

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Determinación del índice mitótico y número de cromosomas en cinco ecotipos de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”.

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIOLÓGO EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Presentado por la:

Bach. DE LA CRUZ CISNEROS, Jully Jesús

AYACUCHO - PERÚ

2016

A Dios, mi familia, mis padres Juan y Dora y mis hermanos, fueron los principales cimientos para la construcción de mi vida profesional, forjaron en mí las bases de responsabilidad y deseo de superación. A aquellos que siempre estuvieron conmigo en este proceso, mis maestros y amigos que seguirán acompañándome.

AGRADECIMIENTOS

A mi universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por haberme abierto las puertas de su seno científico.

A la Escuela de Formación Profesional de Biología y a la plana docente de la Especialidad de Biotecnología, por sus valiosas enseñanzas y experiencias durante mi permanencia en las aulas universitarias.

Al Instituto de Biotecnología, por la disposición de sus laboratorios, la cual me permitió realizar los ensayos del trabajo de investigación.

A mi asesor externo Ph.D. Raúl Blas Sevillano, Profesor principal de la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional Agraria La Molina, por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo durante la realización de la investigación.

A mi asesora Mg. Paula García Godos, que gracias a sus conocimientos y consejos supieron guiarme en la realización de la tesis.

Al Ingeniero Joel Flores, encargado del área de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología, por su ayuda incondicional y confianza.

A mis excelentes amigos del laboratorio del Instituto de Biotecnología, César Palomino y Erika Pacheco que me enseñaron y apoyaron constantemente.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	4
2.2. Características generales de <i>Plukenetia</i>	4
2.3. <i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi”	4
2.3.1. Origen	4
2.3.2. Distribución	5
2.3.3. Categorización taxonómica	6
2.3.4. Características botánicas	6
2.3.5. Características nutricionales	7
2.3.6. Ecología	8
2.4. Citogenética	8
2.5. Ciclo celular	9
2.6. Meiosis	13
2.7. Ploidía	13
2.8. Cromosomas	14
2.9. Estructura del ADN	15
2.10. Diversidad genética	15
2.11. Generalidades del conteo cromosómico	16
2.12. Índice mitótico	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1. Material vegetal	20
3.2. Lugar	21
3.3. Obtención de meristemas radiculares	21
3.4. Determinación del índice mitótico	21
3.5. Estandarización para el conteo de cromosomas	21

3.6. Análisis de datos	23
IV. RESULTADOS	24
4.1. Determinación de la hora de corte	24
4.2. Pre fijadores	25
4.3. Maceración	27
4.4. Determinación del número cromosómico de <i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi”	27
V. DISCUSIÓN	31
5.1. Obtención de meristemos radiculares	31
5.2. Determinación de la hora de corte	32
5.3. Pre fijadores	33
5.4. Fijador	34
5.5. Maceración	35
5.6. Tinción	36
5.7. Determinación del número cromosómico	36
VI. CONCLUSIONES	38
VII. RECOMENDACIONES	39
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
IX. ANEXOS	45

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla Nº 01: Composición de los ácidos grasos de aceites de <i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi”.	7
Tabla Nº 02: Meristemas radiculares de <i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi” obtenidas de la germinación <i>in vivo</i> de semillas de cinco ecotipos peruanos.	20
Tabla Nº 03: Pre fijadores, concentración y tiempo de exposición de los meristemas radiculares de <i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi”.	22
Tabla Nº 04: Determinación del índice de fases en cinco ecotipos peruanos de <i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi”.	24
Tabla Nº 05: Determinación del índice mitótico de cinco ecotipos peruanos de <i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi”.	25
Tabla Nº 06: Efecto de la colchicina sobre la calidad de células metafásicas para el conteo cromosómico de <i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi”.	25
Tabla Nº 07: Efecto de la 8-hidroxiquinolina sobre la calidad de células metafásicas para el conteo cromosómico de <i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi”.	26
Tabla Nº 08: Efecto del agua helada sobre la calidad de células metafásicas para el conteo cromosómico de <i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi”	26
Tabla Nº 09: Efecto del tiempo de exposición a HCl 1N sobre la calidad de raíces para el aplastado de <i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi”	27
Tabla Nº 10: Número de cromosomas de <i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi” procedentes del ecotipo Tarapoto.	27
Tabla Nº 11: Número de cromosomas de <i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi” procedentes del ecotipo Mazamari.	28
Tabla Nº 12: Número de cromosomas de <i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi” procedentes del ecotipo Moyobamba.	28

Tabla Nº 13: Número de cromosomas de <i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi” procedentes del ecotipo Juanjuí.	29
Tabla Nº 14: Número de cromosomas de <i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi” procedentes del ecotipo Pichari.	29

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1: Preparación de soluciones	46
Anexo 2: Evaluación de la hora mitótica de cinco ecotipos peruanos de <i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi”	45
Anexo 3: Total de células encontradas en diferentes fases de la mitosis de <i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi”.	47
Anexo 4: Determinación del índice mitótico de cinco ecotipos peruanos de <i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi”.	49
Anexo 5: División celular en <i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi”	50
Anexo 6: Obtención de raíces de las semillas de <i>Plukenetia volubilis</i> L. colocadas en sustrato, jiffy-7, agua de caño y musgo prensado (sushine)	52
Anexo 7: Protocolo de trabajo para el conteo de cromosomas en <i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi”.	54
Anexo 8: Datos de pasaporte de <i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi” de la colección del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina.	55
Anexo 9: Microfotografías de células de <i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi”.	56
Anexo10: Contaje cromosómico de célula metafásica de <i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi”.	57

RESUMEN

Plukenetia volubilis L. “sacha inchi”, es una especie tropical de gran importancia para el mercado debido a que presenta ácidos grasos esenciales insaturados tipo omega (3,6 y 9), con alto potencial para la agroindustria y por tanto es patrimonio nacional. A pesar de que la especie ha sido foco de investigaciones encaminadas a su propagación, existe un vacío en la información citogenética que contribuya su caracterización. Por esta razón, la investigación tuvo como objetivos; determinar el número de cromosomas, estandarizar el procedimiento para determinar el índice mitótico y conteo de cromosomas en *Plukenetia volubilis* L. Se evaluaron cinco ecotipos procedentes de los distritos de Tarapoto, Moyobamba, Juanjuí, Mazamari y Pichari.

El cálculo de la hora mitótica, se realizó con el fin de analizar su comportamiento mitótico durante 24 h, a partir de meristemas radiculares; encontrándose a las 11:00 h mayor cantidad de células metafásicas con un índice mitótico de 12 %.

La determinación del número de cromosomas se realizaron mediante la fijación con 8-hidroxiquinolina, la colchicina, el agua helada; teniendo mejores resultados la 8-hidroxiquinolina 0.002 M por 4 h a 4°C. Seguidamente se fijaron en solución Carnoy 3:1 por 24 h a 4°C; se hidrolizaron con ácido clorhídrico a 1 N y finalmente se tiñeron con orceína-acética al 2%, se determinó que el número de cromosomas encontrados es de $2n=44$, sin hallar diferencias con respecto a las distintas procedencias cultivadas.

Palabras clave: “sacha inchi”, *Plukenetia volubilis* L., número de cromosomas, índice mitótico.

I. INTRODUCCIÓN

En la zona tropical, la foresta tropical es una importante fuente de abastecimiento de madera, así como también de una gran cantidad de productos que el poblador de la región incorpora en su vida cotidiana y en su economía. Alimentos, medicinas, componentes para la construcción, fibras, tinturas, resinas, aceites, etc., son algunos rubros que cubren los productos del bosque.¹

Muchos de los productos forestales brindan al ser humano productos básicos para la alimentación, estos presentan excelentes condiciones para la nutrición humana y de importancia en los movimientos comerciales.²

Gran parte de las especies de foresta tropical continúa desconocida para la ciencia o subutilizada por la humanidad.

Plukenetia volubilis L. “sacha inchi”, es una planta cuyas semillas son utilizadas como aceites, tiene además un gran contenido de ácidos grasos esenciales (omegas 3, 6, y 9) y vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles), de gran importancia económica.

Es fundamental conocer e investigar las características que muestra cada especie, ya que es muy importante cuando se hace estudios sobre mejoramiento genético; se puede encontrar muchas barreras limitantes para la obtención de los objetivos. El nivel de ploidía, por ejemplo, es una de ellas; estudios anteriores demostraron

que al cruzar progenitores con diferentes niveles de ploidía, pueden dar como resultado progenitores estériles o genéticamente inestables.³

El número de cromosomas de una especie permanece constante, a través de las generaciones y es igual en principio en todas las células que lo conforman, salvo algunas excepciones. Esta característica es usada como criterio en el campo de la taxonomía, particularmente para los estudios de filogénesis.⁴

Para la determinación del número cromosómico, se necesita utilizar técnicas que faciliten la observación de las células metafásicas con los cromosomas bien definidos; para lo cual estas técnicas son estandarizadas para cada cultivo, ya que cada cultivo tiene sus propias exigencias.

No se encuentran referencias claras sobre la citogenética del “sacha inchi”, se realizaron estudios anteriores demostrando una variación en los cromosomas.

En la investigación, se tuvo como objetivos de estudio:

Objetivo General:

- Determinar el número de cromosomas de *Plukenetia volubilis* L “sacha inchi”, en cinco ecotipos peruanos.

Objetivos Específicos:

- Estandarizar el procedimiento para determinar el índice mitótico y contaje de cromosomas de *Plukenetia volubilis* L “sacha inchi”.
- Determinar el índice mitótico de *Plukenetia volubilis* L “sacha inchi”.

I. MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

Para el estudio genético de este cultivo y para posteriores trabajos en mejoramiento genético se estudia el número de cromosomas. Estudios anteriores de citología de *Plukenetia volubilis* “sacha inchi” Cai Z *et al.*,⁵ muestran el número de cromosomas diferentes, que van desde $2n=50$ cromosomas a $2n=86$ cromosomas. Encontrando variación en ápices de diferentes raíces y en las diferentes células de la misma punta de la raíz. Los cromosomas en “sacha inchi”, son extremadamente pequeños en tamaño, menos de $2\ \mu\text{m}$, por lo tanto indica que el análisis de la morfología del cromosoma fue deteriorado. La poliploidía, confirma la tendencia evolutiva significativa en el número de cromosomas dentro de esta especie; los resultados indican que la poliploidía puede considerarse como la razón de dicha variación en el número de cromosomas.

Borbor⁶ en “sacha inchi”, evalúa 10 accesiones de *Plukenetia volubilis* L. y dos ecotipos silvestres de *Plukenetia huayllabambana*, procedentes de la Colección Nacional de la Subdirección de Investigación en Recursos Genéticos y Biotecnología - SUDIRGEB de la Estación Experimental “El Porvenir” – INIA (San Martín), reporta que de acuerdo al análisis estadístico 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 podrían deberse a que las especies son alelopoliploides que se encuentran en proceso de domesticación y adaptación, cruzándose entre ellas para su supervivencia.

Gutiérrez *et al.*,⁷ en “camu camu”, menciona que utilizando como fijador Carnoy por 24 h a 4°C y tiñendo con aceto-orceína por 24 h a más; la hora mitótica adecuada fue a las 11 h, con un índice mitótico de aproximadamente de 39%, reportando para dos poblaciones naturales estudiadas de “camu camu”, el número de cromosomas fue $2n=22$ cromosomas, se encuentra una constancia de 100% de la población del Río Tahuayo- Cocha “El Chino” de la Región de Loreto. En las poblaciones del Río Manitini, Paparocha (región de Loreto) y del Río Ucayali, se determinó una célula de $2n=20$ cromosomas por cada dos células de $2n=22$ cromosomas.

2.2. Características generales de *Plukenetia*

El género *Plukenetia* pertenece a la familia Euphorbiaceae la cual comprende plantas anuales, de importancia ornamental, medicinal, alimenticia e industrial, que se caracterizan principalmente por la presencia de una sustancia lechosa, tipo látex y frutos capsulares. El género está compuesto por 17 especies; tiene una distribución pantropical, 10 especies se encuentran en Sudamérica y Centroamérica y las otras 7 solo en el Viejo Mundo. Las especies de *Plukenetia* son plantas trepadoras o lianas o raramente hierbas perennes y rastreras.⁸

2.3. *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”

Conocido también como “maní del inca”, “maní peruano”, “maní silvestre” o “maní del monte”, el “sacha inchi” es una Euphorbiaceae, cuyo género *Plukenetia* comprende 17 especies de distribución pantropical, 12 en América, 3 en África, 1 en Madagascar y 1 en Asia.¹ Está distribuida en el trópico latinoamericano y en nuestro país se ha recolectado en Madre de Dios, Huánuco, San Martín, Ucayali, Iquitos, y áreas del estrecho amazónico. Crece desde los 100 msnm hasta 1500 msnm.⁹

El “sacha inchi” es una planta rústica, crece en suelos ácidos y con alta concentración de aluminio. El territorio selvático peruano favorece el crecimiento de esta planta por lo que está llamada a ser una alternativa importante en los suelos ácidos en los que se cultivó coca. La semilla de “sacha inchi”, rica en proteínas y aceite, son de color marrón oscuro, ovals de 1.5 a 2.0 cm de diámetro, ligeramente abultadas en el centro y aplastadas en los bordes. Tiene forma lenticular, su tamaño es muy variable y característico de la variedad, clima, suelo, cultivo entre otros.¹⁰

2.3.1. Origen

Plukenetia volubilis L. “sacha inchi”, posiblemente fue cultivada por los incas desde hace más de 500 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.¹⁰

2.3.2. Distribución

El área de distribución de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” se extiende desde las Antillas menores, Surinam y el sector noroeste de la cuenca amazónica en Venezuela y Colombia hasta Ecuador, Perú, Bolivia y Brasil.¹¹

En Perú se ha reportado en los departamentos de Amazonas, Cuzco, Huánuco, Junín, Loreto, Madre de Dios, San Martín y Ucayali.

2.3.3. Categorización taxonómica

La categorización taxonómica realizada por Linneo, es la siguiente.¹²

- Reino : Plantae

- División : Magnoliophyta
- Clase : Magnoliopsida
- Orden : Malpighiales
- Familia : Euphorbiaceae
- Género : *Plukenetia*
- Especie : *Plukenetia volubilis* L.

2.3.4. Características botánicas

Tallo: Planta trepadora, voluble, semi leñosa, de altura indeterminada.¹⁰

Hojas: Son alternas, de color verde oscuro, oval-elípticas, aserruladas y pinnatinervias, de 09 – 16 cm de largo y 06 – 10 cm ancho. El ápice es puntiagudo y la base es plana o semi-arriñonada.⁹

Flores: Esta especie es hermafrodita con flores masculinas y pistiladas; las primeras son pequeñas, blanquecinas y dispuestas en racimos, las otras se encuentran en la base del racimo y ubicadas lateralmente de una a dos flores, lo cual indica que podría tratarse de una planta autógama, pues se observa muchas semejanzas entre plantas de una misma accesión, así como de una accesión a otra, las diferencias entre caracteres fenotípicas son pocas, pero notorias.¹⁰

Fruto: Es una cápsula, de 3,5 a 4,5 cm de diámetro, con 4 lóbulos aristados (tetralobados) dentro de los cuales se encuentran 4 semillas. Excepcionalmente, algunos ecotipos presentan cápsulas con 5 a 7 lóbulos.⁹

Semilla: Es ovalada, de color marrón oscuro, ligeramente abultadas en el centro y aplastadas hacia el borde. Según los ecotipos, el diámetro fluctúa entre 1,3 y 2,1 cm.⁹

2.3.5. Características nutricionales

Dentro de sus componentes se encuentran principalmente: proteínas, aminoácidos, ácidos grasos esenciales (omegas 3, 6, y 9) y vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles) en contenidos significativamente elevados, respecto de semillas de

otras oleaginosas (maní, palma, soya, maíz, colza y girasol). Investigaciones recientes realizadas con aceites omegas y vitamina E indican la importancia nutricional y terapéutica de su consumo para el control de radicales libres y una serie de enfermedades que estos originan en el organismo humano.¹³

Se tienen reportes de análisis realizados en la Universidad de Cornell (USA) que indican que la almendra de las semillas contiene 48,6 % de aceite y 29,0 % de proteína; además se señala que el aceite de “sacha inchi” contiene un alto contenido de ácidos grasos insaturados (oleico, linoleico y linolénico) por lo que se le considera como un aceite de bajo contenido de colesterol.¹⁴

Tabla N°01: Composición de los ácidos grasos del aceite de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”.

Ácido graso	% Aceite “sacha inchi”
Mirístico C14:0	1.2
Palmítico C16:0	5.6
Esteárico C18:0	2.2
Oleico C18:1	9.6
Linoleico C18:2	36.9
Linolénico C18:3	43.7
Total Saturados	9.1
Total Monoinsaturados	9.6
Total Polinsaturados	80.7

Fuente: Pascual y Mejía (2000).¹³

2.3.6. Ecología

Temperatura: El “sacha inchi” crece y tiene buen comportamiento a diversas temperaturas que caracterizan a la Amazonía Peruana (mínimo 10°C y máximo 36°C). Las temperaturas muy altas son desfavorables y ocasionan la caída de flores y frutos pequeños, principalmente los recién formados.¹⁰

Altitud: Crece desde los 100 msnm hasta 1500 msnm en la Selva Alta.⁹

Luz: A bajas intensidades de luz, la planta necesita de mayor número de días para completar su ciclo vegetativo; cuando la sombra es muy intensa la floración disminuye y por lo tanto la producción es menor.⁹

Agua: Es una planta que requiere de disponibilidad permanente de agua, para tener un crecimiento sostenido; siendo mejor si las lluvias se distribuyen en forma uniforme durante los 12 meses (850 a 1000 mm). El riego es indispensable en los meses secos. Períodos relativamente prolongados de sequía o de baja de temperatura, causan un crecimiento lento y dificultoso. El exceso de agua ocasiona daño a las plantas e incrementa los daños por enfermedades.¹⁰

Suelo: Este cultivo tiene amplia adaptación a diferentes tipos de suelo; crece en suelos ácidos y con alta concentración de aluminio.¹⁵ Se deben elegir por tanto los suelos que posibiliten su mejor desarrollo y productividad.¹⁰

Drenaje: “sacha inchi” necesita terrenos con drenaje adecuado, que eliminen el exceso de agua tanto a nivel superficial como profundo. Para un buen drenaje se debe considerar la textura del suelo, y ésta es importante para el desarrollo del cultivo.⁹

2.4. Citogenética

Es la ciencia que estudia el cromosoma (el material hereditario organizado) bajo cualquier nivel o dimensión.¹⁶ Relaciona hechos descritos por la genética con los fenómenos que ocurren dentro de la célula u órganos especializados. Lo que ha permitido la estructura y función de cada uno de los componentes de la célula, y de estructuras más especializadas, en relación con funciones como la reproducción sexual.¹⁷

2.5. Ciclo celular

El ciclo de división celular es el mecanismo a través del cual todos los seres vivos se propagan.¹⁸ Es una sucesión de etapas por las que transcurre la vida de una célula. Una célula nace a partir de la división de una predecesora, pasa por una serie de etapas donde crece, duplica su tamaño y, por último, se divide para dar dos células hijas que comenzarán de nuevo el ciclo.¹⁹

En los organismos unicelulares la división celular implica una verdadera reproducción, ya que por este proceso se producen dos células hijas que maduran y se convierten en dos individuos distintos. En los organismos multicelulares se requieren muchas más secuencias de divisiones celulares para originar un nuevo individuo; la división celular también es necesaria en el cuerpo para reemplazar las células perdidas por deterioro, mal funcionamiento o por muerte celular programada.^{20, 21}

El ciclo celular va encaminado a duplicar la información genética de una célula y una vez duplicada, repartirla en dos, generando dos células hijas con igual contenido citogenético.¹⁶

El ciclo celular puede dividirse en dos fases principales: la fase M incluye: 1) el proceso de la mitosis, durante el cual los cromosomas duplicados se separan en dos núcleos, y 2) la citocinesis, toda la célula se divide en dos células hijas.²²

El ciclo celular pasa por una serie de etapas denominadas: G₁, S, G₂ y M (las letras G significa intervalo o “gap”, la S síntesis y la M mitosis). Las fases G₁, S y G₂ se suelen agrupar en la denominada interfase.²³

2.5.1. Interfase

- **Fase G₁**

La fase G₁ es el período del ciclo celular que abarca desde que termina la fase M hasta que comienza la fase S. Durante la fase G₁ la célula comprueba las condiciones externas e internas y decide si continuar con el ciclo celular. Durante la fase G₁ la célula incrementa el material enzimático, sus organelos se replican, así como otras moléculas y estructuras citoplasmáticas también aumentan en número; en consecuencia, la célula aumenta su tamaño. Algunas estructuras son sintetizadas por la célula; entre estas se encuentran microtúbulos, microfilamentos de actina y ribosomas, los cuales están compuestos por subunidades proteicas. Las estructuras membranosas como el aparato de Golgi, los lisosomas, las vacuolas y las vesículas se derivan del retículo endoplasmático, el cual se renueva y aumenta en tamaño por la síntesis de proteínas y lípidos. También hay replicación de

mitocondrias y cloroplastos previamente existentes. Las células pueden detener su progresión en el ciclo y entrar en un estado de reposo especial; llamado G_0 (G cero), donde pueden permanecer durante días, semanas o años antes de volver a proliferar y en ocasiones nunca más dividirse.¹⁶

- **Fase S: síntesis**

Es el período en que las células sintetizan las histonas adicionales cuando la célula duplique el número de nucleosomas en sus cromosomas.²²

La fase S comienza cuando se ha pasado el punto de restricción de la fase G_1 . Se producen dos sucesos importantes: replicación del ADN y duplicación de los centrosomas en las células animales.²³

- **Fase G_2**

En la fase G_2 se acumulan progresivamente aquellas moléculas cuyas actividades serán necesarias durante la fase M. Tradicionalmente se ha considerado como un estado de tránsito entre las fases S y M. Durante esta etapa, sin embargo, se comprueba si ha habido errores durante la replicación del ADN y si se ha producido su duplicación completa. Si estos defectos son detectados la célula no entrará en fase M y el ciclo celular se detendrá hasta que los daños sean reparados o el ADN sea completamente copiado.²³

2.5.2. Fase M: Mitosis (división nuclear somática)

Es el período en que las dos copias del ADN se segregan y la célula se divide en dos células genéticamente iguales.²⁴

Es el proceso de división nuclear en el que las moléculas replicadas de ADN de cada cromosoma se reparten con exactitud en dos núcleos. La mitosis suele acompañarse de la citocinesis, un proceso en el cual una célula en división se separa en dos, con lo que el citoplasma se divide en dos paquetes celulares, por lo tanto, la mitosis mantiene el número de cromosomas y genera nuevas células para el crecimiento y mantenimiento de un organismo. La mitosis puede ocurrir en células haploides o diploides. Las células mitóticas haploides se encuentran en hongos, gametofitos de las plantas y en unos cuantos animales. La mitosis es una etapa del ciclo celular en la que la célula dedica toda su energía a una sola

actividad: la separación cromosómica. En este período la célula detiene las actividades metabólicas entre ellas, la transcripción y la traducción, la célula entra en una falta relativa de respuesta a los estímulos externos.²²

Este proceso ocurre en las células meristemáticas (raíces, hojas, flores) y meristemas axilares, estas estructuras tienen la capacidad de dividirse a lo largo de todo el ciclo de vida del organismo. Es un proceso continuo, en el cual se suceden en una secuencia cuidadosamente ordenada los complejos preparativos para la división, por la cual se hace un reparto equitativo del material genético ya duplicado entre las dos células resultantes, manteniendo así la ploidía original de la célula.²⁴

El más importante carácter de la mitosis es que el número cromosómico permanece constante a través de sucesivas divisiones celulares, con una exacta distribución de cromosomas en las nuevas células formadas, genéticamente idénticas entre sí, manteniéndose la ploidía original de la célula. Convencionalmente la mitosis se divide en cuatro etapas: profase, metafase, anafase y telofase.¹⁷

- **Profase**

Comienza con la condensación del DNA, de manera que llegan a ser visibles las cromátidas de forma aislada, y con la desaparición del nucléolo.²³ En esta etapa se aprecia la aparición nítida de los cromosomas en el núcleo, ya están suficientemente condensados y son visibles bajo el microscopio óptico. Se ve, que cada cromosoma consiste en dos copias longitudinales, llamadas las cromátidas hermanas, se observan claramente unidas por los centrómeros, el nucléolo pierde visibilidad, la membrana nuclear desaparece, el huso acromático va tomando cuerpo y muchas fibras cortas lo forman, las fibras polares, que llegan desde cada polo del huso a la región central hasta la mitad y las fibras cinetocóricas que se insertan en los cromosomas duplicados. Al final de la profase, los cromosomas están completamente condensados y con la desaparición de la envoltura nuclear, quedan en contacto con el citoplasma.¹⁷

- **Formación del cromosoma mitótico.** - El núcleo de una célula en interfase contiene longitudes enormes de fibras de cromatina. El estado extendido de la cromatina en interfase es ideal para la separación en dos células hijas. Antes de

separar sus cromosomas, una célula las convierte en estructuras mucho más cortas y gruesas por un proceso notable de compactación de cromosomas (o condensación cromosómica), que ocurre en las etapas iniciales de la profase.²²

- **Metafase**

Los microtúbulos del cinetocoro alinean los cromosomas en un plano ecuatorial de la célula. Cada cromosoma se mantiene en tensión en la placa metafásica por los cinetocoros apareados y sus microtúbulos asociados, los cuales están unidos a los polos opuestos del huso (centriolos).²¹

- **Anafase**

En esta etapa se duplican y separan los centrómeros y las cromátidas hermanas se liberan, se repelen y son engarzadas por las fibras del huso que hacen tracción sobre ellas, dirigiéndose a los polos, convirtiéndose cada cromátida en un nuevo cromosoma. A medida que continúa el anafase, los dos conjuntos idénticos de cromosomas se mueven hacia los polos opuestos del huso.¹⁷

- **Telofase**

Los cromosomas hijos separados llegan a los polos y los microtúbulos del cinetocoro desaparecen. Los microtúbulos polares se alargan aún más y se vuelve a formar la envoltura nuclear. La cromátida condensada se expande y los nucléolos desaparecen; la mitosis ha llegado a su fin.²⁵

Citocinesis. La citocinesis comienza durante la anafase y finaliza con la formación de las dos células hijas. En las células vegetales la citocinesis es diferente a causa de la presencia de la pared celular. Las células hijas se separan, no por la formación de un anillo contráctil sino por la formación de una nueva pared celular en el interior de la célula que se va a dividir. Esta pared nace rodeada de membrana y es perpendicular y central al huso mitótico. Su posición determina la localización de las dos células hijas y por tanto también la dirección de crecimiento de la planta.²⁰

2.6. Meiosis

La meiosis es un tipo especial de división nuclear que segrega una copia de cada cromosoma homólogo en un nuevo gameto. Durante la formación de los gametos, el número de cromosomas se reduce a la mitad y retornan al número completo cuando los dos gametos se unen durante la fecundación, restableciendo la ploidía original. La mayor parte de las células de la planta se dividen por mitosis, denominándose células de la línea somática (o células vegetativas). A las células que se convierten en gametos se las considera células pertenecientes a la línea germinal.²⁵

2.7. Ploidía

La ploidía es el número de juegos de cromosomas (n) presentes en la célula vegetativa (somática). El número de cromosomas y el nivel de ploidía son datos útiles en el estudio de una especie y en la caracterización del germoplasma. Nos permiten 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.⁴

Se puede definir la poliploidía como un tipo de variación numérica que afecta al conjunto de los cromosomas de las células aumentando o disminuyendo la cantidad de ellos. Por lo tanto, la poliploidía inducida, como por ejemplo los triploides o tetraploides, se refiere a la producción de individuos con una composición extra de cromosomas, tres o cuatro, respectivamente.²⁶

2.7.1 Factores que promueven la ploidía

Los 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 sub genomas, 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. Así también 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.²⁷

2.8. Cromosomas

Los cromosomas son cuerpos largos y filiformes que, durante la división celular, se contraen haciéndose más gruesas y cortos, en los que se puede distinguir un centrómero y uno de dos brazos cromosómicos.¹⁹

2.8.1. Composición química y estructura de los cromosomas

Consiste principalmente de ADN 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 “cuentas” elipsoidales denominadas nucleosomas. Las histonas son básicas por que contienen de 20 a 30% de arginina 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. 28

2.9. Estructura del ADN

La unidad básica del ADN es el nucleótido, que consiste en un azúcar de cinco carbonos conocidos como desoxirribosa, al cual se fija un fosfato esterificado en la posición 5' del anillo de azúcar y una base nitrogenada en el sitio 1'. Existen dos tipos de bases nitrogenadas presentes en el ácido nucleico, las pirimidinas, que

contienen un solo anillo, y las purinas, las cuales poseen dos anillos, El ADN contiene dos diferentes pirimidinas, la timina (T) y la citosina (C), además de dos distintas purinas, guanina (G) y adenina (A). Los nucleótidos están unidos de forma covalente el uno con el otro y formaban un polímero lineal o cadena, con un esqueleto compuesto de azúcares que se alternaban y grupos fosfatos unidos por enlaces de tipo 3'-5'- fosfodiéster.²⁹

2.10. Diversidad genética

La diversidad puede ser estudiada y entendida a nivel genético; es un continuo genético producto de la evolución.³⁰

La variación genética es la materia prima de la evolución, pero lo es también del proceso de domesticación y mejoramiento de especies útiles para la supervivencia humana.³⁰ En general lo que se hace es clasificar la especie en categorías interespecíficas como razas o ecotipos; la diversidad relativa de una especie en una región se da en términos del número de categorías intraespecíficas. Se usarán las categorías intra específicas de raza, ecotipos, morfotipos y variedad para clasificar la diversidad de las especies cultivadas alógamas, silvestres, agámicas y autógamias respectivamente.³¹

2.10.1. Raza

Es un agregado de poblaciones de especies en común, con caracteres morfológicos y usos específicos. Sin embargo, sus características distintivas no son lo suficientemente diferentes como para constituir una subespecie diferente.³¹

2.10.2. Ecotipo

Un ecotipo es un grupo de plantas de genotipo similar que ocupan un nicho ecológico específico.³²

El ecotipo es el producto de la adaptación de una especie a un ambiente particular. Ecotipo no es sinónimo de raza. Una raza puede habitar varios ambientes y su área de adaptación puede ser muy amplia. Hay razas de alturas que se pueden adaptar muy bien a zonas bajas y viceversa. Lo que define las razas es principalmente su morfología y fisiología, que a veces limita su adaptación. Tanto las razas como los

ecotipos son fértiles. Los ecotipos son ocasionalmente aislados por barreras geográficas y en ese caso se les denomina geo-ecotipos. El término ecotipo debe ser usado solo para especies silvestres.³¹

2.10.3. Variedad

El término variedad para describir la diversidad de las especies cultivadas autógamas será usado, aún conociendo que desde 1961, cuando se publicó el código de nomenclatura de plantas cultivadas, se adoptó el término “cultivar” en reemplazo de “variedad”, debido a que este es, según el código, muy impreciso. El nombre de variedad se reserva en el código para ciertas categorías intraespecíficas de poblaciones naturales silvestres. Sin embargo, la división de toda la diversidad de una especie en cultivares no tiene sentido; lo más probable es que todos los cultivares de una especie cultivada provengan de un sector muy limitado de la diversidad.³¹

2.10.4. Morfotipo

Un morfotipo esta defino como por una serie de características, principalmente morfológicas. Un morfotipo está formado por plantas que son similares morfológicamente; muestran el mismo fenotipo, pero no necesariamente son de la misma constitución genética.³¹

2.11. Contaje cromosómico

2.11.1. Recuento de cromosomas mitóticos

Para una correcta determinación del número de cromosomas es necesario contar con técnicas citológicas que den buenos resultados, con un número aceptable de metafases contables, con cromosomas bien separados y coloreados, por lo que las muestras deberán ser colectadas en estado de metafase. Para la acumulación de cromosomas metafásicos varios pre-tratamientos químicos son usados.³³

2.11.2. Germinación o enraizamiento

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 placas petri

bajo condiciones asépticas, o mediante el enraizamiento de esquejes, brotes u órganos de reserva, en un sustrato apropiado (musgo, perlita, grava, agua corriente).³⁴

2.11.3. Pre fijación

Se realiza a las puntas de raíz con sustancias denominadas inhibidores de mitosis (colchicina, 8-hidroxiquinolina, 1-bromonaftaleno, bajas temperaturas positivas, etc.) para acumular mayor número de células metafásicas en el meristemo.³³

El pretratamiento o pre fijación permite la concentración de cromosomas durante la metafase, facilitando así el conteo cromosómico.³⁵

2.11.4. Fijación

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.²⁷

Una de las mezclas más utilizadas en citología es la de Clarck, 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 fijativos, 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.²⁷

2.11.5. Hidrólisis

El objetivo de la hidrólisis es romper las peptinas que unen las células y facilitar el aplastamiento.

Generalmente se usa HCl 1N a una temperatura de 60°C. Una buena práctica es calentar el ácido a 60°C antes de colocar las raíces que se van a hidrolizar.³⁵

2.11.6. Tinción

Para teñir los cromosomas se utilizan tintes básicos debido a la naturaleza ácida de la cromatina. Los tintes ácidos colorean 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.³³

2.11.7. Aplastado o squash

Una vez que las puntas de raíz han sido teñidas, se las ubica sobre un portaobjeto. Luego de colocar el cubre objeto 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 cubre objeto para que los cromosomas se dispersen y al hacerse visibles se encuentren en un mismo plano.³³

2.11.8. Observación

La muestra preparada 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 10X x 40X con el fin de seleccionar las mejores células y finalmente con el objetivo de inmersión 10X x 100X para realizar el recuento.³⁴

2.12. Índice mitótico

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. Se tiñe las muestras y se procede a observarlas bajo el microscopio óptico. Luego de sistematizar esta información en forma de cuadros, se puede tener una idea de cuál es la mejor hora de colección, es decir aquella donde se encuentre un mayor número de células metafásicas. 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.³⁴

Es la proporción celular en cualquier fase de la mitosis dentro de la población celular analizada.³⁶ 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.³⁷

Estudiar el índice mitótico de una especie es de gran importancia para estudios como: variabilidad con respecto al número, tamaño y forma de los cromosomas de las especies de este grupo; evidenciar cromosomas mitóticos, especialmente metafásicos; alteración de las características de las muestras originales del germoplasma introducido para su reproducción *in vitro* y la insuficiencia de los métodos utilizados en la evaluación de su estabilidad genética.³⁴ También se emplean otras técnicas para determinar el ciclo celular:

Índice de fase: es la proporción de células en profase, metafase, anafase o telofase dentro de la población analizada.

Índice mitótico parcial: es el cálculo que deriva de la media de los valores obtenidos en las observaciones realizadas en diversos intervalos de tiempo. Todas las células de un organismo poseen cromosomas, los cromosomas se pueden observar si la célula entra en división mitótica. Por consiguiente, es importante que el tejido empleado presente tasas de división celular permanentes. Para el desarrollo de estudios citogenéticos en vegetales, los tejidos meristemáticos caulinar, radicular (axial y apical), son los que se emplean con frecuencia.³⁶

II. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Se utilizaron meristemas radiculares, obtenidos de la germinación de semillas de la colección del Instituto de Biotecnología - Universidad Nacional Agraria La Molina.

Tabla N°02: Meristemas radiculares de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”, obtenidos de la germinación *in vivo* de semillas de cinco ecotipos - Universidad Nacional Agraria La Molina.

Departamento	Provincia	Distrito	Código
San Martín	San Martín	Tarapoto	TA
San Martín	Mariscal Cáceres	Juanjuí	JUA
San Martín	Moyobamba	Moyobamba	MO
Junín	Satipo	Mazamari	MA
Cuzco	La Convención	Pichari	PICH

El registro del material estudiado cinco ecotipos peruanos de “sacha inchi”, se encuentra en los laboratorios del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria la Molina.

3.2. Lugar

Se realizó la investigación en los laboratorios del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina–Distrito La Molina, Provincia y Región de Lima.

3.3. Obtención de meristemos radiculares

Se colocaron las semillas en agua potable por 14 – 16 días, en sustrato de musgo prensado (jiffy-7) y en sustrato sushine canadiense mix 3 por unos 10 días, hasta que las raíces presentaron una longitud de 3 cm aproximadamente. Se realizó el cambio de agua cada 2 días para evitar pudriciones en las raíces, y para mantener una humedad adecuada.

3.4. Determinación del índice mitótico

Se recolectaron 6 raíces en la solución de fijación (Carnoy: 3 partes de etanol absoluto y 1 parte de ácido acético glacial), por cada hora (8:00 h hasta 18:00 h), las cuales fueron fijadas por 24 h a 4°C. Para la maceración se utilizó ácido clorhídrico a 1 N a temperatura de 60°C por 6 a 14 min; se tiñeron las raíces con aceto orceína al 2% por 24 h a temperatura de ambiente y se observaron al microscopio células por campo con 5 repeticiones por cada hora.³⁴

3.5. Estandarización de la técnica para el conteo de cromosomas

3.5.1. Pre fijación

Se evaluaron cuatro pre fijadores a diferentes concentraciones, temperaturas y tiempos.

Tabla N°03: Pre fijadores, concentración y tiempo de exposición de los meristemos radiculares de *Plukenetia volubilis* L “sacha inchi”.

Prefijación	Concentración	Temperatura (°C)	Tiempo (h)
Agua potable helada	100%	4	8,18,20,24 y 48
Agua destilada helada	100%	4	8,18,20,24 y 48
8-hidroxiquinolina	0.002 M	4	4,6 y 8
Colchicina	0.1, 0.2%	4	4,6 y 8

3.5.2.Fijador

Los ápices radiculares se fijaron en solución Carnoy (3 partes de etanol absoluto y 1 parte de ácido acético glacial) por 24 h a 4°C.

3.5.3.Maceración

Las raíces se colocaron en ácido clorhídrico 1 N en un horno a 60° C en diferentes tiempos (6, 8, 10, 12 y 14 minutos), facilitando así la hidrólisis celular.

3.5.4.Tinción

Se tiñeron los meristemos radiculares en aceto orceína al 2% por 24 horas a temperatura de ambiente (laboratorio).

3.5.5.Aplastado

Se realizaron cortes de aproximadamente 2 - 3 mm del ápice de las raíces teñidas. Se aplastaron añadiendo una gota de ácido acético al 45% para aclarar el citoplasma; y colocando un cubre objetos, se disgrega el ápice de la raíz con golpes suaves con la punta del lápiz. Se colocó el portaobjeto entre papel de filtro y se presionó fuerte con el dedo pulgar para que los cromosomas se dispersen, tratando

de evitar cualquier movimiento del portaobjeto; se realizó este procedimiento con la finalidad de encontrar células en un solo plano.

3.5.6 Observación

Se observaron las muestras preparadas en el microscopio óptico, inicialmente con aumentos bajos de (10X x 10X, 10X x 20X), para ubicar células que presentan cromosomas dispersos, luego se llevaron a mayor aumento 10X x 40X para seleccionar las células y por último se contaron los cromosomas utilizando el mayor objetivo de 10X x 100X para lo cual se utilizó aceite de inmersión.

3.6. Análisis de datos

3.6.1. Índice mitótico

Se realizaron las colectas de meristemas radiculares a cada hora del día. El índice mitótico está constituido por la sumatoria de células en división (profase, metafase, anafase y telofase) respecto al total de células expresadas en porcentajes. Para la determinación del índice mitótico se utilizó la siguiente fórmula:³⁴

$$IF(\%) = \frac{N^{\circ} \text{ de células de cada fase} \times 100\%}{N^{\circ} \text{ total de células}}$$

$$IM (\%) = IFp + IFm + IFa + IFt$$

Dónde: IF= Índice de Fases, IM= Índice Mitótico, p= profase, m= metafase, a=anafase, t= telofase.³⁴

3.6.2. Determinación del número de cromosomas

Por la naturaleza del estudio solo se consideró la medida de tendencia central moda, es decir el número de cromosomas más general hallado para cada entrada.

III. RESULTADOS

4.1. Determinación de la hora de corte

Tabla N°04: Determinación del índice de fases en cinco ecotipos peruanos de *Plukenetia volubilis* L. "sacha inchi" - Universidad Nacional Agraria La Molina.

Tiempo (h)	Profase IF(%)	Metafase IF(%)	Anafase IF(%)	Telofase IF(%)	Total
8:00	3.8	1.8	1.2	0	500
9:00	3.8	2.4	1.6	0.2	500
10:00	4	3.4	1.8	0.4	500
11:00	4.4	4.6	2.4	0.2	500
12:00	4	3.6	2.6	0.2	500
13:00	4.2	2.8	2.2	0.8	500
14:00	4.4	2.4	2.4	0.4	500
15:00	4.4	2.6	2	0.4	500
16:00	4	2	2.2	1	500
17:00	4	1.8	1.8	0.8	500
18:00	3.8	1.6	1.8	1	500

Tabla N°05: Determinación del índice mitótico de cinco ecotipos peruanos de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” - Universidad Nacional Agraria la Molina.

Tiempo Interfase (h)	Profase	Metafase	Anafase	Telofase	Total de células en división	Total de células	IM	
8:00	466	19	9	6	0	34	500	7
9:00	460	19	12	8	1	40	500	8
10:00	453	20	17	9	2	48	500	10
11:00	442	22	23	12	1	58	500	12
12:00	448	20	18	13	1	52	500	11
13:00	450	21	14	11	4	50	500	10
14:00	452	22	12	12	2	48	500	10
15:00	453	22	13	10	2	47	500	9
16:00	454	20	10	11	5	46	500	9
17:00	458	20	9	9	4	42	500	8
18:00	459	19	8	9	5	41	500	8

4.2.Pre fijadores

Tabla N°06: Efecto de la colchicina sobre la calidad de células metafásicas para el conteo cromosómico de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”.

Tiempo (h)	Colchicina (%)	
	0.1	0.2
2	Cromosomas no adecuado: para el conteo	Cromosomas no adecuados para el conteo
4	Cromosomas adecuados para el conteo	Cromosomas adecuados para el conteo
6	Cromosomas adecuados para el conteo	Cromosomas adecuados para el conteo

Tabla N°07: Efecto de la 8-hidroxiquinolina sobre la calidad de las células metafásicas para el conteo cromosómico de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”.

Tiempo (h)	8-Hidroxiquinolina 0.002 M
2	Cromosomas no adecuados para el conteo
4	Cromosomas adecuados para el conteo
6	Cromosomas adecuados para el conteo

Tabla N°08: Efecto del agua helada sobre la calidad de células metafásicas para el conteo cromosómico de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”.

Tiempo (h)	Agua potable helada	Agua destilada helada
18	Cromosomas no adecuados para el conteo	Cromosomas no adecuados para el conteo
20	Cromosomas no adecuados para el conteo	Cromosomas no adecuados para el conteo
24	Cromosomas no adecuados para el conteo	Cromosomas adecuados para el conteo
48	Cromosomas no adecuados para el conteo	Cromosomas no adecuados para el conteo

4.3. Maceración

Tabla N°09: Efecto del tiempo de exposición a HCl 1N sobre la calidad de raíces para el aplastado de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”.

Tiempo (min)	HCl 1N
6	Raíces duras
8	Raíces duras
10	Raíces blandas
12	Raíces blandas, adecuados para el squash
14	Raíces destrozadas

4.4. Determinación del número cromosómico de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”

Tabla N°10: Número de cromosomas de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” procedentes del ecotipo Tarapoto

Código	Número de células contadas	Número cromosómico
TA1	20	44
TA2	20	44
TA3	22	44
TA4	20	44
TA5	20	44
TA6	21	44
TA7	20	44
TA8	20	44
TA9	20	44
TA10	22	44
TA11	20	44
TA12	20	44
TA13	20	44
TA14	23	44
TA15	20	44

Tabla N°11: Número de cromosomas de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” procedentes del ecotipo Mazamari.

Código	Número de células contadas	Número cromosómico
MA1	22	44
MA2	20	44
MA3	20	44
MA4	21	44
MA5	20	44
MA6	23	44
MA7	21	44
MA8	20	44
MA9	20	44
MA10	22	44
MA11	20	44
MA12	20	44
MA13	20	44
MA14	22	44
MA15	20	44

Tabla N°12: Número de cromosomas de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”, procedentes del ecotipo Moyobamba.

Código	Número de células contadas	Número cromosómico
MO1	21	44
MO2	20	44
MO3	22	44
MO4	20	44
MO5	20	44
MO6	20	44
MO7	20	44
MO8	22	44
MO9	20	44
MO10	22	44
MO11	20	44
MO12	20	44
MO13	23	44
MO14	20	44
MO15	20	44

Tabla N°13: Número de cromosomas de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” procedentes del ecotipo Juanjuí.

Código	Número de células contadas	Número cromosómico
JUA1	20	44
JUA2	21	44
JUA3	20	44
JUA4	20	44
JUA5	20	44
JUA6	22	44
JUA7	21	44
JUA8	20	44
JUA9	20	44
JUA10	20	44
JUA11	22	44
JUA12	20	44
JUA13	20	44
JUA14	21	44
JUA15	20	44

Tabla N°14: Número de cromosomas de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” procedentes del ecotipo Pichari.

Código	Número de células contadas	Número cromosómico
PICH1	20	44
PICH2	20	44
PICH3	23	44
PICH4	20	44
PICH5	20	44
PICH6	20	44
PICH7	22	44
PICH8	20	44
PICH9	20	44
PICH10	22	44
PICH11	20	44
PICH12	20	44
PICH13	21	44
PICH14	20	44
PICH15	22	44

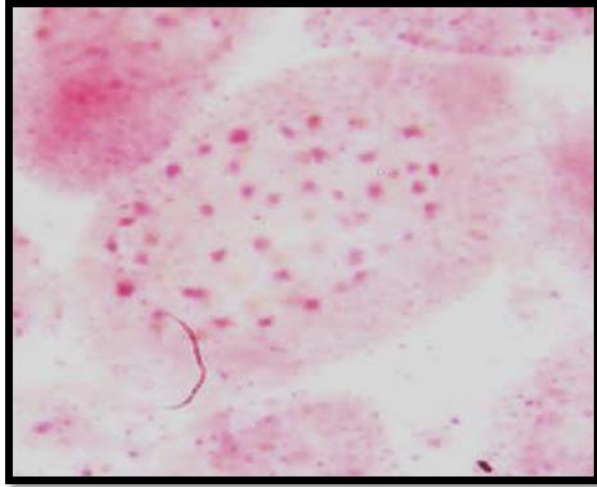


Figura 1. Célula meristemática de *Plukenetia volubilis* L. "sacha inchi"

IV. DISCUSIÓN

5.1 Obtención de meristemas radiculares

Se utilizaron tejidos meristemáticos que se encuentran en constante mitosis; los cuales caracterizan poseer núcleos grandes y por permanecer indiferenciados.³⁴

En la investigación se utilizaron ápices radiculares para cumplir con dichas condiciones.

Las raíces de "sacha inchi", son delicadas y pequeñas; por lo que, al remover las raíces del suelo, los ápices que contienen los tejidos meristemáticos se pierden, las raíces en la que los ápices no se pierden, tienen pocas células por lo que la probabilidad de obtener cromosomas dispersos es mínima. Debido a esto se emplearon técnicas para favorecer la producción de raíces adecuadas para la obtención de cromosomas dispersos.

Se usaron diferentes sustratos (jiffy, sushine y agua potable), el tiempo óptimo de obtención de meristemas radiculares en el sustrato jiffy y sushine es de 14 - 16 días y en agua el enraizamiento se prolonga en aproximadamente 18 - 20 días.

Se observó mayor enraizamiento en los sustratos jiffy y sushine, sin embargo, se presentaba dificultad al momento de realizar el aplastado, debido a la presencia de

partículas del sustrato adheridas a las raíces. El enraizamiento en agua potable se obtuvo raíces más limpias y blandas, pero el tiempo en enraizamiento fue mayor.

Se usó raíces obtenidas de sustrato jiffy y sushine canadiense debido a que el enraizamiento es en menor tiempo. Según la investigación de Borbor⁶, observó en “sacha inchi” mayor enraizamiento en arena lavada de río, sin embargo, presentaba dificultad precisar el momento óptimo de realizar el corte de los ápices radiculares. El enraizamiento en agua de caño fue menor, se observaron las raíces aptas para el corte, además nos permitió seguir disponiendo del material vegetal en estudio.

Blas²⁷ reporta en “arracacha”, que obtiene mejores raíces utilizando jiffy - 7, con los cuales obtuvo raíces menos duras, aparentemente se encontraban mayor concentración de cromosomas metafásicas en aproximadamente 15 a 20 días. En agua potable el enraizamiento tarda de 21 a 30 días y obtuvo raíces más duras.

5.2 Determinación de la hora de corte

En base a la evaluación para un período de 11 h del índice de fase (IF) e índice mitótico (IM), se determinó la colecta más adecuada de raíces de *Plukenetia volubilis* L. - Universidad Nacional Agraria La Molina (ver tablas 4 y 5).

La mejor hora de colección para determinar el índice mitótico (IM) en los ápices radiculares de *Plukenetia volubilis* L., es aquella que debe realizarse durante las 11 h del día con un IM = 12%, a esta hora se presenta una mayor frecuencia de células metafásicas, lo que permite realizar un buen conteo de cromosomas, ya que se encuentran cromosomas bien condensados, dispersados y con buena tinción.

Borbor⁶ reporta que la hora óptima de corte en “sacha inchi” es a las 12 h del día con un IM = 13%.

Gutiérrez *et al.*,⁷ reportan *Myrciaria dubia* “camu camu” que la hora mitótica adecuada fue a las 11 h, con un índice mitótico de aproximadamente de 39%, para dos de las poblaciones naturales estudiadas.

Swanson *et al.*,³⁸ mencionan que el momento del día en el cual las células se multiplican con mayor rapidez varía de una especie a otra, pero por lo general, la hora mitótica se encuentra en las horas de la mañana hasta aproximadamente las 11:00 am, lo que concuerda con lo obtenido en la investigación.

5.3 Pre fijadores

Se probaron cuatro tipos de pre fijadores, los cuales fueron: la colchicina, la 8-hidroxiquinolina, el agua potable helada y el agua destilada helada, se observó una eficiencia en la obtención de células metafásicas.

Con el pre fijador colchicina: se obtuvo una mejor observación de células metafásicas en 0.1% y 0.2% de concentración por 4 y 6 h a 4°C. La exposición a la colchicina a las 2 h, se observa cromosomas inadecuados para el conteo. Resultados semejantes fueron encontrados por Blas²⁸ en “arracacha”, al observar las puntas de raíces expuestas con colchicina a diferentes concentraciones, se observaron la mejor concentración es de 0.1% por 4 - 6 h a 4°C, en concentraciones menores y en menor tiempo (2 h) no se observaron cromosomas; pero a mayor tiempo y en concentraciones similares se observaron cromosomas adecuados para el conteo.

En la investigación en *Plukenetia volubilis* L. no se utilizó la colchicina, a fin de evitar errores, debido a que tratamiento de raíces en mayor tiempo en colchicina, se observaron células con cromosomas más pequeños dando la apariencia de estar encogidos (ver tabla N°06).

Para el caso de 8-hidroxiquinolina a 0.002 M: las células tratadas durante 4 - 6 h respectivamente, mostraron cromosomas dispersos adecuados para el conteo. Se obtuvieron células metafásicas en frecuencia de 15 - 20 por punta de raíz.

En investigaciones similares en “sacha inchi”, las mejores células metafásicas se obtuvieron con 0.0005M y 0.001M a 4°C tratadas durante 6 y 8 h respectivamente.⁶ Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos en “sacha inchi”, “camu camu” y “arracacha”; que utiliza una concentración del reactivo a 0.002M a 4°C por 4 y 6 h respectivamente, a fin de acumular células metafásicas.^{5,6,7,27} (ver tabla N°07)

En investigaciones en *Rubus glaucus* y *Myrciaria dubia*, mencionan que obtuvieron mejores resultados con la 8-hidroxiquinolina, utilizados en la fase de pretratamiento durante 4 - 6 h a temperatura de ambiente, los cuales fueron adecuados para el conteo.^{39,7}

Para el agua helada: el pre fijador de agua destilada helada, obtuvo buenos resultados en durante 24 h de prefijación a 4°C. Por el contrario, con el agua potable de la Universidad Nacional Agraria La Molina, no se obtuvo buenos resultados en la prefijación a 4°C, esto se debe a que el agua potable de la universidad es salina, lo que genera la plasmólisis de la célula. (ver tabla N°08)

Estos resultados concuerdan con Blas y Gutiérrez^{27,7} quienes indican que, utilizando agua destilada helada por 24 h, se observan cromosomas dispersos.

Se obtuvieron buenos resultados en las concentraciones (0.1% y 0.2%), en la colchicina y a (0,002 M) de 8-hidroxiquinolina; de 4 y 6 h de prefijación, a diferencia de 2 h de prefijación, en la cual se presentaron pocas células metafásicas con cromosomas dispersos.

El empleo de agua destilada helada durante 24 h de prefijación a 4°C, dieron buenos resultados a medida que disminuye las horas de prefijación disminuye también las células metafásicas aptas para el conteo.

5.4 Fijador

En esta etapa se interrumpen rápidamente los procesos vitales de la muestra conservando invariable la estructura fina de las células, además se incrementa la naturaleza basófila de la cromatina haciéndola susceptible de ser coloreada.³⁴

Se utilizó un fijador de acción rápida, ácida y deshidratante, que conserve el nucléolo, los cromosomas y el huso acromático, uno de los fijadores más comúnmente utilizados por cumplir con estas características es la solución de Carnoy.⁴⁰

Se requiere un mínimo de 3 h a temperatura ambiente para fijar el material. Sin embargo, es conveniente dar de 24 a 48 h en este proceso para facilitar la dispersión de los cromosomas en el citoplasma. Si este tiempo es excedido y no se

conserva a bajas temperaturas o se transfiere a alcohol, se corre el riesgo de que el material se deteriore.⁴¹

El fijador se prepara cada vez que se usa, debido a que este reacciona rápidamente a temperatura ambiente, formando un éster y, por lo tanto, no tiene un mismo efecto fijador.³⁵

El fijador Carnoy 3:1, durante 24 h a 4°C resultó adecuado, y permitió una efectiva muerte celular, sin alteraciones estructurales de las células, lo cual confirma su uso casi universal, ya que este mismo fijador se utiliza para “camu camu”, “sacha inchi”, “arracacha”^{5, 6, 7,27}.

5.5 Maceración

Esta etapa se realiza con el fin de romper las peptinas que unen las células y facilitan el aplastamiento.⁴⁰

A tiempo de exposición menor el tejido sigue duro y las células aún no se dispersan y a mayor tiempo de exposición las células se dispersan rápido y se rompen. Es importante que las células se encuentren dispersas formando una sola capa; para lograr este objetivo se deben destruir la pared celular y la pectina de las uniones intercelulares, para lo cual se pueden utilizar agentes químicos o tratamientos enzimáticos, o mezcla de ambos.³³

La hidrólisis con Ácido Clorhídrico (HCl) 1N, durante 8 a 12 min a 60°C tuvo buenos resultados, ya que de lo contrario la pared celular no sería suficientemente degradada; permitiendo observar células en una sola capa, evitando así la superposición. Asimismo, igual concentración de HCL 1N a 60°C utilizan cultivos, tales como: “sacha inchi”, tiempo de exposición adecuado del ácido clorhídrico a 60°C es 7 min, en otros cultivos la maceración más común es con ácido clorhídrico 1N a 60°C, tales como en papa de 6 a 8 min, “arracacha” de 10 a 12 min.^{5,27,35}

Con el uso del ácido clorhídrico se reducen costos; no es necesario el uso de enzimas para degradar la pared celular, solo varía el tiempo de exposición en diferentes cultivos.

5.6 Tinción

Para teñir los cromosomas se utilizan tintes básicos debido a la naturaleza ácida de la cromatina.³³ El colorante empleado fue aceto orceína al 2% durante 24 h, la cual tiñe adecuadamente los cromosomas para el recuento cromosómico.

La tinción con aceto orceína al 2% fue efectiva para la visualización y diferenciación de los cromosomas, facilitando de esta manera el conteo cromosómico.

Z.Q. Cai *et al.*,⁵ también mencionan el uso de este colorante en el cultivo de “sacha inchi” utilizado al 1% de aceto orceína durante toda la noche. Se reporta también el uso de este colorante para otros cultivos como “papa”, “camu camu”, arracacha, a la misma concentración y tiempo de exposición.^{6,7,27}

5.7 Determinación del número cromosómico

Se reportaron $2n=44$ cromosomas, encontrándose mayor número de cromosomas en distintas células hasta de una misma raíz.

En la investigación, se encontraron que en cada una de las entradas de los distintos ecotipos existe 1 a 2 células con $2n=40$ y $2n=52$ cromosomas, los cuales podrían ser mixoploidias, el cual indica la variaciones en el número cromosómico entre células en un mismo tejido o podrían ser debido a que la planta estuvo bajo estrés.²⁷ Por lo tanto las variaciones encontradas en las especies podrían deberse también a que las especies son aloploidias que se encuentran en proceso de domesticación, cruzándose entre ellas para su supervivencia, tal como lo reporta Borbor⁶.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Blas²⁷, quien reporta en “arracacha” de 1 a 4 células con $2n=88$ cromosomas, los cuales corresponderían a mixoploidias, que podrían ser debido a que la planta estuvo bajo estrés en condiciones de la Universidad Nacional Agraria La Molina, o por un proceso de infección viral (BMS), que induciría a la duplicación.

Estos resultados difieren con los resultados reportados, por Z.Q. Cai *et al.*,⁵ quienes reportan entre las 72 células observadas en *Plukenetia volubilis*, hay en total 11 números de cromosomas diferentes, que van desde $2n=50$ a $2n=86$, encontrando cromosomas diferentes no sólo en diferentes puntas de las raíces, también en

diferentes células de la misma punta. Los cromosomas con número de $2n=50$ se encontraron en 2,78% de las células, y 1,39% de las células tenían el más alto número de cromosomas de $2n=86$. El número de cromosomas más común es $2n=58$ y alrededor de 27.79% de células con esta cantidad de cromosomas.

Asimismo, difieren en los resultados encontrados por Borbor⁶, en el estudio de determinación de la ploidía de "sacha inchi", en 10 accesiones promisorias y el ecotipo silvestre Apangurayacu, reporta que ambas de las especies de *Plukenetia volubilis* L. presentaron con mayor frecuencia números cromosómicos 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. Reportaron que *Plukenetia volubilis* L. es un heptaploide con un número cromosómico $2n=7x= 56$, siendo el número básico $x=8$.

La variación del número cromosómico puede ocurrir por la no disyunción durante el proceso de división celular, sea esta mitótica o meiótica, lo que produce números desbalanceados de cromosomas.²⁸

IV. CONCLUSIONES

1.- De los cinco ecotipos peruanos *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”, presenta un número de cromosomas $2n=44$ cromosomas. El número de cromosomas de *Plukenetia volubilis* L. es constante en los cinco ecotipos de los distritos de Tarapoto, Moyobamba, Juanjuí, Mazamari y Pichari.

2.- Se estandarizó el procedimiento para la determinación del número cromosómico de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”, utilizando como pre fijación la 8-hidroxiquinolina a 0.002 M por 4 a 6 h a 4°C, la fijación con Carnoy a 4°C por 24 h; la hidrólisis en HCl 1N a 60°C por 10 a 12 min y tinción en aceto orceína al 2% a 4°C por 24 h.

3.- La mejor hora de colecta de raíces de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” fue a las 11 a.m. con un IM=12%, encontrándose mayor cantidad de células metafásicas a esta hora.

V. RECOMENDACIONES

- 1.- Realizar estudios citogenéticos del cariotipo de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”, para obtener estudios más detallados sobre la ploidía de la planta.
- 2.- Se recomienda utilizar camas de almácigo para la germinación de las semillas de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”.
- 3.- Los resultados obtenidos a través de la investigación constituyen estudios básicos del *Plukenetia volubilis* L., recomendado para utilizar en futuras investigaciones en mejoramiento genético.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Reynel, C., Alban. J. Especies con potencial alimenticio en la Amazonía Peruana: etnobotánica y germinación. Revista forestal del Perú.1985;13(1):1-24.
2. Dourojeanni, M. El impacto de la producción de la fauna silvestre en la economía de la Amazonía peruana. Revista Forestal del Perú. 1976. 5(1-2): 15-27.
3. Poehlman, J., Allen, D. Mejoramiento genético de las Cosechas.2ª Ed. Limusa. México DF. 2003.
4. De la Sota, E. Serie de Biología: la taxonomía y la revolución en las ciencias biológicas. Monografía N°3.1982. Cap. 4: 27- 31
5. Cai Z., Zhang T. y Jlan H. Variación del número de cromosomas en un cultivo de semillas oleaginosas, leñosas y prometedoras *Plukenetia volubilis* L. (Euphorbiaceae), Cariología. Revista Internacional de Citología, Citosistemática y Citogenética. 2013.66 (1): 54 – 58.
6. Borbor, M. Estudio de la ploidía en *Plukenetia volubilis* L., “sacha inchi” [Tesis].Tarapoto: Universidad Nacional de San Martín. Facultad de Ciencias Agrarias. Perú, 2010.
7. Gutiérrez, R., Parra, R., G., Zapata T. Determinación del número cromosomal de “camu camu” (*Myrciaria dubia* (H, B, K.) Mac Vaught): Estudio Comparativo de Cuatro Poblaciones Naturales [Tesis].Centro de Investigaciones en Recursos Genéticos y Biotecnología Vegetal (CIRGEBV). Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú; 2012.
8. Herrera, W., Hernández, C. y Yurany, M. Plantas oleaginosas del Caqueta, Amazonía Colombiana. Universidad de Amazonía. Revista Ingenierías y Amazonía.Colombia,2010.3(1), 28-39.

9. Arévalo, G. El cultivo de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” en la Amazonía. Instituto Nacional de Investigación Agraria. Proyecto suelos tropicales. Editor Luís A. Carvajal Briceño. Lima - Perú. 68p. 1996.
10. Manco, E. Cultivo de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”. Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria (INIA). Estación experimental agraria “el porvenir”. San Martín – Perú; 2006.(Acceso el 20 de agosto del 2015). Disponible en: <http://www.incainchi.es/pdf/1358.pdf>
11. Brack, A. Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles de Perú. Programa de las Naciones Unidas Para el Desarrollo PNUD; Centro de Estudios Regionales Andinos “Bartolomé de las Casas”. Cuzco; 1999.
12. Linneo, C. Species Plantarum. Ed. Berolini Impensis G. C. Nauk1803. Inglaterra–Reino Unido, 1753.
13. Pascual G, Mejía M. Extracción y caracterización del aceite de *Plukenetia vulubilis* “sacha inchi”. Anales científicos UNALM. Lima-Perú.2000; Vol. 42. 144 - 158.
14. Hanzen, S. Resultados del aceite y proteína del cultivo de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”. Ithaca, NY: Universidad Cornell. U.S.A.; 1980.
15. Valles, C. El *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”, Importante oleaginosa selvática. Revista Pura Selva, Amazonas - Perú; 1995; 10(2): 40-41.
16. Lomanto, D., Ortiz, L., Breton, O., Gómez, I., Mesa, M. Ciclo celular. Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Bucaramanga. MEDUNAB, 2003; 6(16): 21 – 29.
17. Orrillo, M., y Merideth, B. Manual técnico: Biología Reproductiva y Citogenética de la papa. Centro Internacional de la papa (CIP). Perú; 2009.
18. Lewin, B. Genes. Oxford Universidad de Oxford. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 5^{ta} Ed, Inglaterra- Reino Unido, 2000:2850-912.
19. Ayala, F. y Kiger, J. Genética Moderna. Ed. Omega Barcelona. España, 1984. p. 11 -15

20. Aguirre, A. Guía práctica del ciclo celular y mitosis. Norma, 8 ed. Cali; 2000. 651-76.
21. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Raff, K., Roberts, D., Watson, D. J. Biología molecular de la célula. 3 ed. Omega Barcelona. España, 1996:596-614.
22. Rojas, E. Manual de histología: Ciclo celular, maquinaria y frenos. 2010 (Acceso 28 de septiembre del 2015). Disponible en:
<http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/libros/pdfs/histologica22-24.pdf>.
23. Molist, P., Pombal, A., Megias, M. Atlas de histología vegetal y animal (sede web). Universidad de Vigo España; 2011. (Acceso 29 de agosto de 2014). Pág. 3-16. Disponible en: <http://webs.uvigo.es/mmegias/descargas/atlas-celula-ampliaciones.pdf>.
24. Tjio, J., Levan, A. The use of oxyquinoline in chromosome analysis. Ann. Estación Expt. España: Dei; 1950.
25. Castrillo, J., Bodner, M., Theill, E., Deerinck, T., Ellisman, M., Karin, M. Factores específicos de la transcripción. Biblioteca nacional de medicina de los EE. UU. Instituto Nacional de Salud. Engl. J Med. 1988 Nov 4; 55(3): 505-18. PubMed PMID: 2902927.28. Strasburger, E. Tratado de botánica. 8va. Ed. castellana. Ediciones Omega S.A. 1994.
26. Hermes, P., Jorge, E., Pino, J., Echeverri, D., Echeverri, M., Olivera, A. Triploidía en *Oncorhynchus mykiss* “trucha arcoíris”: posibilidades en Colombia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias (Revista Colombiana de la Ciencia Animal y la Medicina Veterinaria), 2004. Vol 17, No 1.
27. Blas, R. Número de Cromosomas de *Arracacia xanthorrhiza* B. “arracacha” [Tesis]. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima – Perú. 1997.
28. Gardner, E., Simms, M., Snutad, P. Genética. Cuarta Edición. Ed. Limusa. México, 2000. Pág. 24-26, 489, 132 – 133, 525.
29. Karp, G. Biología celular y molecular: Conceptos y Experimentos. 5ta Edición. Mac Graw Hill. México, 2009. p.570.

30. Núñez, J., Tapia, R. Diversidad genética y conservación: La fragmentación del hábitat y la biodiversidad genética de la selva húmeda tropical. Publicación del Instituto de Ecología UNAM. IKOS. 2010. (Acceso 29 de noviembre de 2015). Pág.4. Disponible en: <http://www.ecologia.unam.mx/oikos02.pdf>
31. Ricardo, S., Holle, M. Recursos genéticos vegetales. Centro Luis León Asociados. Lima-Perú, 2004. p.445.
32. Zamudio, F. Genética y mejoramiento forestal. Importancia de fuente de semilla en el mejoramiento genético forestal universidad de Talca- Chile. 2009. (Acceso 15 diciembre del 2015). Pág. 1-20. Disponible en: http://colbun.otalca.cl/intercambio/otros/mgforestal/Manual_Adobe/apunte004.pdf
33. Valladolid, A., Blas, R., Gonzáles, R. (2004). Introducción al recuento de cromosomas somáticos en raíces andinas. En: Seminario J. (ed.) Raíces andinas. Contribuciones al conocimiento y la capacitación. Serie: conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: una década de investigaciones para el desarrollo. C.I.P. Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación. Lima – Perú, 1993-2003. N°6. p. 96-99.
34. Talledo, D., Escobar C., V. Aleman. Introducción al análisis cromosómico en vegetales. Lima: Universidad Ricardo Palma. Perú, 1993. p. 141.
35. Huamán, Z. Técnicas citológicas para determinar el número cromosómico y fertilidad de las papas. Guía de investigación CIP 10. Centro Internacional de la papa (CIP). Perú; 1995. p. 4 – 18.
36. Roth, I. Anatomía de las plantas superiores. Colección Ciencias Biológicas. Ediciones de la Biblioteca. Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela, 1966.
37. Pereira, E., Alcorcés, Méndez, N. Determinación del ciclo mitótico de dos cultivares de *Gossypium hirsutum* L. y dos ecotipos de *Gossypium barbadense*. Acta Biol. Par., Curitiba-Brasil, 2007. 36 (3-4): 121-149.
38. Swanson, C., T Mertz. W.J. Young. El cromosoma en la división, la herencia y la evolución. U.S.A., 1981.

39. Delgado, L., Uribe, M., Marulanda, M. Estandarización de la técnica citogenética "SQUASH" para conteo de cromosomas mitóticos en *Rubus glaucus*. Scientia Et Technica, vol. XVII, núm. 46, Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia, diciembre, 2010. p. 74-79.
40. García, V. Técnicas y procedimientos de Citogenética Vegetal. 3ª ed. Universidad Autónoma de Chipango, México.1998. p. 144.
41. Haskell, G., Willis, A.B. Primer of chromosomes practice. Oliver and Boy Londres-España. 1968. P.150.

VII. ANEXOS

Anexo 1: Preparación de soluciones

Carnoy (3:1)

- En un frasco agregar 3 partes de etanol al 100% y 1 parte de ácido acético glacial. Mezclar bien y guardar en un frasco oscuro.

8-hidroxiquinolina al 0.002M

Para un litro de solución:

- Pesar 0.2 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 la solución en etanol al vaso de precipitación.
- Llenar la solución en un frasco oscuro cubierto con papel aluminio para evitar la entrada de luz y 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

Colchicina al 2%

Para 100 ml de solución:

- Pesar 2 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

Ácido Clorhídrico 1N

Para 1 litro de solución:

- Medir 87.49 ml de HCL (concentrado)
- Enrazar a 1 L con agua destilada.
- Guardar en un envase oscuro.

Orceína acética 2%

Para 50 ml de solución:

- Pesar 1 g de orceína.
- Disolver la orceína en caliente a 60° C, en 22.5 ml de ácido acético glacial.
- Vertir los 22.5 ml en una mezcla de 27.5 ml de agua destilada.
- Mantener agitado durante 5 a 10 minutos y filtrar 1 ó 2 veces.

Anexo 2: Evaluación de la hora mitótica de cinco ecotipos peruanos de *Plukenetia volubilis* L. Universidad Nacional Agraria La Molina.

Tiempo (h)	Campo	Interfase	Profase	Metafase	Anafase	Telofase	Total
8:00	1er campo	90	6	2	1	0	99
	2do campo	96	5	3	1	0	105
	3er campo	97	3	2	1	0	103
	4to campo	91	2	1	1	0	95
	5to campo	92	3	1	2	0	98
9:00	1er campo	91	7	4	3	0	105
	2do campo	90	2	3	2	0	97
	3er campo	92	4	1	2	1	100
	4to campo	94	3	3	1	0	101
	5to campo	93	3	1	0	0	97
10:00	1er campo	89	3	2	2	1	97
	2do campo	90	4	3	3	1	100
	3er campo	91	6	3	2	0	102
	4to campo	90	4	4	0	0	99
	5to campo	92	3	5	2	0	102
11:00	1er campo	90	6	5	1	1	102
	2do campo	84	3	6	4	0	97
	3er campo	90	5	5	1	0	106
	4to campo	86	6	4	3	0	99
	5to campo	92	2	3	2	0	101
12:00	1er campo	85	2	5	1	1	97
	2do campo	93	4	2	5	0	105
	3er campo	90	5	4	3	0	104
	4to campo	89	5	3	3	0	100
	5to campo	87	4	4	1	0	96

	1er campo	84	4	4	3	0	100
	2do campo	90	3	2	2	2	101
	3er campo	96	5	4	1	0	106
	4to campo	84	6	2	3	1	96
	5to campo	87	4	4	3	1	99
	1er campo	90	7	3	5	0	105
	2do campo	82	4	2	3	1	92
14:00	3er campo	94	3	3	0	0	102
	4to campo	93	3	3	4	1	104
	5to campo	87	6	4	2	0	99
	1er campo	90	8	2	6	1	107
	2do campo	84	4	4	0	2	94
15:00	3er campo	91	1	3	1	0	96
	4to campo	87	7	3	3	0	100
	5to campo	93	4	4	2	0	103
	1er campo	85	5	2	3	0	95
	2do campo	90	8	3	3	1	103
16:00	3er campo	93	4	0	2	1	100
	4to campo	95	3	2	2	3	105
	5to campo	87	3	3	2	0	95
<hr/>							
	1er campo	94	6	2	4	0	106
	2do campo	96	7	1	5	2	110
17:00	3er campo	86	2	3	3	0	101
	4to campo	87	3	2	4	0	96
	5to campo	85	2	1	3	2	93
	1er campo	92	3	2	6	1	104
	2do campo	88	8	1	2	0	99
18:00	3er campo	91	4	2	4	1	102
	4to campo	90	7	0	2	1	100
	5to campo	89	2	3	1	0	96
<hr/>							

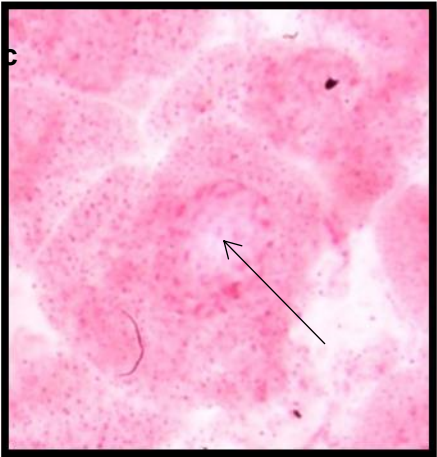
Anexo 3: Total de células encontradas en diferentes fases de la mitosis de *Plukenetia volubilis* L. Universidad Nacional Agraria La Molina.

Tiempo (h)	Interfase	Profase	Metafase	Anafase	Telofase	Total
8:00	466	19	9	6	0	500
9:00	460	19	12	8	1	500
10:00	453	20	17	9	2	500
11:00	442	22	23	12	1	500
12:00	448	20	18	13	1	500
13:00	450	21	14	11	4	500
14:00	452	22	12	12	2	500
15:00	453	22	13	10	2	500
16:00	454	20	10	11	5	500
17:00	458	20	9	9	4	500
18:00	459	19	8	9	5	500

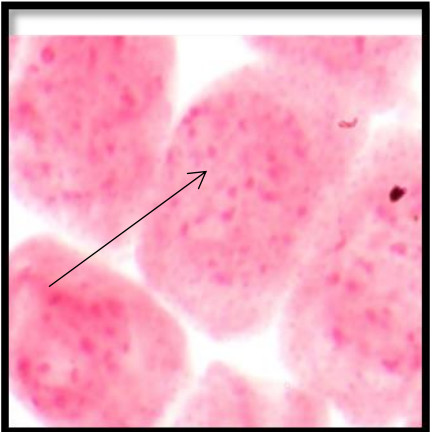
Anexo 4: Determinación del índice mitótico de cinco ecotipos peruanos de *Plukenetia volubilis* L. Universidad Nacional Agraria La Molina.

Tiempo (h)	Interfase	Profase	Metafase	Anafase	Telofase	Total de células en división	células	IM
8:00	466	19	9	6	0	34	Total	7
9:00	460	19	12	8	1	40	500	8
10:00	453	20	17	9	2	48	500	10
11:00	442	22	23	12	1	58	500	12
12:00	448	20	18	13	1	52	500	10
13:00	450	21	14	11	4	50	500	10
14:00	452	22	12	12	2	48	500	10
15:00	453	22	13	10	2	47	500	9
16:00	454	20	10	11	5	46	500	9
17:00	458	20	9	9	4	42	500	8
18:00	459	19	8	9	5	41	500	8

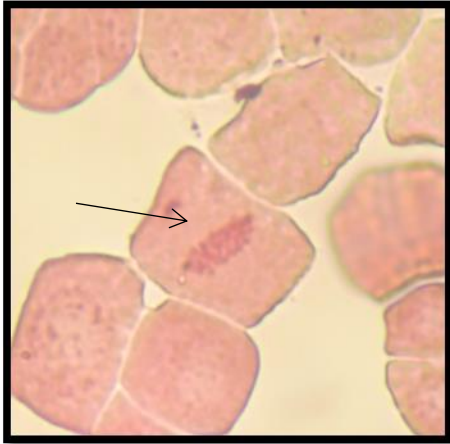
Anexo 5: División celular en *Plukenetia volubilis* L.



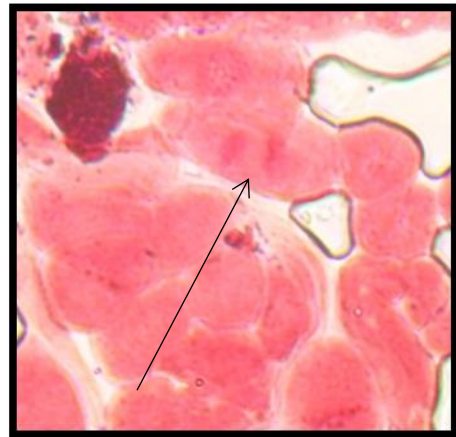
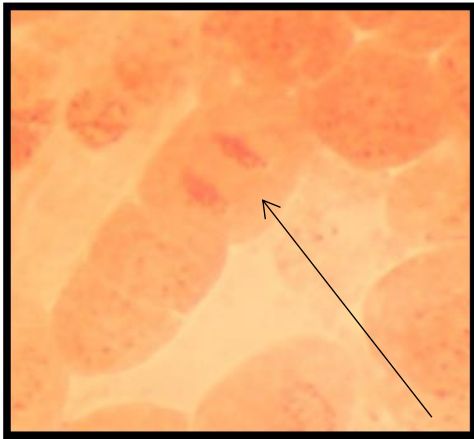
Interfase



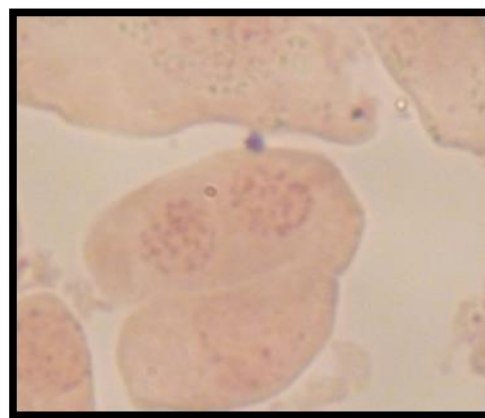
Profase



Metafase



Anafase



Telofase

Anexo6: Obtención de raíces de las semillas colocadas en sustrato, jiffy-7, agua de caño y musgo prensado (sushine).



Sustrato musgo prensado (jiffy-7)



Sustrato agua potable

Sustrato sushine canadiense.



Obtención de raíces de las semillas colocadas en agua potable.

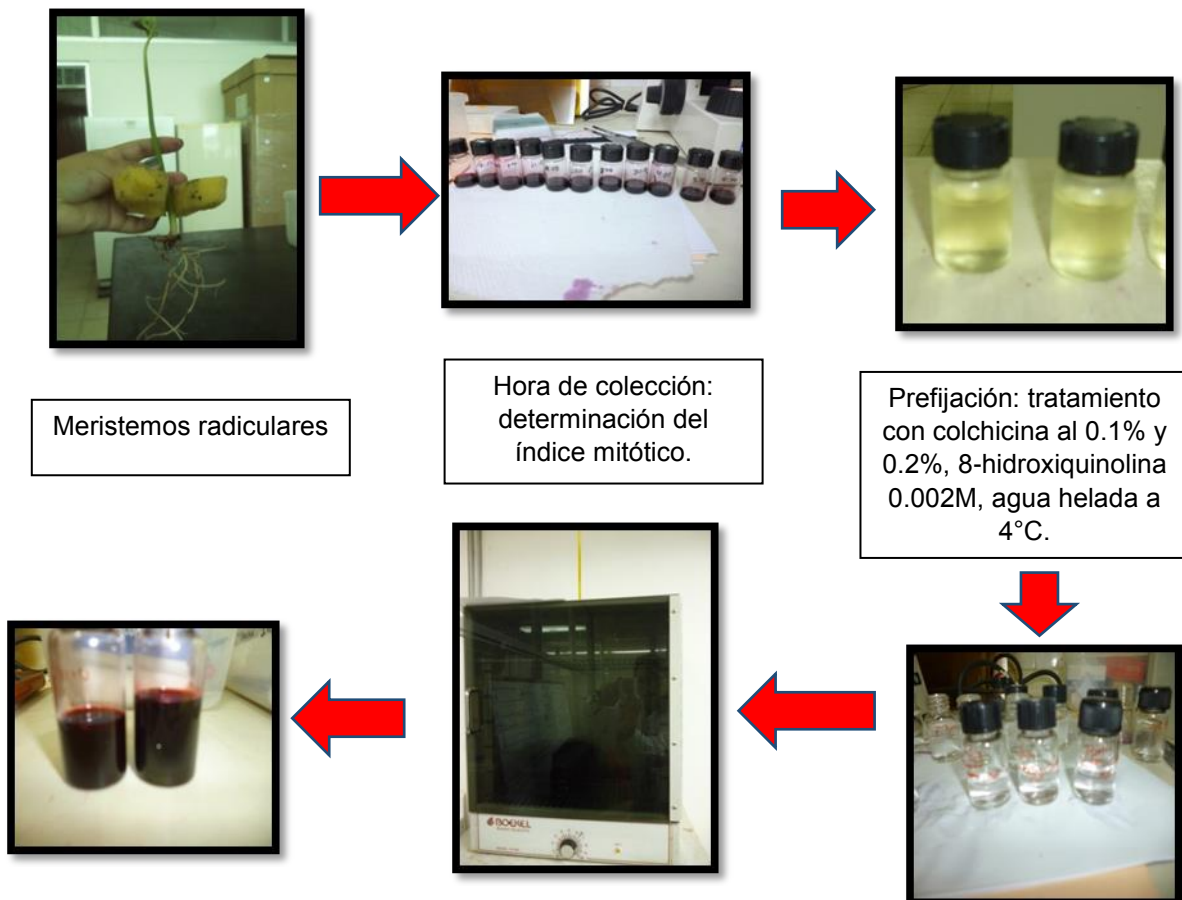


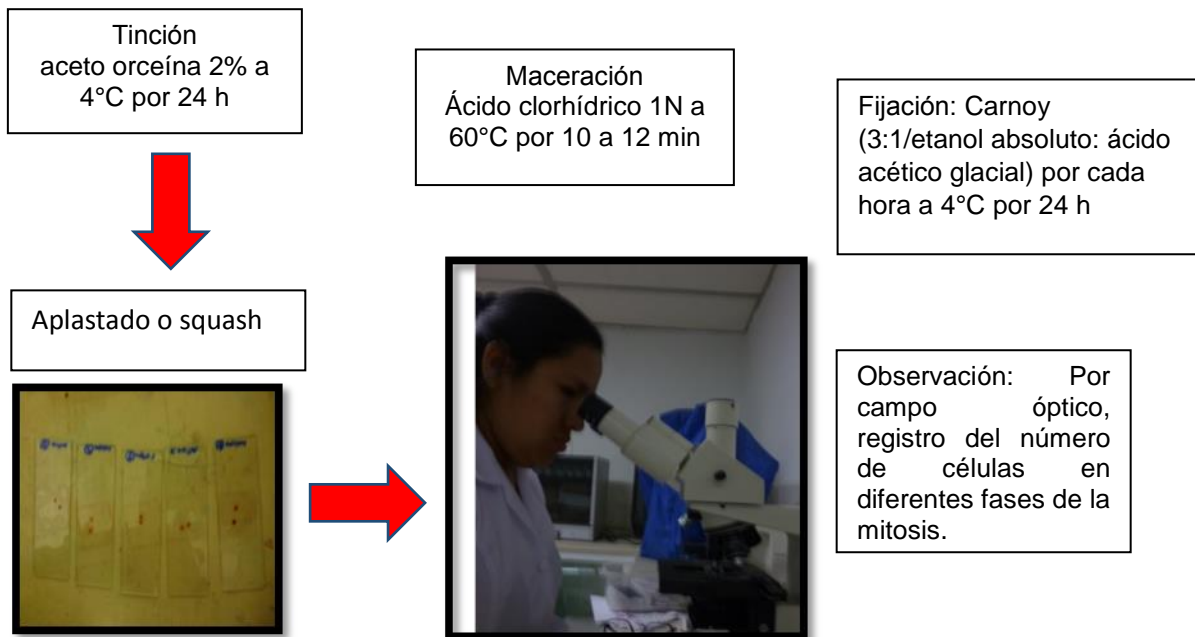
Obtención de raíces de las semillas colocadas en sustrato de musgo prensado (jiffy-7).



Obtención de raíces de las semillas colocadas en sushine canadiense.

Anexo 7: Protocolo de trabajo para el conteo de cromosomas en *Plukenetia volubilis* L.





Anexo 8: Datos de pasaporte de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”, de la colección del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

- 1) Departamento: San Martín
Provincia: San Martín
Distrito: Tarapoto.
Lugar de colecta: Tarapoto
Latitud de colecta: 06°31'30"
Longitud de colecta: 76°21'50"
Tipo de muestra: semillas

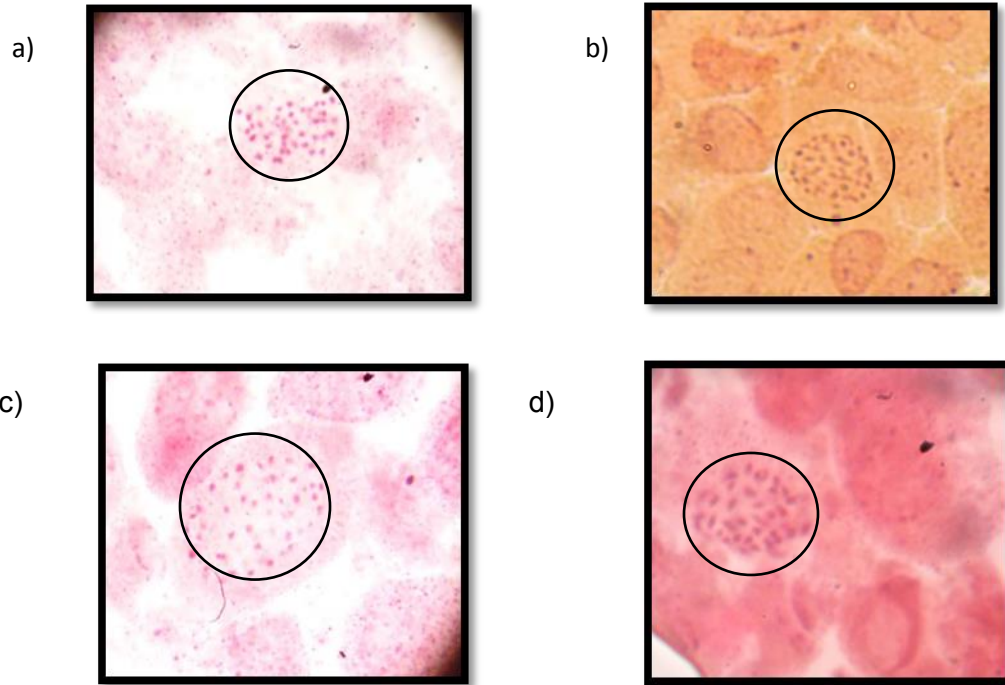
- 2) Departamento: San Martín
Provincia: Mariscal Cáceres
Distrito: Juanjuí.
Lugar de colecta: Juanjuí
Latitud de colecta: 7°10'37"
Longitud de colecta: 76°43'39"
Tipo de muestra: semillas

3) Departamento: San Martín
Provincia: Moyobamba
Distrito: Moyobamba.
Lugar de la colecta: Moyobamba
Latitud de colecta: 76°43'
Longitud de colecta: 77°38'
Tipo de muestra: semillas

4) Departamento: Junín
Provincia: Satipo
Distrito: Mazamari.
Lugar de la colecta: Mazamari
Latitud de colecta: 11°19'42"
Longitud de colecta: 74°31'50"
Tipo de muestra: semillas

5) Departamento: Cuzco
Provincia: La Convención
Distrito: Pichari.
Lugar de colecta: Pichari- Teresa
Latitud de colecta: 12°30'57"
Longitud de colecta: 73°49'37"
Tipo de muestra: semillas

Anexo 9: Microfotografías de células de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi” para resaltar los cromosomas en un mismo plano (a, b, c, d)



Anexo 10: Contaje cromosómico de células metafásicas de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”.

