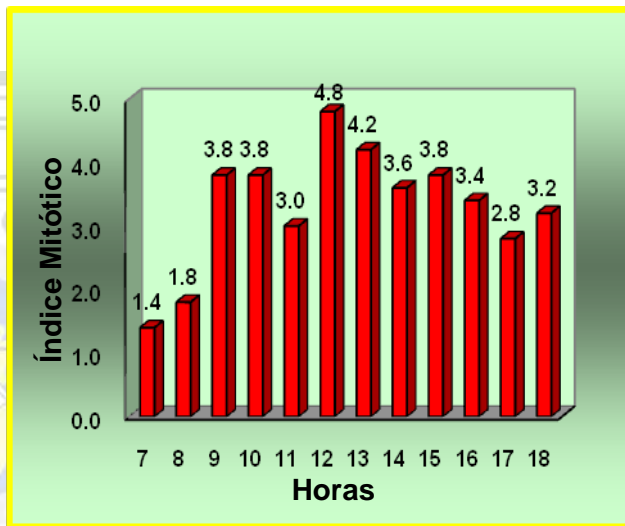


**Gráfico N° 02, 03, 04 y 05:** Secuencia de los índices de fases de *Plukenetia volubilis* L., en condiciones de Laboratorio de la E.E.A. "El Porvenir", Juan Guerra 2008-2009.

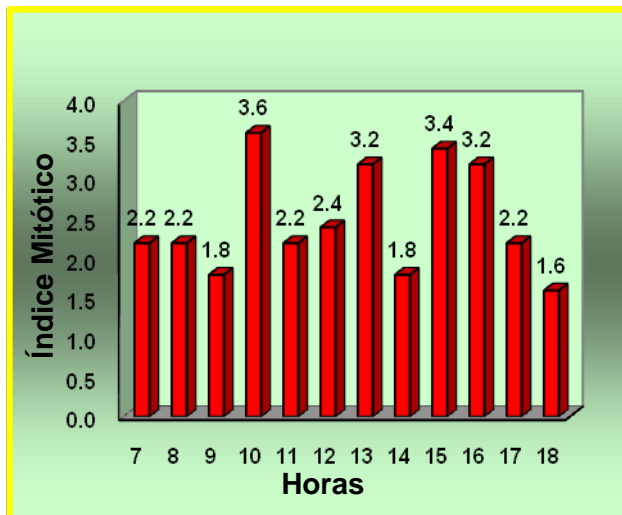
**Gráfico N° 02: Profase**



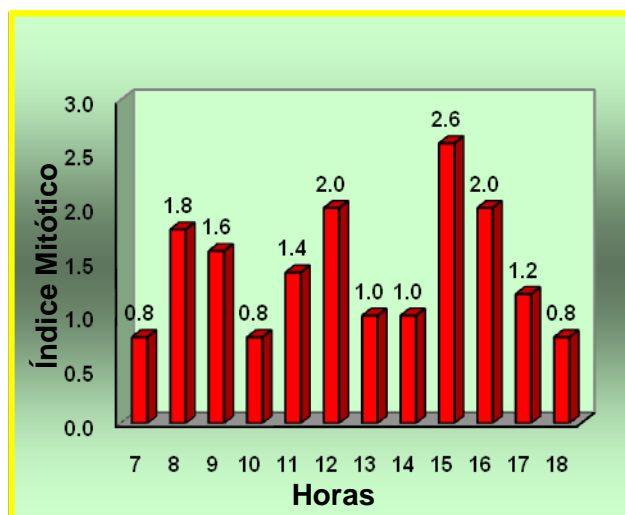
**Gráfico N° 03: Metafase**



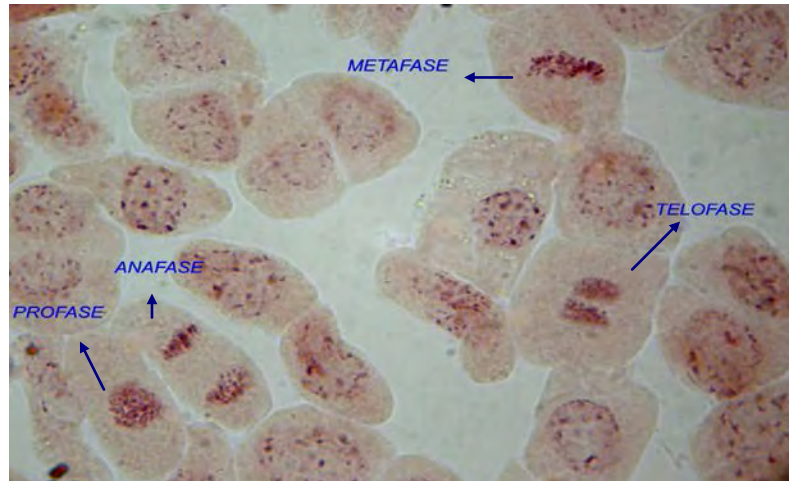
**Gráfico N° 04: Anafase**



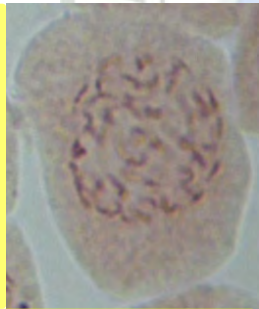
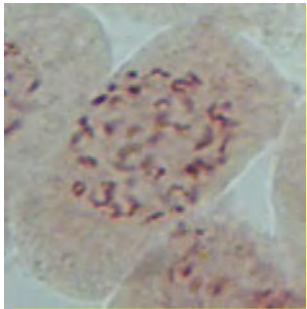
**Gráfico N° 05: Telofase**



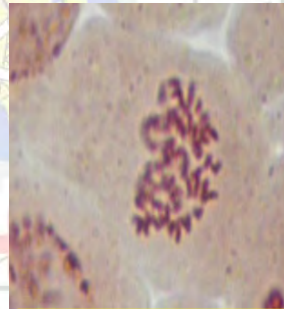




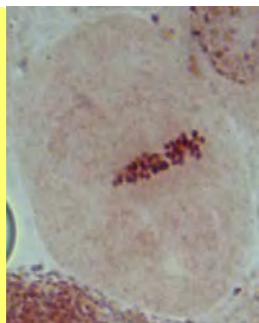
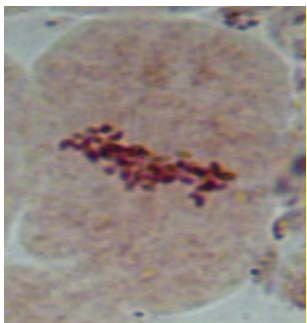
**Foto 67:** DIVISIÓN CELULAR EN *Plukenetia volubilis* L.



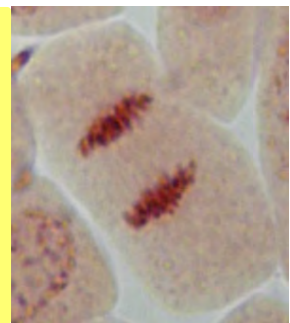
**Foto 68 y 69:** INTERFASE



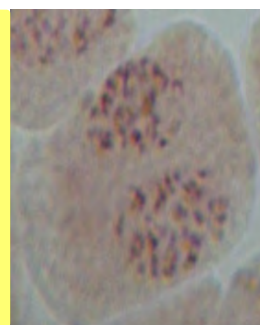
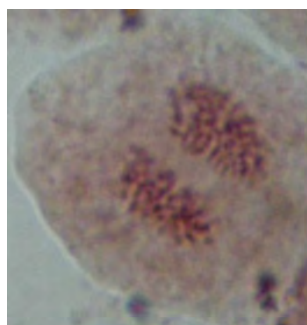
**Foto 70 y 71:** PROFASE



**Foto 72 y 73:** METAFASE



**Foto 74 y 75:** ANAFASE



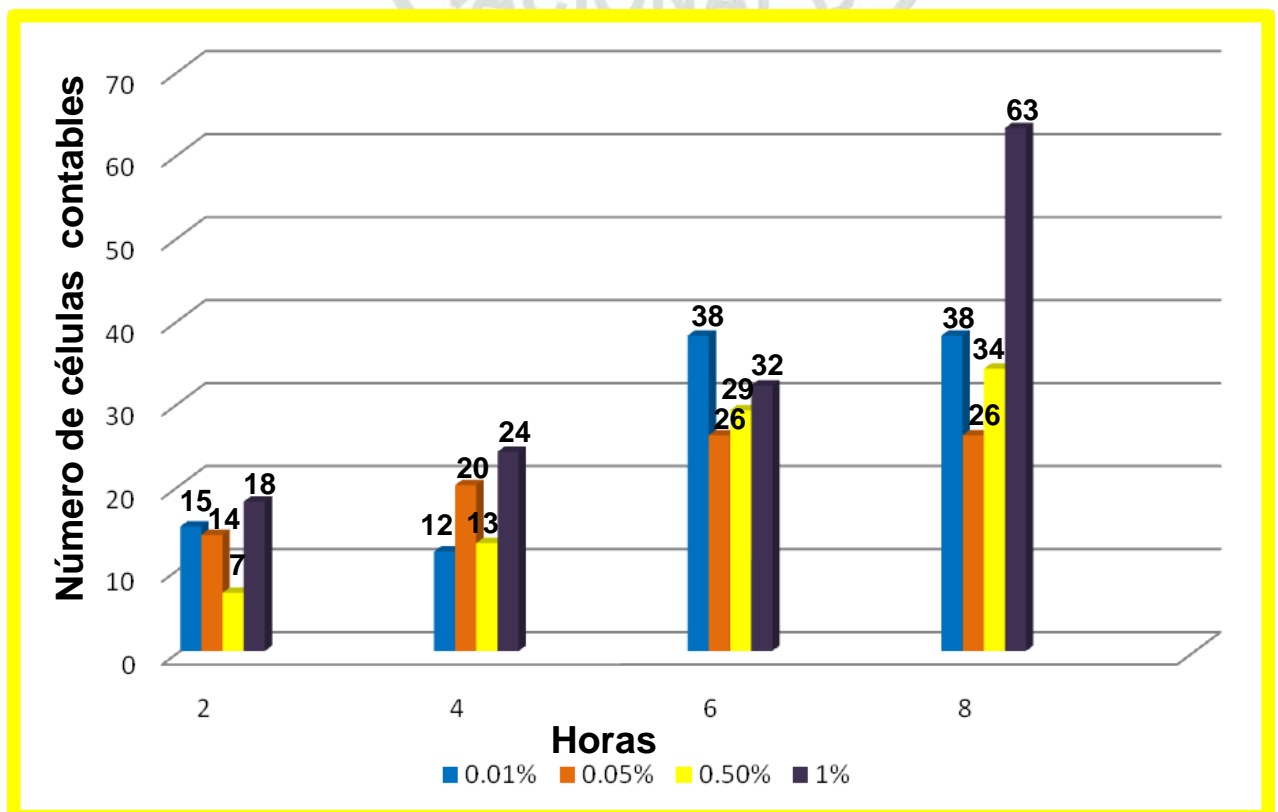
**Foto 76 y 77:** TELOFASE

### 5.3 Prefijadores

Los 3 prefijadores probados en el presente trabajo de investigación fueron eficientes en la obtención de células metafásicas:

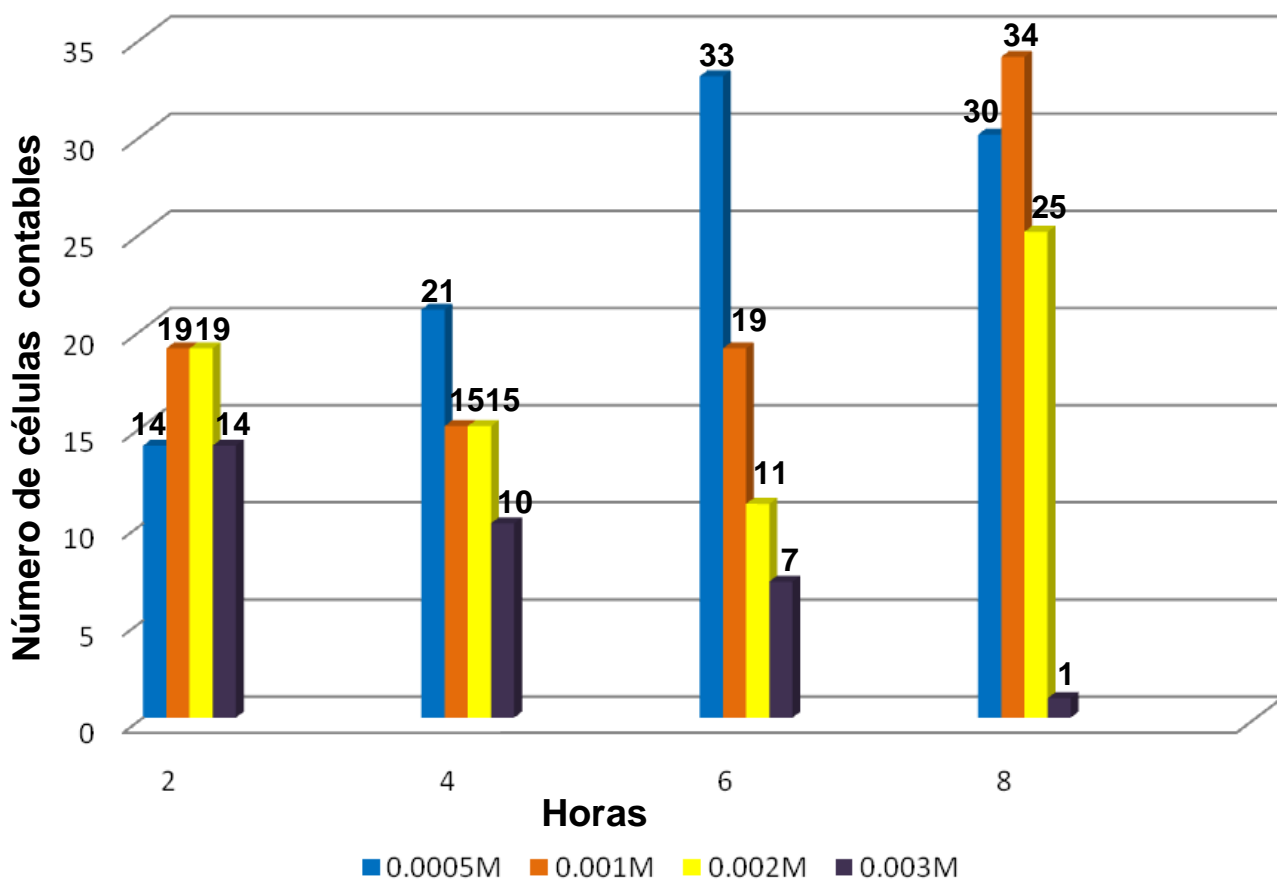
1. Colchicina. La mejor concentración fue de 1% por 8 horas a 4 °C, encontrando mayor número de células en metafase con cromosomas bien definidos, facilitando el conteo. También se obtuvieron buenos resultados en las demás concentraciones (0.01%, 0.05% y 0.5%) a 6 y 8 horas de exposición, a diferencia de 2 y 4 horas, en la cual se presentaron pocas células metafásicas con cromosomas dispersos.

**Gráfico N°06:** Prefijación con colchicina a 2, 4, 6 y 8 horas, en condiciones de Laboratorio de la E.E.A. "El Porvenir", Juan Guerra 2008-2009



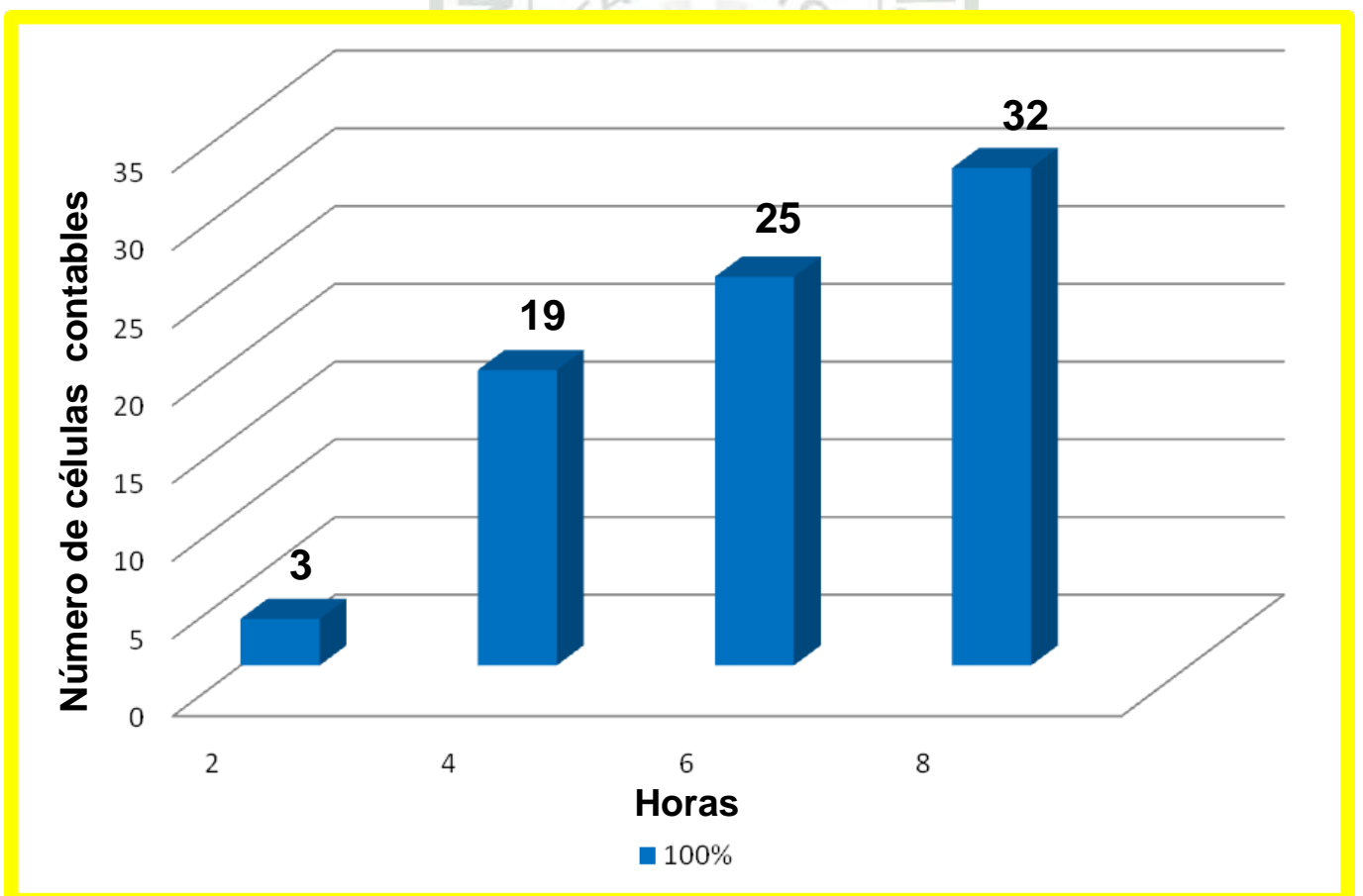
2. 8-Hidroxiquinolina. Se logró obtener las mejores células metafásicas con 0.0005M y 0.001M a 4 °C tratadas durante 6 y 8 horas respectivamente. Asimismo todas las concentraciones evaluadas alcanzaron una acumulación importante de células en metafase aceptables. Sin embargo a concentraciones relativamente altas se encontró cromosomas más condensados y agrupados, lo cual dificulta el conteo.

**Gráfico N°07:** Prefijación con 8-Hidroxiquinolina a 2, 4, 6 y 8 horas, en condiciones de Laboratorio de la E.E.A. "El Porvenir", Juan Guerra 2008-2009



3. Agua destilada helada. El empleo de agua destilada helada durante 8 horas de prefijación a 4°C dieron buenos resultados y a medida que disminuye las horas de exposición disminuye también las células metafásicas apto para el conteo.

**Gráfico N°08:** Prefijación con agua destilada helada a 2, 4, 6 y 8 horas, en condiciones de Laboratorio de la E.E.A. "El Porvenir", Juan Guerra 2008-2009



#### 5.4 Número cromosómico

Las 10 accesiones promisorias y el ecotipo silvestre Apangurayacu ambas de la especie de *Plukenetia volubilis* L. presentaron con mayor frecuencia números cromosómico de 42, 44, 48, 52, 54, 56, 58, 62 y con menor frecuencia se encontraron células con: 64, 72, 76, 82, 86, 90, 96 y 101 cromosomas.

**Cuadro N° 05:** N° cromosómico con > y < frecuencia en *Plukenetia volubilis* y *Plukenetia huayllabambana*

N° Cromosómico > frecuencia	N° Cromosómico < frecuencia
42	101
44	96
48	90
52	86
54	82
56	76
58	72
62	64

Asimismo; el ecotipo silvestre Lamas de la especie *Plukenetia huayllabambana* presentó un recorrido cromosómico comprendido dentro del rango de *Plukenetia volubilis* L., al hacer el análisis estadístico de las 330 células evaluadas (30 por cada tratamiento), utilizando la moda por la naturaleza del estudio, se determinó que *Plukenetia volubilis* L. y *Plukenetia huayllabambana* tiene 56 cromosomas (fotos N° 88 y 89).

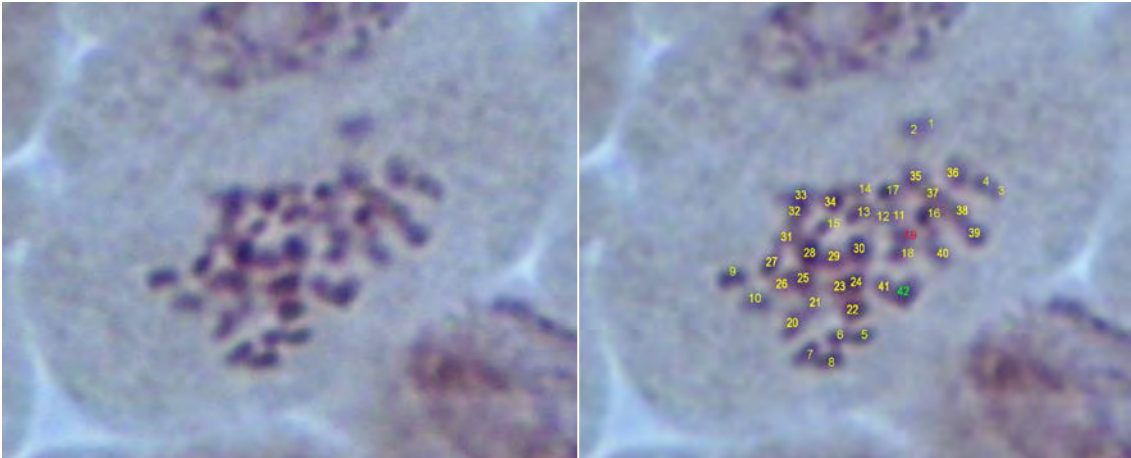


Foto 78 y 79: 42 Cromosomas

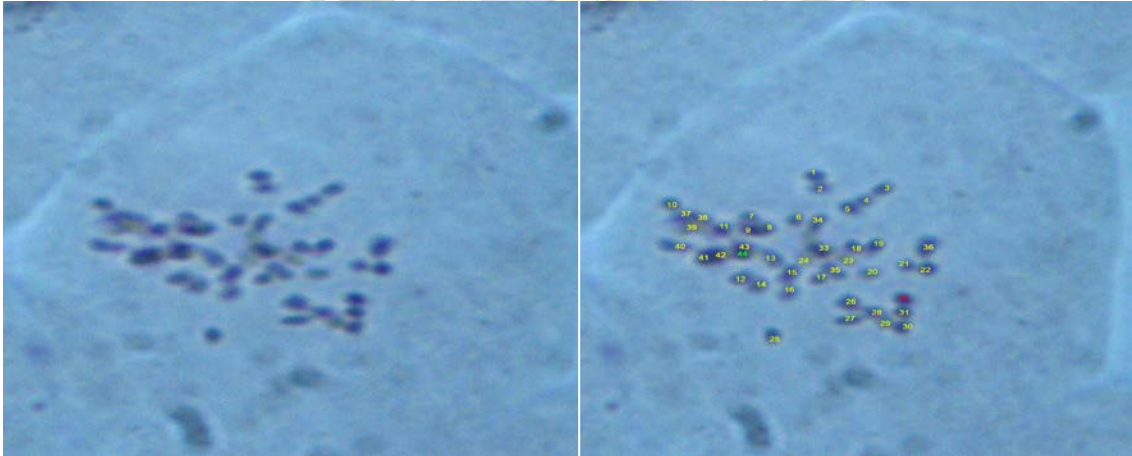


Foto 80 y 81: 44 Cromosomas

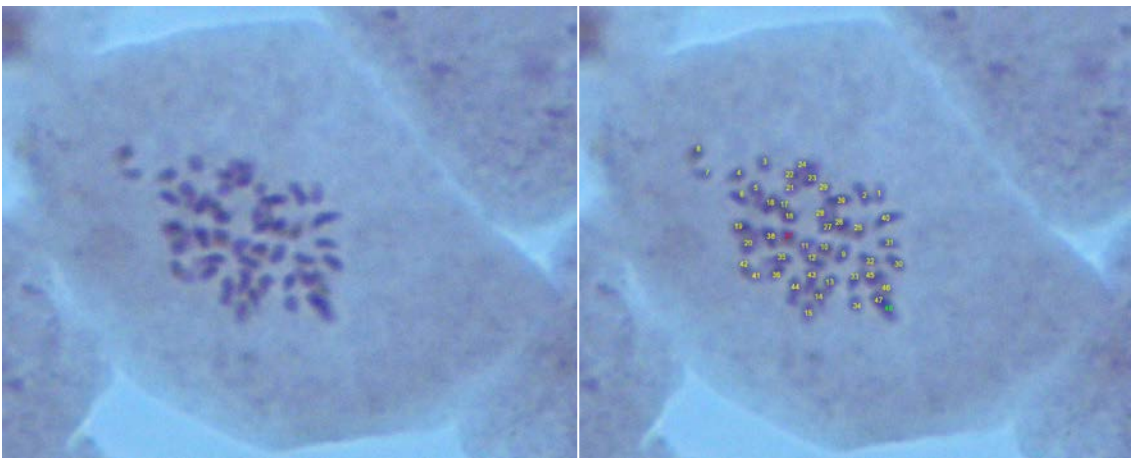


Foto 82 y 83: 48 Cromosomas

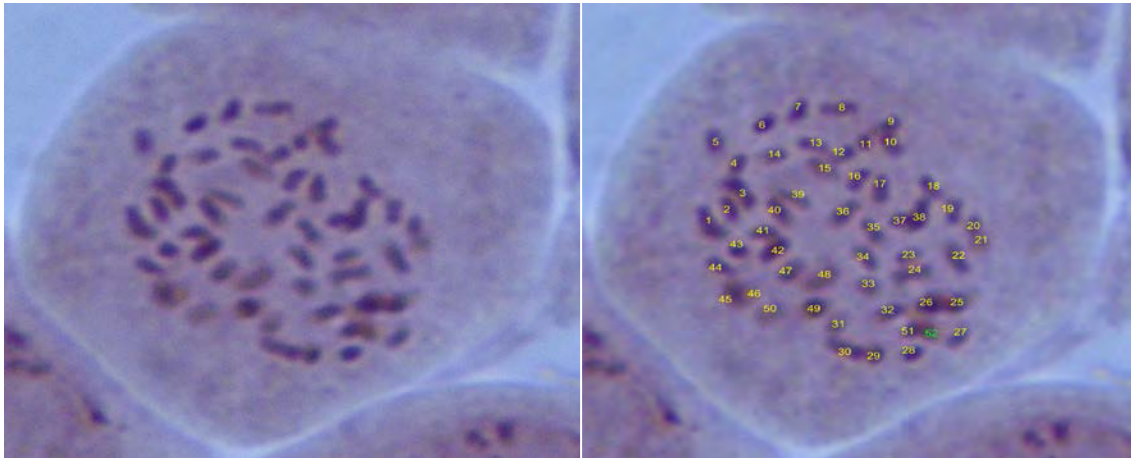


Foto 84 y 85: 52 Cromosomas

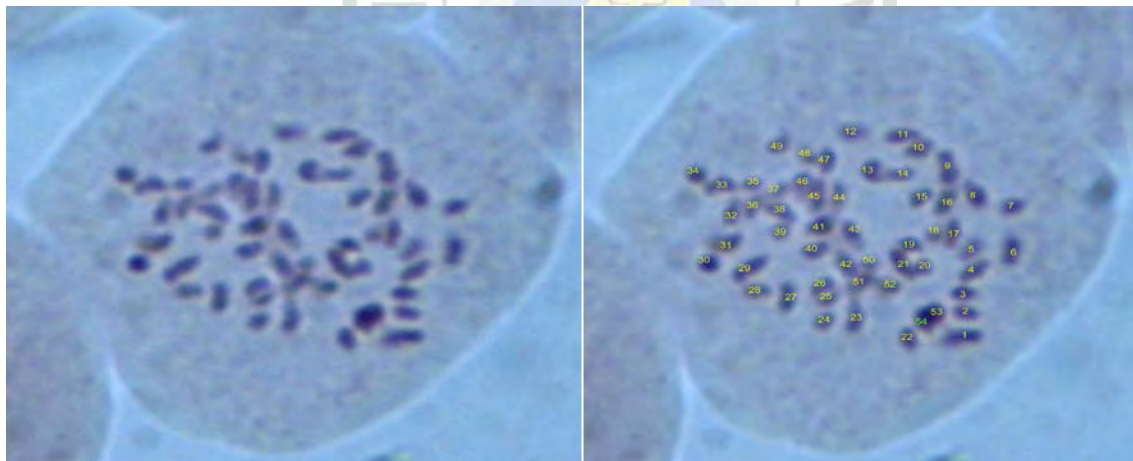


Foto 86 y 87: 54 Cromosomas

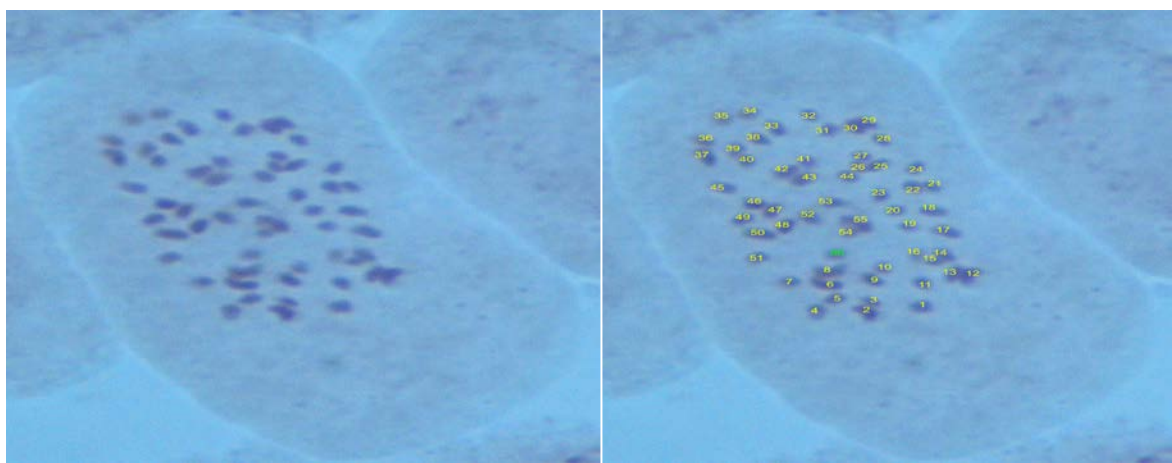


Foto 88 y 89: 56 Cromosomas

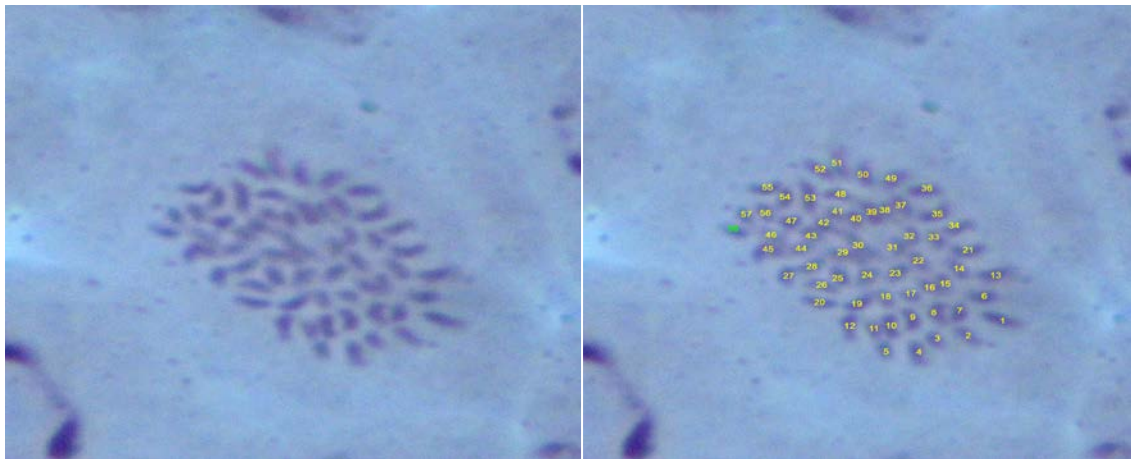


Foto 90 y 91: 58 Cromosomas

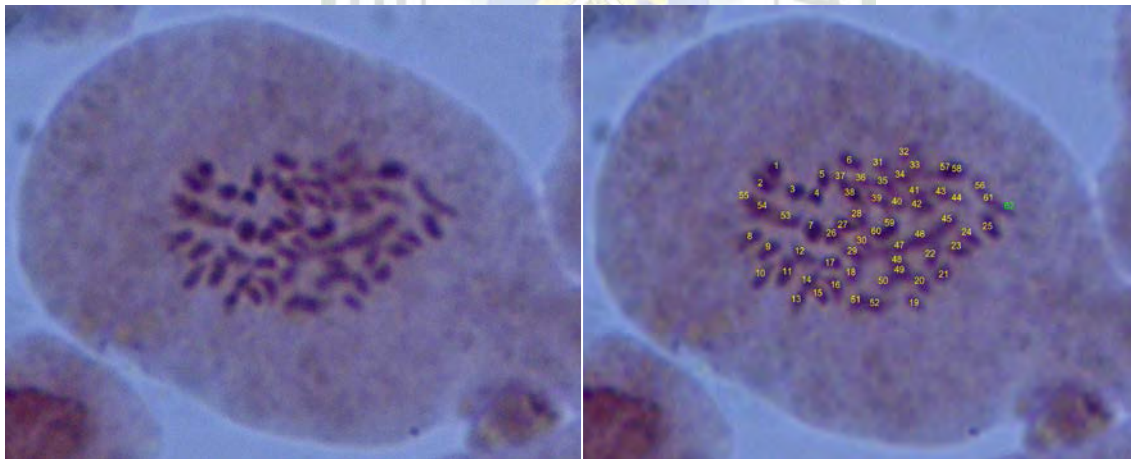
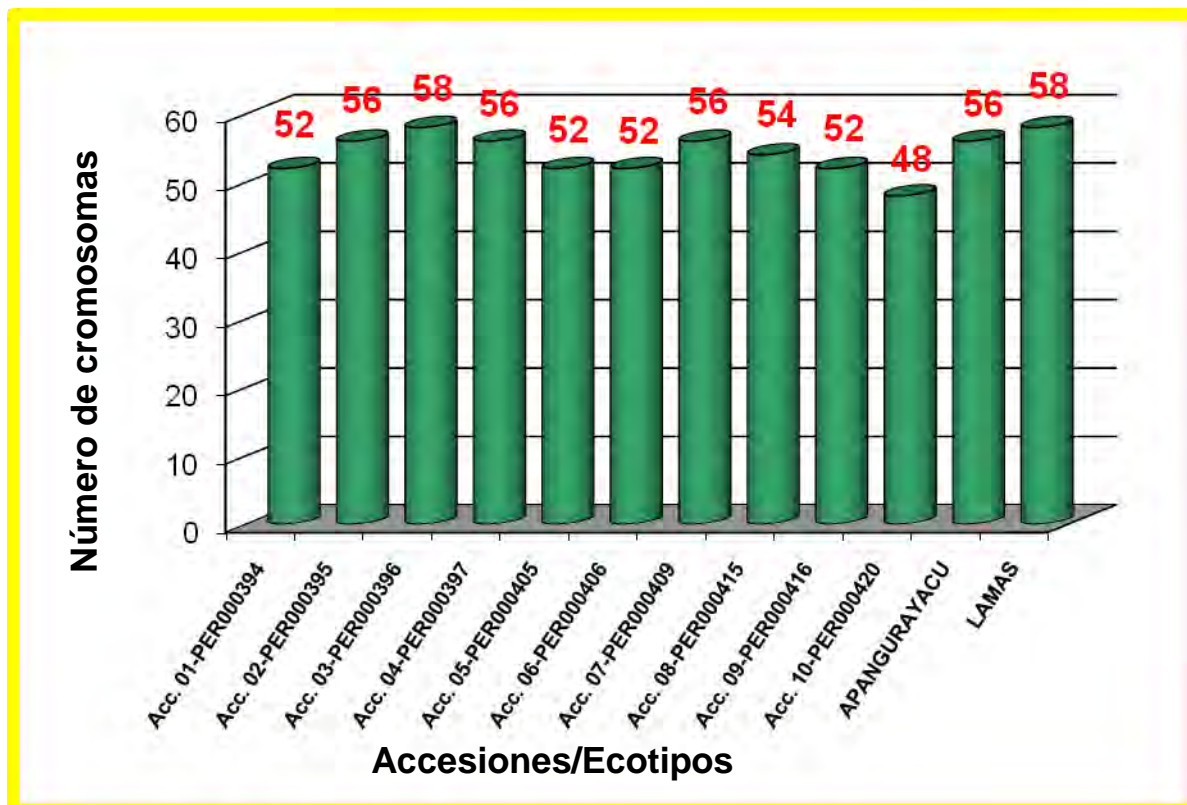


Foto 92 y 93: 62 Cromosomas

En el gráfico N° 09 se observa que la accesión PER000420 tiene 48 cromosomas; las accesiones PER000394, PER000405, PER000406, PER000416 presentan 52 cromosomas; la accesión PER000415 presentan 54 cromosomas; las accesiones PER000395, PER000397, PER000409 tienen 56 cromosomas y la accesión PER000396 presenta 58 cromosomas; mientras que los ecotipos silvestres Apangurayacu (*Plukenetia volubilis* L.) y Lamas (*Plukenetia huayllabambana*) presentan 56 y 58 cromosomas respectivamente.



**Gráfico N° 09:** Número de cromosomas observados en 10 accesiones promisorias de *Plukenetia volubilis* L. y 02 ecotipos silvestres: Apangurayacu (*Plukenetia volubilis* L.) y Lamas (*Plukenetia huayllabambana*), en condiciones de Laboratorio de la E.E.A. "El Porvenir", Juan Guerra 2008-2009



Nuestros resultados muestran que el nivel de ploidía de la población estudiada, conformada por las 10 accesiones de *Plukenetia volubilis* L. de la SUDIRGEB – INIA, el ecotipo silvestre “Apangurayacu” (*Plukenetia volubilis* L.) y el ecotipo “Lamas” (*Plukenetia huayllabambana*), es un Heptaploide con un número cromosómico  $2n= 7x= 56$ , siendo el número básico  $x=8$ , coincidiendo con Martín (1976), citado por Ceballos & de la Cruz (2001), indica que en la familia Euphorbiaceae, usualmente, el número cromosómico básico es 8, aunque el rango de variación oscila entre 6 a 11 aproximadamente. Entonces el ecotipo “Lamas” de la especie *Plukenetia huayllabambana*, tendría 02 cromosomas adicionales:  $2n= 7x= 56 + 2$ , con número básico  $x= 8$  Heptaploide.

## VI. DISCUSIONES

### 6.1 Hora de colección

La mejor hora de colección para determinar el índice mitótico (IM) en los ápices radiculares de *Pukenetia volubilis* L. es aquella que es realizada durante las 12 horas del día con un IM= 13% pudiendo de esta manera hacer más fácil el conteo de cromosomas, puesto que estos se encuentran bien condensados y dispersados, sin embargo, el valor del IM registrado a las 15 horas también fue elevado, alcanzando el 12.6 %, lo cual se considera una alteración del flujo normal (Gráfico N° 01) de la división celular observado en otra especie como *Oxalis tuberosa* (Talledo & Escobar, 2004). Algunos autores han trabajado con plantas para investigar la hora de colección en células radicales, manteniéndose el mayor índice en horas de la mañana, entre estos: Basurto (2004) reportó que la hora de colección en 7 genotipos de algodón, está entre las 9:00 a 11:00 horas. En *Aloe Vera* L., (zábila) es a las 7:00 horas (Matos y Molina, 1996), para cultivos andinos la mejor hora de colección son: en arracacha de 9:00 a 12:00 horas en las condiciones de La Molina (Blas, 1997), mientras que Talledo y Escobar (2004) encontraron de 7:30 a 8:30 horas en oca, sin embargo los mismos autores reportaron a las 14:00 horas en *Pachyrhizus ahipa* y *Pachyrhizus tuberosus*, Nuestros resultados concuerdan con aquellos encontrados para estos cultivos, ya que se encuentran en horas de la mañana.

### 6.2 Prefijadores

1. Colchicina. La concentración más adecuada para la prefijación es de 1% por 8 horas a 4 °C, en otros cultivos como la arracacha la mejor

concentración es de 0.01% por 6 horas a 4 °C (Blas, 1997), en algodón sugiere el uso de 0.05% por 2 horas de exposición a 20 °C (Basurto, 2004), asimismo Albornoz y Imery (2003), coinciden con la concentración utilizada en algodón para *Aloe vera* L. Estas concentraciones son bajas en comparación con la concentración adecuada para *Plukenetia volúbilis* L. en el presente trabajo de investigación. Sin embargo la colchicina tiende a duplicar el número de cromosomas en cultivos de anteras (Mendoza, 2005) y tejidos meristemáticos (Speranza, 2008), en el presente estudio para *Plukenetia volúbilis* L. y *Plukenetia huayllabambana* no se utilizó la colchicina, a fin de evitar errores en el conteo por duplicación y debido a la alta concentración (1%).

2. 8-hidroxiquinolina. Las mejores células metafásicas se obtuvieron con 0.0005M y 0.001M a 4 °C tratadas durante 6 y 8 horas respectivamente. Nuestros resultados son similares con lo reportado por Blas (1997), que sugiere una concentración de 0.0005M y 0.001M a 4 °C por 8 y 6 horas, para la arracacha. Gutiérrez *et al.* (2002), indica el uso de 0.0005M con 6 horas de exposición a 4°C en camu camu. Ramos *et al.* (2002), reportó una concentración de 0.001M por 3 horas en conchita (*Clitoria ternatea*). Portieles *et al.* (2002), evaluó un grupo de clones de caña de azúcar con 8 hidroxiquinolina a 0.0001M por 3 horas a temperatura ambiente. Sin embargo en otros cultivos como en oca, papalisa e isaño utiliza una concentración más alta de este reactivo a 0.002M a 4°C por 4:30 y 6:00 horas respectivamente, a fin de acumular células metafásicas (Gaspar, 1998), asimismo Mora *et al.* (2005), reportó la misma concentración en dos

especies de *Eucalyptus* por 4 horas a temperatura ambiente; estas concentraciones relativamente altas, no dieron buenos resultados para contar cromosomas en *Plukenetia volubilis* L. y *Plukenetia huayllabambana*.

3. Agua destilada helada. La prefijación con agua destilada helada por 8 horas a 4 °C dieron buenos resultados, encontrándose los cromosomas condensados y dispersados. A diferencia de lo estudiado por Blas (1997) en Arracacha, resultó mejor la prefijación en agua destilada por 24 horas a 4°C. Esta técnica reduce los costos para el conteo de cromosomas, por tanto es una tecnología para condiciones de países en desarrollo, en donde los recursos financieros son limitados. Además, el agua helada no es tóxica.

### 6.3 Fijador

El fijador Carnoy 3:1 (3 partes de etanol absoluto y 1 parte de ácido acético glacial), durante 24 horas a 4 °C resultó adecuado, y nos permitió una efectiva muerte celular, sin alteraciones estructurales de las células. Esto confirma su uso casi universal, ya que este mismo fijador se utiliza para algodón (Basurto, 2004), arracacha (Blas, 1997), *Aloe vera* L. (Albornoz y Imery, 2003; Matos y Molina, 1996), caña de azúcar (Portieles *et. al.*, 2002).

### 6.4 Hidrólisis

La hidrólisis con Ácido Clorhídrico (HCl) 1N, durante 8 a 12 minutos a 60 °C dio buen resultado, esto permitió destruir tanto la pared celular y la pectinaza de la uniones intercelulares observando células formando una sola capa, evitando así la superposición. Asimismo igual concentración de HCL 1N a 60°C utilizan para

otros cultivos, tales como: en sangre de grado 12 a 18 minutos (Ruiz, 2003), algodón 10 a 12 minutos (Basurto, 2004), caña de azúcar 15 minutos (Portieles *et. al.*, 2002), arracacha 10 a 12 minutos (Blas, 1997). Es decir solo varía el tiempo de exposición de acuerdo a cada cultivo o especie, coincidiendo con nuestros resultados.

## 6.5 Tinción

La tinción con aceto orceína al 2% por 24 horas a 4 °C. fue efectivo para la visualización y diferenciación de los cromosomas, facilitando de esta manera el conteo cromosómico. A tiempo de exposición menor (2 a 20 horas), el colorante no se impregna adecuadamente y a mayor tiempo de acción (más de 24 horas) los cromosomas tienden a deformarse, resultados que influyen en la resolución final de los cromosomas. También se reportan el uso de éste colorante para otros cultivos como: en algodón (Basurto, 2004), camu camu (Gutiérrez *et al.*, 2002) y arracacha (Blas, 1997) a la misma concentración y tiempo de exposición, evaluado en este estudio.

## 6.6 Número cromosómico

Estos niveles de ploidía sugieren la existencia de una serie de poliploides y una aneuploidía frecuente en *Plukenetia volubilis* L. y *Plukenetia huayllabambana* en el presente trabajo, coincidiendo parcialmente con otros cultivos que también presentaron anomalías cromosómicas del tipo numérica: en *Saccharum spontaneum* con  $2n= 40, 42, 44, 54, 56, 64, 72, 80, 96, 112$  y  $128$  cromosomas (Portieles *et. al.*, 2002), en *Oxalis tuberosa* M. (Oca) con  $2n= 32, 40$  y  $48$

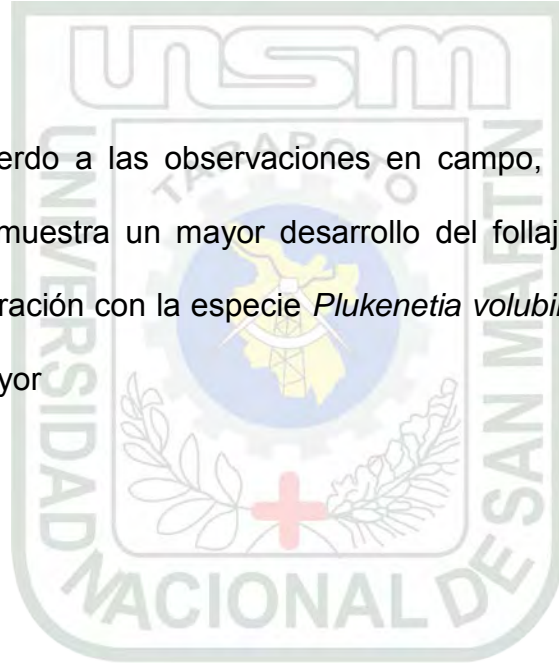
cromosomas y en *Tropaeolum tuberosum* (Isaño) con  $2n= 26, 39$  cromosomas (Gaspar, 1997) y en *Physalis peruviana* L. presenta  $2n= 24, 32$  y  $48$  cromosomas (Rodríguez y bueno, 2005). En baja frecuencia, Basurto (2004), quien reportó el número de  $52$  y  $38$  cromosomas en algodón, mientras que Blas (1997), indica que la arracacha tiene  $44$  cromosomas habiéndose encontrado células con  $88$  cromosomas.

La variación del número cromosómico puede ocurrir por la no disyunción que significa falla en la separación de cromosomas durante el proceso de división celular, sea esta mitótica o meiótica, lo que va a producir células hijas con números desbalanceados de cromosomas (Mendoza, 2005), fenómeno conocido como mosaicismo; sin embargo Blas (1997), supone que el mosaicismos en arracacha podrían ser debido a que la planta estuvo bajo estrés o por un proceso viral (BMS) que induciría duplicación de cromosomas tal como ocurre en *Hordeum vulgare*.

Comprender la complejidad genética en poblaciones, las cuales presentan diferentes niveles de ploidía es uno de los factores preocupantes en muchas investigaciones genéticas. Se han relacionado a las poblaciones en función de la distribución geográfica y los factores ambientales que actúan como inductores de variación. Es importante considerar que la influencia del medio ambiente modifica el genotipo e interfiere directamente sobre el crecimiento y desarrollo de las especies, produciendo diferentes ecotipos a partir de un mismo acervo genético que cambia al transcurrir del tiempo. Ello contribuye

marcadamente en los principales procesos de evolución de las especies. Por lo tanto los niveles de ploidía observados en las especies de *Plukenetia volubilis* L. y *Plukenetia huayllabambana* en el presente estudio, podría deberse a que las especies son alelopoliploides que se encuentran en proceso de domesticación y/o adaptación, cruzándose entre ellas para su supervivencia.

Asimismo, de acuerdo a las observaciones en campo, la especie *Plukenetia huayllabambana* muestra un mayor desarrollo del follaje así como semillas grandes en comparación con la especie *Plukenetia volubilis* L., lo cual indica un nivel de ploidía mayor



## VII. CONCLUSIONES

1. las 10 accesiones promisorias (*Plukenetia volubilis* L.) de la SUDIRGEB – INIA, el ecotipo silvestre “Apangurayacu” (*Plukenetia volubilis* L.) y el ecotipo “Lamas” (*Plukenetia huayllabambana*), pertenecen a un nivel de ploidía definido como **Heptaploide** con un número cromosómico  $2n= 7x= 56$ , siendo el número básico  $x=8$ .
2. La mejor hora de colección de raicillas para el conteo de cromosomas en *Plukenetia volubilis* L. se da a las **12 horas** bajo condiciones ambientales del Área de Extracción de ADN y Citogenética-Laboratorio de Biología Molecular y Citogenética – E.E.A. “El Porvenir”-San Martín..
3. La metodología para el conteo cromosómico de *Plukenetia volubilis* L. y *Plukenetia huayllabambana* es la siguiente: Pre-fijación con **colchicina** al **1% por 8 horas a 4 °C** o, en **8-Hidroxiquinolina 0.001M a 4 °C** tratadas durante **8 horas** o, en **agua helada por 8 horas** ;Fijación en **Carnoy** (3 etanol absoluto:1ácido acético glacial) **a 4° C por 24 horas**; hidrólisis en **HCl 1N a 60° C por 8 a 12 minutos** y tinción en **aceto orceína al 2% a 4°C por 24 horas** en condiciones del Área de Extracción de ADN y Citogenética de la E.E.A. “El Porvenir”.
4. Según el presente estudio las especies *Plukenetia volubilis* L. y *Plukenetia huayllabambana* presentaron **56 cromosomas**.



## VIII. RECOMENDACIONES

1. Desarrollar estudios citogenéticos mas detallados como el cariotipo en ambas especies (*Plukenetia volubilis* L. y *Plukenetia huayllabambana*).
2. Se recomienda en trabajos posteriores evaluar el enraizamiento en otros sustratos como bagazo descompuesto, musgo prensado.
3. Debido a las alteraciones cromosómicas encontradas en *Plukenetia volubilis* L. y *Plukenetia huayllabambana*, se sugiere la conservación de estas especies en campos aislados, con la finalidad de mantener sus constantes cromosómicas y poder identificar genotipos de alta performance a través del mejoramiento genético
4. Los resultados obtenidos a través del presente estudio constituyen como estudios básicos del *Plukenetia volubilis* L. y *Plukenetia huayllabambana*, recomendando utilizar en futuros trabajos de investigación en mejoramiento genético.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBORNOZ, A. IMERY, J. 2003. Evaluación Citogenética de Ocho Poblaciones de *Aloe vera* L. de la Península de Araya-Venezuela. CIEN v. 11 n.1 Maracaibo mar. Venezuela.
2. AREVALO, G. G., 1996. "El Cultivo del Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) en la Amazonia". Instituto Nacional de Investigación Agraria. Proyecto Suelos Tropicales. Editor Luís A. Carvajal Briceño. Lima, Perú. 68p.
3. AYALA, F. & KIGER, J 1984. "Genética Moderna". Edición Omega Barcelona – España. 11,15p.
4. BASURTO, L. 2004. "Identificación Morfológica y Molecular de Siete Genotipos de Algodón". Tesis para optar el Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de Agronomía. Lima – Perú. 21 p.
5. BLAS, R. 1997. Número de Cromosomas de la Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* B.). Tesis para optar el Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de Agronomía. Lima – Perú. 63p.
6. BUSSMANN, R. W., TELLEZ, C. and GLENN, A., 2009. *Plukenetia huayllabambana* sp. Nov. (Euphorbiaceae) From the upper Amazon of Perú. Subject Editor: Torbjorn Tyler. Accepted 17 February 2009.
7. CEBALLOS, H. DE LA CRUZ, G.A. 2001. Taxonomía y Morfología de la Yuca. Capítulo 2.Colombia. pp. 17.

8. CACHIQUE, D. Biología Floral y Reproductiva de *Plukenetia volubilis* L. (EUPHORBIACEAE). Tesis para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de San Martín. Facultad de Agronomía. Tarapoto-Perú. 52 p
9. DUBINNIN, N. 1976. Genética General. Editorial Mir. Moscu–URSS. pp. 23.
10. FERRER, H.E. ALCORCÉS, N.C. MÉNDEZ, J.R. 2007. Determinación del Ciclo Mitótico de Dos Cultivares de *Gossypium hirsutum* L. y Dos Ecotipos de *Gossypium barbadense* L. Acta Biol. Par., Curitiba, 36 (3-4): 121-149.2007. Caracas-Venezuela. pp. 121-149.
11. GARDNER, E. SIMMONS, M. SNUSTAD, P. 2000. Genética. Cuarta Edición. Editorial Limusa. México. pp. 24-26, 489, 132 – 133, 525.
12. GASPAR, S. 1998. “Caracterización Morfológica y Nivel de Ploidía en Cultivares de Oca (*Oxalis tuberosa* M.), Papalisa (*Ullucus tuberosus* C.) e Isaño (*Tropaeolum tuberosum* R. & P.)”. Tesis de grado para obtener el Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Mayor de San Simon. Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias, Forestales y Veterinarias. Cochabamba – Bolivia. 22 p.
13. GUTIÉRREZ, R. PARRA, R. TORD, Z. 2002. Determinación del Número Cromosomal de Camu Camu (*Myrciaria Dubia* H.B.K. MC. VAUGH.): Estudio Comparativo de Cuatro Poblaciones Naturales. Universidad Nacional Agraria La Molina, Centro de

Investigación en Recursos Genéticos y Biotecnología Vegetal (CIRGEBV), Departamento de Biología. Lima-Perú. pp 45-48.

14. LÓPEZ, M. 1995. "Fitomejoramiento". Primera Edición. Editorial Trillas, S.A. de C.V. México. pp. 34, 128 - 129.
15. LYNCH, M; RAPHAEL, S.; MELLOR, L.; SPARE, P.; INWOOD, M. 1987. Métodos de Laboratorio. Segunda Edición. México, D.F. pp. 1378, 1987 y 1374.
16. MANCO, C. E., 2008. Cultivo de Sacha Inchi. Subdirección de Recursos Genéticos y Biotecnología. Estación Experimental Agraria "El Porvenir". Tarapoto. Separata, Junio 2008.
17. MANCO, C. E., 2008. Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) Cultivo Promisorio Para la Amazonía Peruana. Subdirección de Recursos Genéticos y Biotecnología INIA – E.E.A. "El Porvenir". Manual. 50p.
18. MATOS, A. MOLINA, J. 1996. Estudio Citogenético en células radicales de *Aloe vera* L. Rev. Fac. Agron. (LUZ). La Universidad del Zulia. Facultad Experimental de Ciencias. Departamento de Biología. Laboratorio de Citogenética. Maracaibo-Venezuela. pp. 173-182.
19. MENDOZA, H. 2005. Genética Vegetal. La Molina – Perú. pp. 301 – 303, 308.
20. MONTROYA, J. 1980. Principios de la Mejora Genética de las Plantas. Barcelona- España. pp. 383-386,387

21. MORA, F. PALMA, C. JARA, P. 2005. Comparación del Cariotipo de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus cladocalyx* (Myrtaceae). Agricultura Técnica - VOL. 65 - N° 1. Chile.
22. PORTIELES, R. RODRÍGUEZ, R. HERNÁNDEZ, I. CANALES, E. Y CORNIDE, M.T., 2002. Determinación del Número Cromosómico de un Grupo de Clones Silvestres de Origen Desconocido y Clones de Fundación del Complejo *Saccharum*. Cultivos Tropicales. Cultivos Tropicales, vol. 23, no. 2. La Habana. pp. 69-72
23. RAMOS, Y. PINARES, A. GONZÁLEZ, C. XIQUEÉS, X y ROMÁN, M. 2002. Caracterización Bioquímica y Citogenética de Acciones de Conchita (*Clitoria ternatea*). Estación Experimental de Pastos y Forrages. Dpto. Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de la Habana. Cuba.
24. RODRÍGUEZ, N. C. BUENO, M. L. 2005. Estudio de la Diversidad CITOGÉNÉTICA DE *Physalis peruviana* L. (Solanaceae). Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias.
25. SPERANZA, P. 2008. Poliploidía e Hibridación Interespecífica. Curso de Fitotecnia. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. Uruguay. pp10.
26. STANSFIELD, W. 1992. Genética. Tercera edición. Colombia. 225 p.
27. STEEL, R. TORRIE, J. 1992. Bioestadística Principios y Procedimientos. Segunda Edición. México. pp. 17.

28. TALLEDO, D. ESCOBAR, C. 2004. Genética de las Células Somáticas de Raíces y Tuberosas Andinas. Contribuciones al Conocimiento y a la Capacitación. Universidad Ricardo Palma. Lima-Perú. pp. 77-94
29. VALLES, C.R., 1991. "Sacha inchi", Importante Oleaginosa Selvática, de Corto Periodo, Gran Adaptación a Suelos Ácidos, de Cuyos Granos es Posible Obtener Aceite de Fina Calidad. Separata, 2p.
30. VALLADOLID, A. BLAS, R. GONZÁLES, R. 2004. Introducción al Recuento de Cromosomas Somáticos en Raíces Andinas. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima – Perú. pp. 95- 99.
31. VELA, S. L., 1995. Ensayos Para la Extracción y Caracterización de Aceites de Sacha Inchi (*Plukenetia Volubilis* L.) en el Departamento de San Martín. Tesis para optar el Título de Ingeniero Agroindustrial. Universidad Nacional de San Martín. Tarapoto – Perú. 127p.

## RESUMEN

Se evaluaron 10 accesiones de *Plukenetia volubilis* L. "Sacha Inchi" procedentes de la Colección Nacional de la Subdirección de Investigación en Recursos Genéticos y Biotecnología - SUDIRGEB de la Estación Experimental "El Porvenir" – INIA y dos ecotipos silvestres Apangurayacu (*Plukenetia volubilis*) y Lamas (*Plukenetia huayllabambana*) procedente de la Provincia de Lamas, Región San Martín en el Perú; con el objetivo de determinar los niveles de ploidía, la hora de colección de ápices radiculares, estandarizar la metodología de contaje de cromosomas y determinar el número de cromosomas en *Plukenetia volubilis* L. y en la especie *Plukenetia huayllabambana*. Estableciéndose que la colecta más adecuada de los ápices radiculares es a las 12 horas con un IM de 13%. El número de cromosomas se realizó a través de la prefijación: en colchicina al 1% a 4°C por 8 horas, o en 8-hidroxiquinolina al 0.0005M y 0.001M a 4 °C por 6 y 8 horas respectivamente, o en agua destilada helada a 4 °C por 8 horas; seguidamente se fijó en solución Carnoy 3:1 por 24 horas a 4 °C; luego se realizó la hidrólisis en ácido clorhídrico 1N a 60 °C por 8 a 12 minutos y finalmente teñidos en aceto orceína al 2% por 24 horas a 4 °C. De acuerdo al análisis estadístico utilizando la Moda, se determinó que las especies *Plukenetia volubilis* L. y *Plukenetia huayllabambana* tienen 56 cromosomas, siendo Heptaploides con un número básico  $x=8$ , registrándose además otros números cromosómicos frecuentes de 42, 44, 48, 52, 54, 58, 62 y con menor frecuencia se encontraron células con: 64, 72, 76, 82, 86, 90, 96 y 101 cromosomas. Estas variaciones del número cromosómico podría deberse a que las especies son alelopoliploides que se encuentran en proceso de domesticación y/o adaptación, cruzándose entre ellas para su supervivencia.

## SUMMARY

We evaluated 10 accessions of *Plukenetia volubilis* L. "Sacha Inchi" from the National Collection of Research Branch, Genetic Resources and Biotechnology - SUDIRGEB Experimental Station "El Porvenir" - INIA and two wild ecotypes Apangurayacu (*Plukenetia volubilis* L.) and Lamas (*Plukenetia huayllabambana*) from the Province Lamas, San Martín Región in Perú; in order to determine the ploidy levels, time of collection of root tips, standardize the methodology for counting chromosomes and determine the number of chromosomes in *Plukenetia volubilis* L. and the kind *Plukenetia huayllabambana*. Established that the most appropriate collection of root tips is 12 hours with an MI of 13%. The number of chromosomes was performed using the prefixation: in 1% colchicine at 4 ° C for 8 hours, or 8-hydroxyquinoline at 0.0005M and 0.001M at 4 ° C for 6 and 8 hours respectively, or in distilled water chilled at 4 ° C for 8 hours, then was fixed in solution Carnoy 3:1 for 24 h at 4 ° C, then followed by hydrolysis in 1 N hydrochloric acid at 60 ° C for 8 to 12 minutes and finally stained in aceto orcein 2% for 24 hours at 4 ° C. According to statistical analysis using fashion, it was determined that the species *Plukenetia volubilis* L. and have 56 chromosomes *Plukenetia huayllabambana* being Heptaploides with a basic number  $x = 8$ , also registering other common chromosome numbers 42, 44, 48, 52, 54, 58, 62 and less frequently found in cells 64, 72, 76, 82, 86, 90, 96 and 101 chromosomes. These variations of chromosome number may be because alelopoliploides species are found in the domestication process and / or adaptation, crossing each other for their survival.





# **ANEXOS**

## **ANEXOS 1: Preparación de soluciones.**

### **8-hidroxiquinolina al 0.001M**

Para un litro de solución:

- Pesar 0.14516 g de 8-hidroxiquinolina.
- Disolver en 10 ml de etanol absoluto al 96%.
- En un vaso de precipitación llenar con agua destilada hasta 990 ml, el cual se mantiene agitando. Verter gota por gota la solución en etanol al vaso de precipitación, evitando la formación de grumos.
- Llenar la solución en un frasco oscuro cubierto con papel platina para evitar la entrada de luz.
- Mantener refrigerado.

### **Colchicina al 1%**

Para 100 ml de solución.

- Pesar 1 g de colchicina.
- Disolver en 100 ml de agua destilada.
- Colocar la solución en un frasco oscuro o cubrir con papel platina para evitar la entrada de luz.
- Mantener refrigerado

### **Carnoy (3:1)**

- Mezclar 3 partes de etanol al 100% + 1 parte de ácido acético glacial.

### **Ácido Clorhídrico 1N**

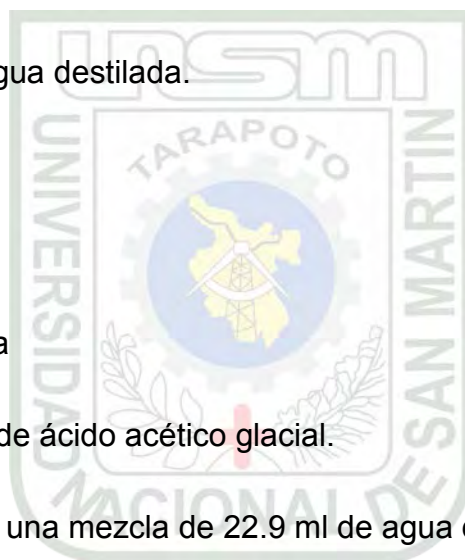
Para 1 litro de solución:

- Medir 87.49 ml de HCL al 35% (concentrado).
- Enrazar a 1 L con agua destilada.

### **Orceína acética 2%**

Para 50 ml de solución:

- Pesar 1 g de orceína
- Disolver en 22.9 ml de ácido acético glacial.
- Vertir los 22.9 ml en una mezcla de 22.9 ml de agua destilada y 4.15 ml de HCL 1N.
- Mantener agitado durante 5 a 10 minutos.
- Filtrar 1 ó 2 veces.



**ANEXO 2:** Evaluación de la hora mitótica en 03 accesiones de *Plukenetia volubilis* L. en condiciones de Laboratorio de la E.E.A. "El Porvenir", Juan Guerra 2008-2009.

HORA	FREC.	FASE	Foto 1	Foto 2	Foto 3	Foto 4	Foto 5	Foto 6	Foto 7	Foto 8	Foto 9	Foto 10	Foto 11	Foto 12	Foto 13	Foto 14	Foto 15	Foto 16	Foto 17	Foto 18	Foto 19	Foto 20	TOTAL	
7:00	04	INTERFASE	23	24	24	25	24	24	24	23	23	22	24	22	23	22	24	23	24	24	24	23	469	
		PROFASE	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	5
		METAFASE	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	2	1	0	0	0	0	1	9
		ANAFASE	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	12
		TELOFASE	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	5
	05	INTERFASE	23	23	23	23	23	22	23	24	24	24	22	22	20	22	24	23	21	20	22	22	22	450
		PROFASE	0	2	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	10
		METAFASE	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	0	2	2	0	2	1	12
		ANAFASE	1	0	0	1	1	2	1	0	0	0	2	2	2	1	1	0	2	2	1	1	1	20
		TELOFASE	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	0	0	8
	09	INTERFASE	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	23	25	25	25	25	25	25	498
		PROFASE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2
		METAFASE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		ANAFASE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		TELOFASE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8:00	04	INTERFASE	24	24	23	24	24	24	24	24	24	23	24	24	24	23	22	22	21	23	24	21	466	
		PROFASE	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2	2	0	0	3	10	
		METAFASE	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	7	
		ANAFASE	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	2	1	0	1	11	
		TELOFASE	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	6	
	05	INTERFASE	22	22	24	22	24	24	24	22	19	23	22	24	24	24	24	21	21	21	23	22	452	
		PROFASE	2	2	0	1	0	0	0	2	4	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	2	17	
		METAFASE	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	2	1	1	0	12	
		ANAFASE	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	3	1	0	9	
		TELOFASE	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	1	4	0	0	0	1	10	
	09	INTERFASE	24	23	24	23	23	23	24	22	22	20	21	24	24	24	24	24	23	22	23	22	459	
		PROFASE	0	0	1	0	0	1	0	1	1	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	9	
		METAFASE	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	9	
		ANAFASE	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	2	1	1	13	
		TELOFASE	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	0	0	0	1	0	1	1	2	10	

... Evaluación de la hora mitótica en 03 accesiones de *Plukenetia volubilis* L. en condiciones de Laboratorio de la E.E.A. "El Porvenir", Juan Guerra 2008-2009.

HORA	FREC.	FASE	Foto 1	Foto 2	Foto 3	Foto 4	Foto 5	Foto 6	Foto 7	Foto 8	Foto 9	Foto 10	Foto 11	Foto 12	Foto 13	Foto 14	Foto 15	Foto 16	Foto 17	Foto 18	Foto 19	Foto 20	TOTAL	
9:00	04	INTERFASE	24	24	23	24	23	24	21	22	23	23	23	23	22	20	22	23	24	19	20	23	450	
		PROFASE	0	0	0	0	0	0	2	1	0	1	1	0	1	3	0	0	0	2	1	0	12	
		METAFASE	1	1	2	1	2	1	2	2	1	1	1	2	2	0	0	1	0	1	2	2	2	25
		ANAFASE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	1	0	1	0	6	
		TELOFASE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	3	1	0	7	
	05	INTERFASE	24	23	22	24	24	21	23	19	22	21	24	24	22	22	22	22	24	24	24	23	23	455
		PROFASE	1	1	1	0	1	2	0	3	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	14
		METAFASE	0	0	2	0	0	0	1	2	1	2	0	1	1	1	0	1	1	0	0	2	15	
		ANAFASE	0	0	0	1	0	2	1	0	1	1	1	0	1	1	2	0	0	1	1	0	13	
		TELOFASE	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3	
	09	INTERFASE	24	23	24	22	23	22	22	24	21	20	19	22	24	22	24	22	22	22	22	24	22	448
		PROFASE	0	0	1	1	1	1	0	0	2	2	1	0	0	0	0	3	0	1	0	1	14	
		METAFASE	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	2	1	0	1	1	0	2	1	0	1	16	
		ANAFASE	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	7	
		TELOFASE	0	1	0	1	0	1	2	0	1	1	2	2	0	2	0	0	0	1	0	1	15	
10:00	04	INTERFASE	23	22	21	23	21	22	23	24	23	24	19	20	23	22	23	22	22	23	21	23	444	
		PROFASE	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0	6	
		METAFASE	2	0	1	1	0	0	0	1	0	1	2	0	2	1	2	3	2	2	1	1	22	
		ANAFASE	0	2	1	1	3	2	2	0	1	0	1	2	0	0	0	0	1	0	2	1	19	
		TELOFASE	0	1	2	0	1	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	1	0	9	
	05	INTERFASE	24	24	22	22	23	23	24	23	23	23	24	24	23	24	21	21	22	24	22	23	459	
		PROFASE	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	5	
		METAFASE	0	1	1	1	0	0	1	2	0	2	1	0	1	0	4	1	1	0	1	1	18	
		ANAFASE	1	0	2	2	2	2	0	0	1	0	0	1	1	1	0	2	2	0	1	0	18	
		TELOFASE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	09	INTERFASE	23	23	23	22	24	20	23	22	24	24	20	22	22	24	22	22	20	21	23	23	447	
		PROFASE	0	1	0	1	0	3	0	1	0	0	2	0	1	0	0	2	2	2	1	0	16	
		METAFASE	2	0	2	1	0	1	1	0	0	1	1	2	1	0	0	1	2	2	1	0	18	
		ANAFASE	0	1	0	1	1	1	1	2	0	0	2	1	1	1	3	0	0	0	0	1	16	
		TELOFASE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	3	

... Evaluación de la hora mitótica en 03 accesiones de *Plukenetia volubilis* L. en condiciones de Laboratorio de la E.E.A. "El Porvenir", Juan Guerra 2008-2009.

HORA	FREC.	FASE	Foto 1	Foto 2	Foto 3	Foto 4	Foto 5	Foto 6	Foto 7	Foto 8	Foto 9	Foto 10	Foto 11	Foto 12	Foto 13	Foto 14	Foto 15	Foto 16	Foto 17	Foto 18	Foto 19	Foto 20	TOTAL	
11:00	04	INTERFASE	24	24	24	24	23	23	23	22	24	23	23	24	23	24	22	23	22	24	19	23	461	
		PROFASE	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	2	0	1	0	3	1	12	
		METAFASE	0	0	0	1	2	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	10
		ANAFASE	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	2	0	1	1	1	1	2	0	12
		TELOFASE	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	05	INTERFASE	23	23	22	21	24	23	22	23	24	21	22	24	24	21	23	22	24	22	23	23	23	454
		PROFASE	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2	0	1	0	0	1	0	0	9
		METAFASE	1	0	2	1	0	1	1	1	1	0	2	0	1	1	1	1	2	0	2	1	1	19
		ANAFASE	0	1	0	0	1	1	0	1	0	3	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	11
		TELOFASE	0	0	1	2	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	7
	09	INTERFASE	23	23	24	20	24	24	21	23	23	24	20	20	21	21	23	24	23	20	23	23	23	447
		PROFASE	1	1	0	1	0	0	2	2	1	0	2	3	1	3	1	0	0	0	0	0	0	18
		METAFASE	1	1	0	2	0	1	0	0	1	1	0	2	2	0	1	1	1	1	1	1	1	17
		ANAFASE	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	2	1	1	1	10
		TELOFASE	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	8
12:00	04	INTERFASE	20	24	22	21	20	22	22	22	22	22	22	23	20	22	20	23	21	24	21	21	434	
		PROFASE	1	0	0	1	3	0	2	1	0	0	0	1	0	1	2	0	0	0	1	1	14	
		METAFASE	2	1	1	2	2	1	1	2	0	1	1	0	1	1	2	2	2	0	2	1	2	25
		ANAFASE	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	1	0	0	2	1	1	2	12	
		TELOFASE	0	0	2	1	0	2	0	0	2	2	2	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0	15
	05	INTERFASE	22	23	22	20	24	19	20	20	20	21	23	23	22	23	24	23	20	24	22	20	20	435
		PROFASE	1	1	1	3	0	3	2	3	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	3	24
		METAFASE	1	1	1	2	0	1	2	1	0	1	1	1	3	2	1	0	1	1	0	2	2	22
		ANAFASE	1	0	1	0	1	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0	0	11
		TELOFASE	0	0	0	0	0	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	8
	09	INTERFASE	23	22	23	21	21	23	20	20	22	19	22	23	24	22	21	23	22	23	20	21	21	435
		PROFASE	0	1	0	3	2	0	2	3	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	18
		METAFASE	2	0	1	1	2	1	3	1	1	3	2	0	1	1	2	1	1	1	2	0	0	26
		ANAFASE	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	2	2	2	13
		TELOFASE	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	8



... Evaluación de la hora mitótica en 03 accesiones de *Plukenetia volubilis* L. en condiciones de Laboratorio de la E.E.A. "El Porvenir", Juan Guerra 2008-2009.

HORA	FREC.	FASE	Foto 1	Foto 2	Foto 3	Foto 4	Foto 5	Foto 6	Foto 7	Foto 8	Foto 9	Foto 10	Foto 11	Foto 12	Foto 13	Foto 14	Foto 15	Foto 16	Foto 17	Foto 18	Foto 19	Foto 20	TOTAL	
15:00	04	INTERFASE	23	21	19	21	23	22	20	24	18	23	21	24	20	21	21	20	23	24	21	22	431	
		PROFASE	0	2	1	0	0	1	3	0	4	0	1	1	3	1	0	2	0	0	0	0	1	20
		METAFASE	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	2	0	0	0	0	2	0	1	1	1	2	12
		ANAFASE	1	1	2	0	1	2	1	1	2	1	1	0	1	2	1	0	1	0	1	0	0	19
		TELOFASE	0	1	3	4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	3	1	1	0	2	0	18
	05	INTERFASE	24	22	23	22	22	22	24	23	23	23	23	22	22	21	22	23	20	23	22	23	449	
		PROFASE	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	7
		METAFASE	0	2	1	2	1	2	0	0	0	1	2	1	1	2	2	1	2	2	0	1	0	23
		ANAFASE	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	2	0	1	0	14
		TELOFASE	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	2	1	0	0	0	0	1	0	1	0	7
	09	INTERFASE	20	22	18	23	22	23	21	23	23	22	20	19	20	23	20	22	21	23	23	23	431	
		PROFASE	0	0	3	0	2	0	1	0	0	0	0	3	3	1	2	0	1	0	0	0	0	16
		METAFASE	3	1	0	2	0	1	2	0	2	0	1	1	2	0	1	2	2	1	0	1	0	22
		ANAFASE	2	1	3	0	0	1	0	0	0	2	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	17
		TELOFASE	0	1	1	0	1	0	1	2	0	1	3	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	14
16:00	04	INTERFASE	22	23	22	19	22	21	22	21	22	20	23	22	22	22	21	23	22	24	23	21	437	
		PROFASE	0	0	1	3	1	1	0	2	1	4	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	18
		METAFASE	1	2	1	3	1	1	2	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	19
		ANAFASE	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	2	1	1	1	1	0	1	2	2	13
		TELOFASE	2	0	1	0	1	2	0	0	1	0	0	1	0	1	2	0	2	0	0	0	0	13
	05	INTERFASE	22	23	22	23	24	20	23	22	22	22	20	21	23	21	23	23	21	24	21	22	442	
		PROFASE	0	1	0	0	0	3	0	0	0	0	4	1	0	0	0	0	2	0	1	0	12	
		METAFASE	1	1	2	0	0	0	2	1	0	1	0	1	1	2	1	2	0	0	1	1	1	17
		ANAFASE	2	0	1	1	1	1	0	2	2	1	0	1	0	2	1	0	2	1	1	1	1	20
		TELOFASE	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	9
	09	INTERFASE	19	24	24	24	24	24	22	24	24	23	23	21	21	23	21	23	23	24	23	24	458	
		PROFASE	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	7	
		METAFASE	2	0	0	0	0	0	0	1	0	2	2	2	1	1	1	1	0	0	0	1	14	
		ANAFASE	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	2	0	2	0	0	1	1	0	14	
		TELOFASE	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	0	0	0	7	





**ANEXO 3:** Número de células encontradas en diferentes fases de la mitosis, en 03 accesiones de *Plukenetia volubilis* L. en condiciones de Laboratorio en la E.E.A. "El Porvenir", Juan Guerra 2008-2009.

HORAS	Interfase				Profase				Metafase				Anafase				Telofase				TOTAL
	Accesiones			Pro	Accesiones			Pro	Accesiones			Pro	Accesiones			Pro					
	04	05	09		04	05	09		04	05	09		04	05	09		04	05	09		
7.00	469	450	498	<b>472</b>	05	10	02	<b>06</b>	09	12	00	<b>07</b>	12	20	00	<b>11</b>	05	08	00	<b>04</b>	500
8.00	466	452	459	<b>459</b>	10	17	09	<b>12</b>	07	12	09	<b>09</b>	11	09	13	<b>11</b>	06	10	10	<b>09</b>	500
9.00	450	455	448	<b>451</b>	12	14	14	<b>13</b>	25	15	16	<b>19</b>	06	13	07	<b>09</b>	07	03	15	<b>08</b>	500
10.00	444	459	447	<b>450</b>	06	05	16	<b>09</b>	22	18	18	<b>19</b>	19	18	16	<b>18</b>	09	00	03	<b>04</b>	500
11.00	461	454	447	<b>454</b>	12	09	18	<b>13</b>	10	19	17	<b>15</b>	12	11	10	<b>11</b>	05	07	08	<b>07</b>	500
12.00	434	435	435	<b>435</b>	14	24	18	<b>19</b>	25	22	26	<b>24</b>	12	11	13	<b>12</b>	15	08	08	<b>10</b>	500
13.00	445	429	474	<b>449</b>	08	15	03	<b>09</b>	24	26	13	<b>21</b>	18	22	09	<b>16</b>	05	08	01	<b>05</b>	500
14.00	433	453	482	<b>456</b>	28	06	01	<b>12</b>	26	19	09	<b>18</b>	09	15	03	<b>09</b>	04	07	05	<b>05</b>	500
15.00	431	449	431	<b>437</b>	20	07	16	<b>14</b>	12	23	22	<b>19</b>	19	14	17	<b>17</b>	18	07	14	<b>13</b>	500
16.00	437	442	458	<b>446</b>	18	12	07	<b>12</b>	19	17	14	<b>17</b>	13	20	14	<b>16</b>	13	09	07	<b>10</b>	500
17.00	451	459	466	<b>459</b>	16	06	07	<b>10</b>	16	14	13	<b>14</b>	14	13	07	<b>11</b>	03	08	07	<b>06</b>	500
18.00	449	463	486	<b>466</b>	11	05	03	<b>06</b>	22	16	09	<b>16</b>	08	14	01	<b>08</b>	10	02	01	<b>04</b>	500

**ANEXO 4:** Determinación del índice mitótico en 03 accesiones de *Plukenetia volubilis* L. en condiciones de Laboratorio en la E.E.A. "El Porvenir", Juan Guerra 2008-2009.

HORAS	INTERFASE	PROFASE	METAFASE	ANAFASE	TELOFASE	TOTAL DE CELULAS EN DIVISION	TOTAL DE CELULAS	IM
7	472	06	07	11	04	28	500	5.6
8	459	12	09	11	09	41	500	8.2
9	451	13	19	09	08	49	500	9.8
10	450	09	19	18	04	50	500	10.0
11	454	13	15	11	07	46	500	9.2
12	435	19	24	12	10	65	500	13.0
13	449	09	21	16	05	51	500	10.2
14	456	12	18	09	05	44	500	8.8
15	437	14	19	17	13	63	500	12.6
16	446	12	17	16	10	55	500	11.0
17	459	10	14	11	06	41	500	8.2
18	466	06	16	08	04	34	500	6.8

**ANEXO 5:** Determinación del índice de fase en 03 accesiones de *Plukenetia volubilis* L. en condiciones de Laboratorio en la E.E.A. "El Porvenir", Juan Guerra 2008-2009.

HORAS	FASE	FRECUENCIA	TOTAL	IF
7	Profase	06	500	1.2
	Metafase	07	500	1.4
	Anafase	11	500	2.2
	Telofase	04	500	0.8
8	Profase	12	500	2.4
	Metafase	09	500	1.8
	Anafase	11	500	2.2
	Telofase	09	500	1.8
9	Profase	13	500	2.6
	Metafase	19	500	3.8
	Anafase	09	500	1.8
	Telofase	08	500	1.6
10	Profase	09	500	1.8
	Metafase	19	500	3.8
	Anafase	18	500	3.6
	Telofase	04	500	0.8
11	Profase	13	500	2.6
	Metafase	15	500	3.0
	Anafase	11	500	2.2
	Telofase	07	500	1.4
12	Profase	19	500	3.8
	Metafase	24	500	4.8
	Anafase	12	500	2.4
	Telofase	10	500	2.0
13	Profase	09	500	1.8
	Metafase	21	500	4.2
	Anafase	16	500	3.2
	Telofase	05	500	1.0
14	Profase	12	500	2.4
	Metafase	18	500	3.6
	Anafase	09	500	1.8
	Telofase	05	500	1.0
15	Profase	14	500	2.8
	Metafase	19	500	3.8
	Anafase	17	500	3.4
	Telofase	13	500	2.6
16	Profase	12	500	2.4
	Metafase	17	500	3.4
	Anafase	16	500	3.2
	Telofase	10	500	2.0
17	Profase	10	500	2.0
	Metafase	14	500	2.8
	Anafase	11	500	2.2
	Telofase	06	500	1.2
18	Profase	06	500	1.2
	Metafase	16	500	3.2
	Anafase	08	500	1.6
	Telofase	04	500	0.8

**ANEXO 6:** Evaluación de prefijador Colchicina en *Plukenetia volubilis* L., en condiciones de Laboratorio de la E.E.A. "El Porvenir", Juan Guerra 2008-2009.

Pref.	Conc. [ ]	Tiempo (horas)	N° de ápices	N° de células evaluadas	Células no aptas para el conteo	Células aptas para el conteo	Total de células contables
C o l c h i c i n a	0.01%	2	1	30	22	8	15
			2	30	27	3	
			3	30	26	4	
		4	1	30	30	0	12
			2	30	20	10	
			3	30	28	2	
		6	1	30	16	14	38
			2	30	16	14	
			3	30	20	10	
		8	1	30	19	11	38
			2	30	20	10	
			3	30	13	17	
	0.05%	2	1	30	20	10	14
			2	30	28	2	
			3	30	28	2	
		4	1	30	23	7	20
			2	30	30	0	
			3	30	17	13	
		6	1	30	13	17	26
			2	30	25	5	
			3	30	26	4	
		8	1	30	19	11	26
			2	30	20	10	
			3	30	25	5	
	0.5%	2	1	30	25	5	7
			2	30	29	1	
			3	30	29	1	
		4	1	30	23	7	13
			2	30	26	4	
			3	30	28	2	
		6	1	30	22	8	29
			2	30	16	14	
			3	30	23	7	
		8	1	30	21	9	34
			2	30	24	6	
			3	30	11	19	
1%	2	1	30	23	7	18	
		2	30	28	2		
		3	30	21	9		
	4	1	30	21	9	24	
		2	30	26	4		
		3	30	19	11		
	6	1	30	16	14	32	
		2	30	16	14		
		3	30	26	4		
	8	1	30	11	19	63	
		2	30	4	26		
		3	30	12	18		

**ANEXO 7:** Evaluación de prefijador 8 Hidroxiquinolina en *Plukenetia volubilis* L., en condiciones de Laboratorio de la E.E.A. "El Porvenir", Juan Guerra 2008-2009.

Pre.	Conc. [ ]	Tiempo (horas)	N° de ápices	N° de células evaluadas	Células no aptas para el conteo	Células aptas para el conteo	Total de células contables
8 H i d r o x i q u i n o l i n a	0.0005M	2	1	30	22	8	14
			2	30	27	3	
			3	30	27	3	
		4	1	30	22	8	21
			2	30	25	5	
			3	30	22	8	
		6	1	30	22	8	33
			2	30	21	9	
			3	30	14	16	
		8	1	30	14	16	30
			2	30	21	9	
			3	30	25	5	
	0.001M	2	1	30	22	8	19
			2	30	28	2	
			3	30	21	9	
		4	1	30	27	3	15
			2	30	23	7	
			3	30	25	5	
		6	1	30	24	6	19
			2	30	20	10	
			3	30	27	3	
		8	1	30	16	14	34
			2	30	21	9	
			3	30	19	11	
	0.002M	2	1	30	23	7	19
			2	30	24	6	
			3	30	24	6	
		4	1	30	23	7	15
			2	30	25	5	
			3	30	27	3	
		6	1	30	28	2	11
			2	30	24	6	
			3	30	27	3	
		8	1	30	27	3	25
			2	30	19	11	
			3	30	19	11	
0.003M	2	1	30	25	5	14	
		2	30	28	2		
		3	30	23	7		
	4	1	30	26	4	10	
		2	30	26	4		
		3	30	28	2		
	6	1	30	27	3	7	
		2	30	26	4		
		3	30	30	0		
	8	1	30	30	0	1	
		2	30	29	1		
		3	30	30	0		

**ANEXO 8:** Evaluación de prefijador Agua helada en *Plukenetia volubilis* L., en condiciones de Laboratorio de la E.E.A. "El Porvenir", Juan Guerra 2008-2009.

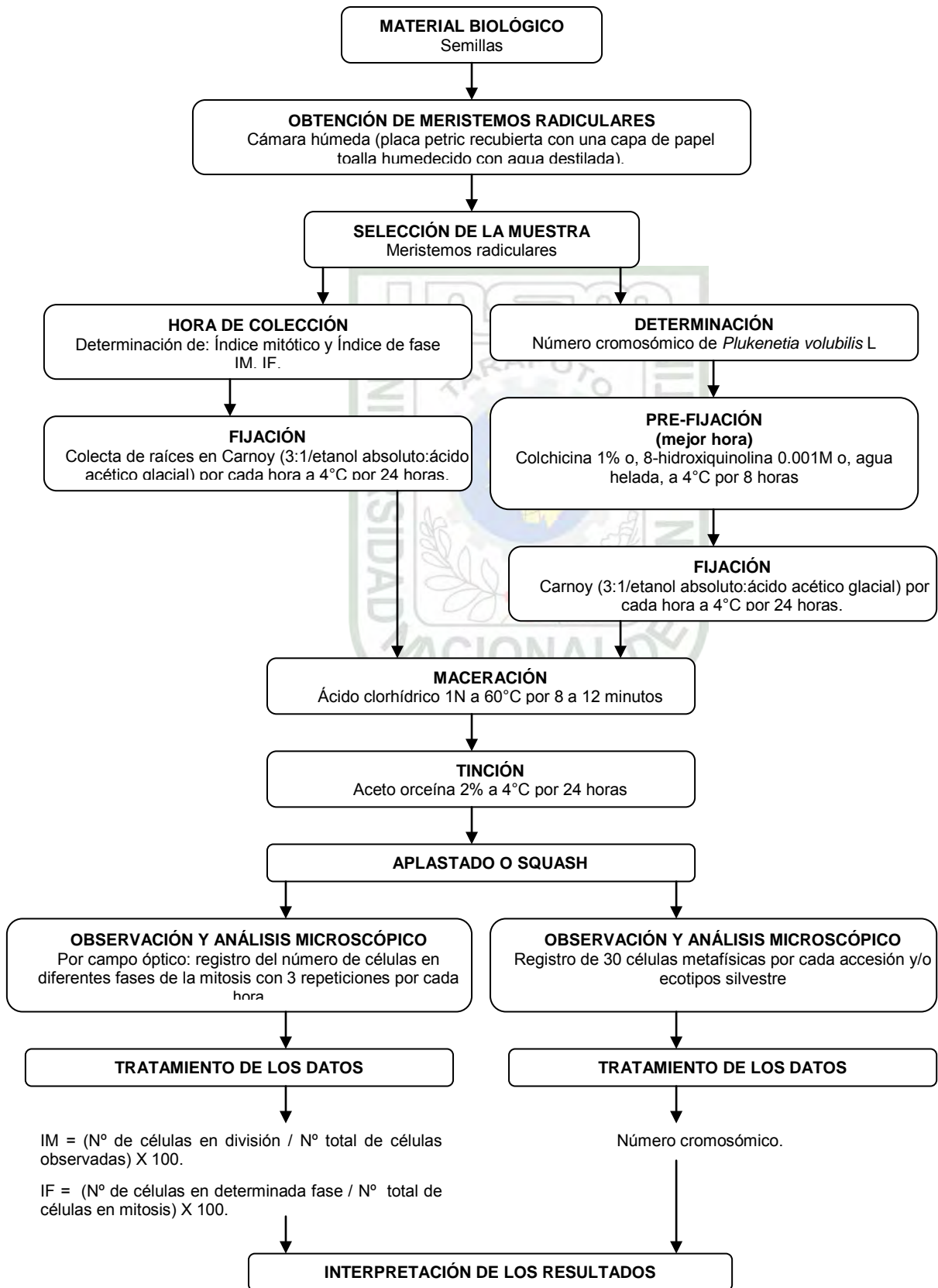
Pre.	Conc. [ ]	Tiempo (horas)	Nº de ápices	Nº de células evaluadas	Células no aptas para el contaje	Células aptas para el contaje	Total de células contables
A g u a  H e l a d a	100%	2	1	30	28	2	3
			2	30	30	0	
			3	30	29	1	
		4	1	30	21	9	19
			2	30	23	7	
			3	30	27	3	
		6	1	30	21	9	25
			2	30	20	10	
			3	30	24	6	
		8	1	30	15	15	32
			2	30	17	13	
			3	30	26	4	

**ANEXO 9:** Número de cromosomas observados en 10 accesiones promisorios de *Plukenetia volubilis* L.y 02 ecotipos silvestres (*Plukenetia volubilis* L.y *Plukenetia huayllabambana*).

C é l u . / C r o m o s o m a s	PER000394	PER000395	PER000396	PER000397	PER000405	PER000406	PER000409	PER000415	PER000416	PER000420	Apangurayacu	Lamas
1	56	62	56	54	48	56	52	48	48	48	54	56
2	56	48	52	56	52	58	58	52	44	52	48	58
3	52	56	58	58	56	56	56	52	52	42	60	51
4	52	48	48	58	48	52	52	54	42	48	50	58
5	101	58	52	56	48	52	48	48	44	56	51	56
6	52	56	58	52	52	54	56	48	42	48	48	58
7	56	56	52	52	48	52	42	42	42	52	53	54
8	54	52	58	52	56	56	86	42	44	56	46	63
9	48	48	56	56	56	52	52	52	44	48	44	58
10	52	52	58	56	56	58	48	52	44	48	46	48
11	48	56	48	52	62	48	48	48	52	42	48	48
12	52	58	56	56	52	52	52	52	52	56	62	48
13	54	52	52	52	52	44	56	54	54	42	56	56
14	52	52	56	52	52	56	56	101	48	52	56	53
15	64	90	56	72	52	52	56	58	52	54	54	63
16	52	52	48	56	56	56	52	52	52	42	58	48
17	62	52	52	56	62	58	58	54	48	44	54	58
18	82	62	52	56	52	58	52	52	52	48	58	46
19	52	58	48	56	58	44	56	54	54	54	52	72
20	56	56	58	52	62	52	56	52	54	52	43	74
21	48	56	48	56	62	96	52	54	48	56	56	76
22	52	56	86	54	56	52	56	54	48	86	58	62
23	54	58	54	56	60	52	56	58	48	48	56	60
24	48	56	58	56	58	58	56	54	54	52	58	52
25	54	58	48	56	58	58	56	54	52	48	58	56
26	82	58	59	56	58	56	54	54	52	49	47	52
27	54	56	62	52	101	48	52	54	52	49	56	61
28	56	48	59	56	48	58	52	54	54	44	46	52
29	52	90	58	54	56	56	54	54	48	48	41	96
30	48	58	58	56	48	54	90	58	54	48	44	60
Total	1701	1718	1664	1662	1685	1654	1670	1615	1474	1512	1561	1753
Moda	<b>52</b>	<b>56</b>	<b>58</b>	<b>56</b>	<b>52</b>	<b>52</b>	<b>56</b>	<b>54</b>	<b>52</b>	<b>48</b>	<b>56</b>	<b>58</b>



**ANEXO 10:** Protocolo de trabajo para el conteo de cromosomas en *Plukenetia volubilis* L.



## ANEXO 11: Datos de Pasaporte del Ecotipo Apangurayacu

Fecha de recolección: 23/10/07

Nombre científico: *Plukenetia volubilis* L.

Nombre Local: Sacha inchi Apangura Yacu

Nombre del colector: Gloria Arévalo Garzatúa

Nombre de donante: Alberto Amasifuen Salas

País de recolección: Perú

Departamento: San Martín

Provincia: Lamas

Distrito: Lamas

Lugar de colecta: Sector Apangurayacu – Fundo Apangura

Latitud de colecta: 92°87 54.8”

Longitud de colecta: 03°32 07.7”

Altitud de colecta: 496 m.s.n.m.

Tipo de muestra: Semillas

Fuente de recolección: Chacra de agricultor – en suelos degradados.

Misión de colecta: Colecta de ecotipo silvestre – Proyecto Mejoramiento Genético INCAGRO Sacha Inchi.

Observaciones: El lugar de colecta presentó las siguientes características aproximadas: pendiente de 50°, suelos degradados de color amarillento, el lugar se encuentra en la parte alta de la quebrada Apangura Yacu, como tutor vivo la especie yangua caspi, el sachu inchi se encontró asociado con algodón.

Además de los colectores participaron la Ing. Carolina Sánchez y la Bach. Gladis Atausupo de la universidad de Cusco.



## ANEXO 12: Datos de Pasaporte del Ecotipo Lamas.

Fecha de recolección: 14/06/08

Nombre científico: *Plukenetia huayllabambana*.

Nombre Local: Sacha Inchi

Nombre del colector: Gloria Arévalo Garazatúa  
Biólogo Valles

Nombre de donante: Rosario Gonzales de Tuesta

País de recolección: Perú

Departamento: San Martín

Provincia: Lamas

Distrito: Lamas

Lugar de colecta: Lamas

Latitud de colecta: 6° 25' 05.96"

Longitud de colecta: 76° 31' 33.40"

Altitud de colecta: 854 msnm

Tipo de muestra: Semillas

Fuente de recolección: Vivienda del donante ubicada en el Jr. San Martín # 2041-Lamas

Misión de colecta: Colecta de ecotipo silvestre – Proyecto Mejoramiento Genético INCAGRO Sacha Inchi.

Observaciones: La señora Rosario Gonzales de Tuesta tiene en la huerta de su vivienda ubicada en el Jr. San Martín # 2041-Lamas una planta de sachá inchi con características muy parecidas al ecotipo Rodríguez de Mendoza, la semilla fue proporcionada por el señor Linares de la artesanía El Indano hace 3 años desconociendo su origen. En la colecta se observó que esta planta solo presenta flores femeninas y la señora Rosario cosecha los frutos cada 3 meses y se colectaron muestras de hojas, flores femeninas, frutos y semillas.

Además del colector participaron el Ing. Manuel Ríos Navas, Tec. Eduardo y la Bach. Tania Baldeón Valles.

